



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências Sociais e Humanas

# **Rastreio dos polimorfismos genéticos XbaI e PvuII dos receptores de estrogénios alfa na consulta de ginecologia oncológica do Centro Hospitalar Cova da Beira**

**Joana Margarida Silva Marques**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Farmacêuticas**  
(Ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Luíza Granadeiro  
Co-orientador: Prof. Doutor José Moutinho  
Co-orientadora: Doutora Ana Cristina Ramalhinho

**Covilhã, Outubro de 2011**

# Dedicatória

Este trabalho é dedicado às duas pessoas mais importantes da minha vida: a minha Mãe e o meu Pai. Eles são a razão da minha existência, a minha inspiração e o meu apoio permanente. A realização deste trabalho só foi possível porque, apesar de todas as contrariedades, eles fizeram-me acreditar que no final valeria a pena, e, por ter acreditado neles estou aqui.

Dedico também este trabalho ao meu pequeno afilhado e sobrinho, Diogo, para que um dia quando ele crescer seja o meu nome a constar num trabalho como este.

# Agradecimentos

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dra. Luíza Granadeiro, à Dra. Ana Cristina Ramalhinho e ao Prof. Dr. José Moutinho pelo encorajamento e apoio para realizar este trabalho.

Agradeço ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) pela oportunidade de realizar o meu trabalho nas instalações.

Agradeço, especialmente ao João, que esteve presente em todos os momentos importantes, desde o princípio ao fim desta etapa e que apesar de todas as dificuldades me apoiou incondicionalmente.

## Resumo

Os estrogénios são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e função de vários tecidos como o tecido mamário, endométrio, osso, vasos sanguíneos, entre outros. Os receptores de estrogénios (ER) são responsáveis pela sua acção biológica, podendo ser de três tipos: ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPR30. Os polimorfismos dos receptores de estrogénio, PvuII e XbaI, têm sido associados a diversas patologias ginecológicas como o cancro da mama, cancro do endométrio, adenomiose e leiomioma. Realizámos um estudo numa amostra de mulheres que frequentaram a consulta de ginecologia oncológica do Centro Hospital Cova da Beira com o objectivo de estudar a associação entre os polimorfismos genéticos, PvuII e XbaI, e doenças do foro ginecológico feminino. A amostra foi constituída por 21 mulheres com patologias ginecológicas e 121 mulheres saudáveis. Todas as participantes assinaram um termo de consentimento informado. O ADN foi extraído pelo método do Chelex e os genótipos foram determinados por PCR-RFLP.

Concluimos que parece existir uma associação entre o alelo G do polimorfismo XbaI e o alelo C do polimorfismo PvuII do receptor de estrogénio alfa e o aumento de risco de doença do foro ginecológico;

Foi possível estabelecer uma relação entre as mulheres portadoras do alelo G do polimorfismo XbaI e o aumento do risco de desenvolver infecção por HPV.

Verificou-se que as mulheres portadoras do alelo G do polimorfismo XbaI estão associadas a aumento da susceptibilidade de desenvolver uma patologia inflamatória. No entanto, este trabalho apresenta limitações que obrigam à análise destes dados de uma forma muito cautelosa, mas que pode levar à realização de futuros estudos e desenvolvimentos na área.

## Palavras-chave

Estrogénio, Receptor de Estrogénio alfa, XbaI, PvuII, Infecção por HPV, Inflamação.

# Abstract

Estrogen is responsible for the growth, differentiation and function of several tissues such as mammary, endometrial, bone, blood vessels, among others. Estrogen receptors (ER) are responsible for its biological action and can be divided into three different types: ER $\alpha$ , ERB and GPR30. The polymorphisms of the estrogen receptors, PvuII and XbaI, have been associated with several gynecological pathologies such as breast or endometrial cancer, adenomyosis and leiomyoma. This study was applied to a sample of women who underwent an oncological gynecology consultation at Centro Hospitalar Cova da Beira in order to study the association between the genetical polymorphisms PvuII and XbaI and female gynecological diseases. The sample was composed by 21 women with gynecological diseases and 121 healthy women. All participants signed a written informed consent. The DNA was extracted by Chelex method and the genotypes were determined by PCR-RFLP.

We concluded that it seems to exist an association between G allele of the XbaI polymorphism and the C allele of the PvuII polymorphism of estrogen receptor  $\alpha$  and an increased risk of gynecological disease;

It was possible to establish a relation between women carrying G allele of the XbaI polymorphism and increased risk of developing HPV infection;

It was possible to verify that women carrying G allele of the XbaI polymorphism are associated with the increase of susceptibility to develop an inflammatory disease. However, this work showed limitations that forces a careful analysis of results but can lead to further studies and develops in the area.

## Keywords

Estrogen, Estrogen Receptor alpha, XbaI, PvuII, HPV Infection, Inflammation.

# Índice

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1– Estrogénios	1
1.1.1 – Biossíntese do estrogénio	1
1.1.2 – Metabolismo do estrogénio	3
1.2 – Acções do estrogénio	3
1.2.1 – Receptores de estrogénio	4
1.2.2 – Domínios estruturais dos receptores de estrogénio	4
1.2.3 – Mecanismos de acção dos receptores de estrogénio	7
1.3 – Receptores de estrogénio alfa vs. Receptores de estrogénio beta	9
1.4 – Receptores de estrogénio alfa	12
1.4.1 – Importância da fosforilação e acetilação dos receptores de estrogénio	12
1.4.2 – Co-reguladores: co-activadores e co-supressores	13
1.5 – Papel funcional dos receptores de estrogénio. Relação com algumas doenças e fisiologia celular	14
1.5.1 – Cancro da mama	15
1.5.1.1 – Terapêutica do cancro da mama: SERMs e SERDs	16
1.6 – Polimorfismos dos receptores de estrogénio alfa: PvuII e XbaI	18
1.6.1 – Papel funcional dos polimorfismos dos receptores de estrogénio alfa. Relação com a fisiologia celular e doença.	19
1.6.1.1 – Adenomiose, endometriose e leiomioma	20
1.6.1.2 – Cancro da mama	21
1.6.1.3 – Cancro endométrio	22

1.6.1.4 – Duração da exposição a estrogénio e fertilidade	23
<b>2. OBJECTIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 – Objectivos gerais	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 - População-alvo	26
3.2 – Extracção de ADN e Genotipagem	26
3.2.1 – Extracção de ADN com recurso ao Chelex 100 da Bio-Rad.	26
3.2.2 – Amplificação do ADN presente na amostra por PCR-RFLP (polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição).	27
3.2.3 – Digestão da amostra e genotipagem	29
3.3 – Análise estatística	29
<b>4. RESULTADOS/DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
4.1 - Análise de parâmetros do grupo de controlo (GC) e o grupo de mulheres com patologia (GMP)	32
4.2 - Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo de mulheres com patologia (GMP)	34
4.2.1 – Análise da distribuição dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC)	34
4.2.2 – Análise da frequência alélica dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC)	35
4.2.3 – Análise dos haplotipos dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia com patologia (GMP) e no grupo de controlo (GC)	36
4.3 Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo composto por doentes com uma infecção causada pelo Papilomavírus Humano (HPV) (Infecção por HPV)	38
4.3.1 - Análise da distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC)	38
4.3.2 – Análise da frequência alélica do polimorfismo XbaI e PvuII em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC)	39
4.4 Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo composto por doentes devido a um processo inflamatório (Processos inflamatórios)	41
4.4.1 Análise da distribuição do polimorfismo XbaI e PvuII no grupo de doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC)	41

**4.4.2 – Análise da distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC) 42**

<b>5.</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>46</b>



# Lista de Figuras

**Figura 1** Biossíntese do estradiol.

**Figura 2** Metabolismo do estrogénio.

**Figura 3** Estrutura do receptor de estrogénio alfa e receptor de estrogénio beta.

**Figura 4** Domínio de ligação ao ADN da família de receptores nucleares.

**Figura 5** Estrutura geral de um receptor acoplado à proteína G contendo sete segmentos transmembranares.

**Figura 6** Sinalização do receptor de estrogénio “genómica” e “não genómica”.

**Figura 7** Mecanismo “não genómico” da proteína ER $\alpha$  na membrana plasmática.

**Figura 8** Localização dos dois subtipos “clássicos” de receptores de estrogénio.

**Figura 9** Representação de domínios estruturais e locais de modificações pós-translacionais.

**Figura 10** Estruturas do estradiol e dois anti-estrogénios que são capazes de se ligar ao ER.

**Figura 11** Estrutura química de dois SERDs.

**Figura 12** Localização dos polimorfismos PvuII e XbaI no receptor de estrogénio alfa.

**Figura 13** Representação esquemática de uma reacção em cadeia pela polimerase (PCR).

**Figura 14** Resultados obtidos após electroforese.

# Lista de Tabelas

**Tabela 1** Organização dos grupos para fins estatísticos.

**Tabela 2** Distribuição por frequência dos parâmetros que caracterizam a população estudada.

**Tabela 3** Distribuição dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo de controle (GC).

**Tabela 4** Frequência alélica dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo de controle (GC).

**Tabela 5** Análise dos haplotipos dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo de controle (GC).

**Tabela 6** Distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com infecção por HPV e grupo de controle (GC).

**Tabela 7** Frequência alélica do polimorfismo XbaI e PvuII em doentes com infecção por HPV e grupo de controle (GC).

**Tabela 8** Distribuição do polimorfismo XbaI e PvuII no grupo de doentes com processos inflamatórios e grupo de controle (GC).

**Tabela 9** Distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com processos inflamatórios e grupo de controle (GC).

# Lista de Abreviaturas

2-MeOE2 - 2-metoxiestrogénio  
2-OHE<sub>2</sub> - 2-hidroxiestrogénio  
4-MeOE2 - 4-metoxiestrogénio  
4-OHE<sub>2</sub> - 4-hidroxiestrogénio  
ADN - Ácido desoxirribonucleico  
AF1 - Função de activação 1  
AF2 - Função de activação 2  
Akt - Proteína quinase serina/treonina  
ARN - Ácido ribonucleico  
BRCA1 - Cancro da mama 1, início precoce  
cADN - Ácido desoxirribonucleico complementar  
cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico  
CBP - Proteína de ligação de CREB  
COMT - Catecol-O-metil-transferase  
CREB - Proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP  
c-Src - scr-celular  
DBD - Domínio de ligação ao ADN  
DHEA - Dehidroepiandrosterona  
EGF - Factor de crescimento epidérmico ligado à pró-heparina  
EGFR - Receptor do factor de crescimento epidérmico  
eNOS - Óxido nítrico sintetase endotelial  
ER - Receptor de estrogénio  
ERE - Elementos de resposta a estrogénio  
Erk 1/2 - Quinase regulada por sinal extracelular 1/2  
ER $\alpha$  - Receptor de estrogénio alfa  
ER $\beta$  - Receptor de estrogénio beta  
GPCR - Família de receptores acoplados à proteína G  
GPR30/GPER - Receptor acoplado à proteína G  
HBP - Hiperplasia benigna da próstata  
HDL - Lipoproteínas de alta densidade  
HPV - Papilomavírus humano  
Hsp - Proteína de choque térmico  
IFN- $\gamma$  - Interferão gama  
IGF - Factor de crescimento insulínico  
IL - Interleucina  
iNOS - Óxido nítrico sintetase induzível  
LBD - Domínio de ligação à hormona

MAP - Proteína activada por mitogenio  
MAPK - Proteína quinase activada por mitogenio  
mARN - Ácido ribonucleico mensageiro  
MCP-1 - Proteína quimioatractora de macrófagos/monócitos  
mER - Receptores de estrogénio acoplados à membrana  
MMP - Matriz de metaloproteinasas  
MNAR - Modulador da actividade não genómica do receptor de estrogénio  
NcoR - Co-repressor do receptor nuclear  
NF-kB - factor nuclear kappa b  
PAK-1 - p21-quinase activada 1  
PCR - Reacção em cadeia pela polimerase  
PCR-RFLP - Reacção em cadeia pela polimerase- Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição.  
PI3K - Quinase 3-fosfatidilinositol  
PKA - Proteína quinase A  
REA - Repressor da actividade do gene ER  
SERD - Sub-regulador selectivo dos receptores de estrogénio.  
SERM - Modulador selectivo dos receptores de estrogénio  
SNP - Polimorfismo de nucleótido único  
SRC-1 - Co-activador do receptor esteróide 1  
SRC-2 - Co-activador do receptor esteróide 2  
SRC-3 - Co-activador do receptor esteróide 3  
TF - Factor de transcrição  
TGFB - Factor de crescimento tumoral beta  
TLR4 - Receptor *Toll-like*  
TNF - Factor de necrose tumoral  
Ub/26S - Ubiquitina/proteossoma  
UV - Ultravioleta  
VDR - Receptor da vitamina D

# 1. Introdução

O estrogénio é responsável por inúmeras funções biológicas no corpo humano.

Há muito que se tem vindo a descrever uma possível ligação entre os polimorfismos dos receptores de estrogénio e a susceptibilidade a algumas doenças, nomeadamente, doenças cardiovasculares, osteoporose e alguns cancros do foro ginecológico com grande componente estrogénica (Yaich et al., 1992; Willing et al., 1998; Weiderpass et al., 2000; Schuit et al., 2004; Yoon et al., 2010).

## 1.1- Estrogénios

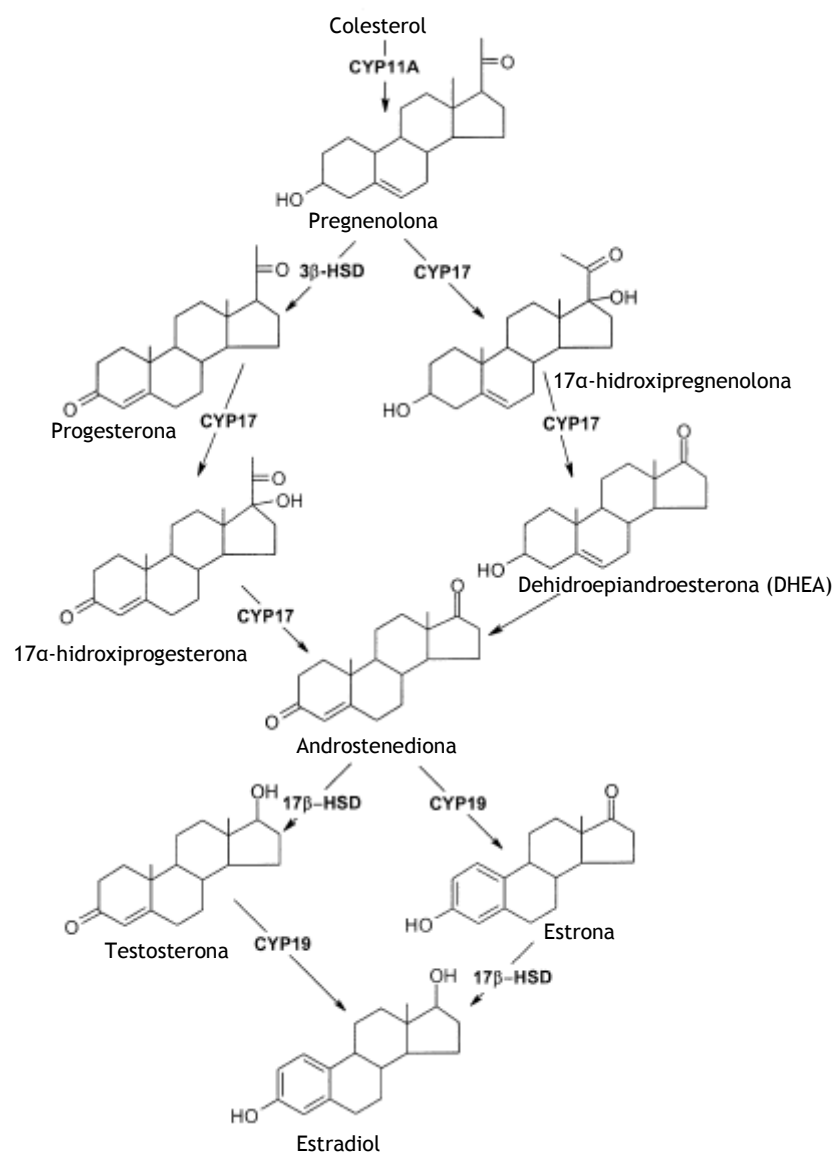
Os estrogénios são produzidos pelos ovários e placenta, e em menores quantidades pelos testículos, córtex da supra-renal, cérebro, tecido adiposo, mama, pele, vasos sanguíneos, osso e cartilagem (Czajka-Oraniec and Simpson, 2010). Existem três compostos estrogénicos endógenos principais nos seres humanos: o estradiol, a estrona e o estriol, sendo o estradiol o mais potente e principal estrogénio produzido pelo ovário (Mitrunen and Hirvonen, 2003).

Os estrogénios influenciam o crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos como por exemplo a mama, a próstata, o cérebro, o osso e o sistema cardiovascular (Kok and Linn, 2010; Prins and Korach, 2008; Pike et al., 2009; Imai et al., 2010; Bhupathy et al, 2010).

### 1.1.1 - Biossíntese do estrogénio

Os estrogénios são sintetizados nos ovários, pelos folículos maduros, em mulheres pré-menopausicas não grávidas (Mitrunen and Hirvonen, 2003). A Figura 1 representa um esquema da biossíntese de estrogénios realizada nos ovários. No entanto, a biossíntese de estrogénio pode estar presente noutros locais do corpo e torna-se a maior fonte de estrogénio após a menopausa. Estes locais incluem as células mesenquimatosas do tecido adiposo e pele, osteoblastos e osteoclastos no osso, alguns locais no cérebro como o hipotálamo e amígdala e células do músculo liso aórticas e células endoteliais (Simpson et al., 1999). Os locais de produção de estrogénio fora dos ovários têm a capacidade de converter os esteróides C19 em esteróides C18, mas não tem a capacidade de sintetizar os precursores de esteróides C19, e

portanto são dependentes da disponibilidade de esteróides C19 na circulação (Simpson et al., 1999). Por outro lado, os estrogénios sintetizados nestes compartimentos, particularmente o osso, a mama e o cérebro, são apenas biologicamente activos no local onde são produzidos e, embora a quantidade de estrogénio produzida por estes seja relativamente pequena, as concentrações locais atingidas serão elevadas e exercem influência biológica no local da produção (Simpson et al., 1999).



**Figura 1** Biossíntese do estradiol (Adaptado de Mitrunen and Hirvonen, 2003)

### 1.1.2 - Metabolismo do estrogénio

Segundo os investigadores Mitrunen and Hirvonen, 2003, o estradiol e a estrona são metabolizados *in vivo* por duas vias distintas: a hidroxilação no anel A e a hidroxilação no anel D. A hidroxilação no anel D origina a formação de 16 $\alpha$ -hidroxiestrona, enquanto a hidroxilação no anel A origina a conversão em 2-hidroxiestrogénio ou 4-hidroxiestrogénio (Mitrunen and Hirvonen, 2003).

Os estrogénios são metabolizados pela estrogénio 2/4-hidroxilase nas posições orto em relação ao grupo fenol na posição 3 para formar 2-hidroxiestrogénio (2-OHE<sub>2</sub>) e 4-hidroxiestrogénio (4-OHE<sub>2</sub>) (Figura 2) (Mitrunen and Hirvonen, 2003). Estes intermediários são bastante instáveis *in vivo* uma vez que entram em ciclo redox com produção de quinonas, semi-quinonas e radicais livres (Mannisto and Kaakkola, 1999) e são rapidamente convertidos a 2-metoxiestrogénio (2-MeOE<sub>2</sub>) e 4-metoxiestrogénio (4-MeOE<sub>2</sub>), bem como a conjugados glucuronido, sulfato e glutatona (Mitrunen and Hirvonen, 2003).

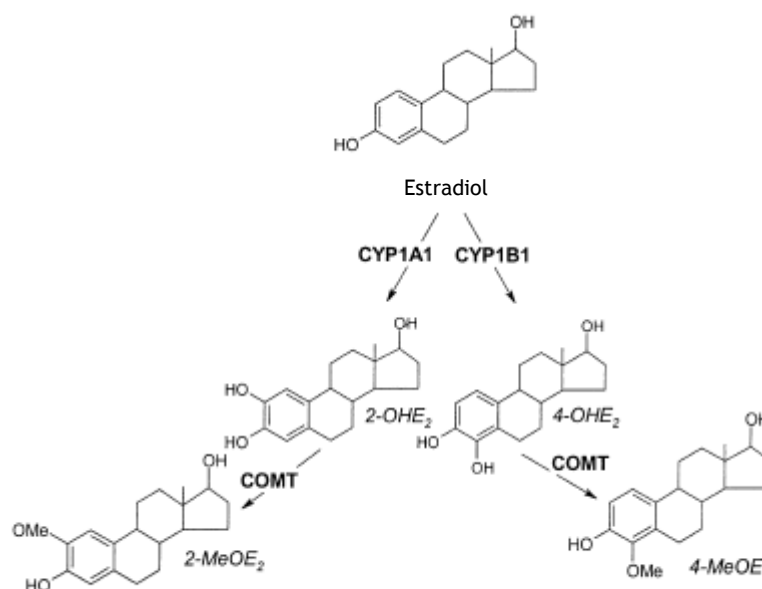


Figura 2 Metabolismo do estrogénio (Adaptado de Mitrunen and Hirvonen, 2003).

### 1.2 - Acções do estrogénio

Ao nível do sistema nervoso central, a aprendizagem e comportamento, a resposta ao stress, e a reprodução são influenciadas pela acção dos estrogénios. No osso, o estrogénio

através dos receptores presentes nos osteoblastos prolonga o seu tempo de vida evitando a reabsorção óssea em mulheres pré-menopausicas (Imai et al., 2010). Por outro lado, o estrogénio tem um efeito protector no desenvolvimento e progressão da arteriosclerose, um efeito potencialmente benéfico que pode contribuir para o risco relativamente baixo de doenças cardiovasculares em mulheres pré-menopausicas comparadas com os homens da mesma faixa etária (Meyer and Barton, 2009). Foi também descrita a protecção vascular pelo estrogénio em caso de isquémia/reperfusão após lesão cardíaca (Deschamps et al., 2010). Esta protecção é exercida através da activação induzida por estrogénio da óxido nítrico sintetase endotelial (Deschamps et al., 2010). O óxido nítrico libertado pela óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) é um vasodilatador potente que regula a pressão arterial e inibe a adesão e agregação plaquetar e leucocitária (Meyer et al., 2009).

### 1.2.1 - Receptores de estrogénio

As respostas celulares a hormonas, incluindo o estrogénio, são mediadas por receptores que iniciam eventos celulares após ligação da hormona (Prossnitz et al., 2008). Os efeitos biológicos dos estrogénios são mediados por três receptores de estrogénio: o receptor de estrogénio alfa (ER $\alpha$ ) o receptor de estrogénio beta (ER $\beta$ ) e o receptor de estrogénio acoplado à proteína G (GPR30).

O gene ER $\alpha$  está localizado no braço longo do cromossoma 6, locus 25.1, estendendo-se mais de 140 kilobases, dividido em oito exões (Ponglikitmongkol et al, 1988). O cADN do receptor de estrogénio é constituído por uma sequência de 1,785 nucleótidos que codifica uma proteína de 595 aminoácidos com um peso molecular de 66,182kD (Shao and Brown, 2004).

O gene ER $\beta$  encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 14, locus 23.2, dividido em oito exões, com um peso molecular de 61.2 kb que codifica uma proteína de 530 aminoácidos (Lurie et al., 2011).

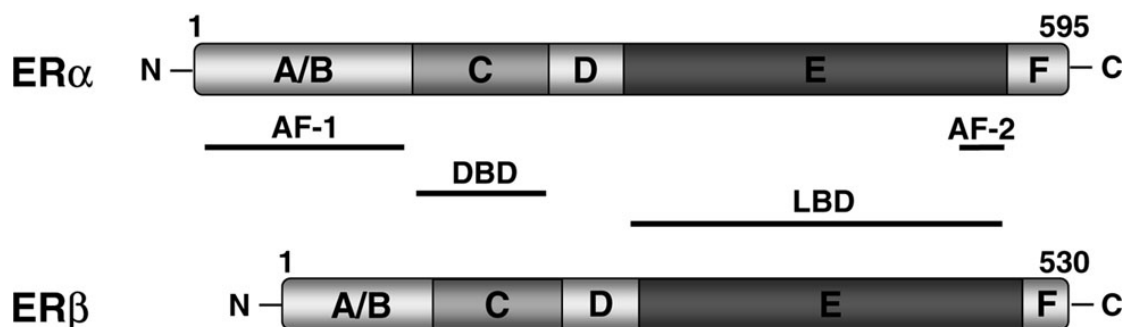
O GPR30 localiza-se no braço curto do cromossoma 7, locus 22.3, dividido em três exões, com um peso molecular de aproximadamente 41 kDa que origina uma proteína composta por 375 aminoácidos (Mizukami, 2010).

### 1.2.2 - Domínios estruturais dos receptores de estrogénio

O receptor de estrogénio alfa e o receptor de estrogénio beta são ambos membros da superfamília de receptores nucleares e tal como outros membros desta superfamília são



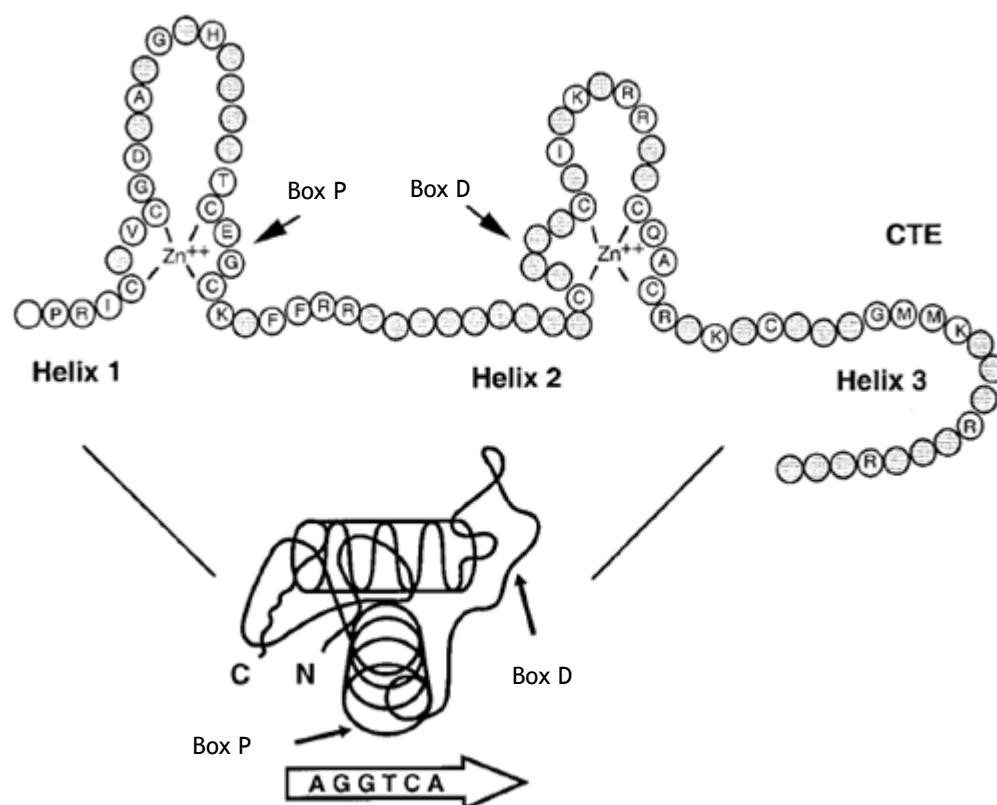
constituídos por 6 regiões de homologia variável denominadas de A a F (Figura 3) (Marino and Ascenzi, 2006).



**Figura 3** Estrutura do receptor de estrogénio alfa e receptor de estrogénio beta. DBD - Domínio de ligação ao ADN; LBD - Domínio de ligação à hormona. (Adaptado de Shao and Brown, 2004)

A região N terminal (domínios A e B) das proteínas ERα e ERβ contém o local AF1 (função de activação transcripcional 1) (Nilsson and Gustafsson, 2011). O local AF1 é essencial para a interacção com proteínas co-reguladoras e contribui para a activação do receptor independente de hormona (Nilsson and Gustafsson, 2011). O domínio A/B contém aminoácidos que são alvo para modificações translacionais por quinases, que por sua vez estimulam a actividade da AF-1 (Nilsson and Gustafsson, 2011).

A região C corresponde ao domínio de ligação ao ADN (DBD) (Marino and Ascenzi, 2006). A nível molecular, a região C dos receptores nucleares é constituída por duas alças denominadas “dedos de zinco”, que contem 60-70 aminoácidos e uma região terminal COOH (CTE) (Figura 4) (Aranda and Pascual, 2001). Em cada dedo de zinco quatro cisteínas coordenam tetraedricamente um ião de zinco (Aranda and Pascual, 2001). Os aminoácidos requeridos para a discriminação do ADN estão presentes na base do primeiro dedo de zinco, numa região denominada box P (Aranda and Pascual, 2001). Os aminoácidos do segundo dedo de zinco formam a box D e estão envolvidos na dimerização do receptor (Figura 4) (Aranda and Pascual, 2001). O domínio de ligação ao ADN é necessário para a ligação dos receptores de estrogénio ao ADN e regular a transcrição de genes alvo (Nilsson and Gustafsson, 2011).



**Figura 4** Domínio de ligação ao ADN da família de receptores nucleares (Adaptado de Aranda and Pascual, 2001)

O domínio E corresponde ao domínio de ligação à hormona (LBD), estando a AF2 (função de ativação 2) localizada neste (Marino and Ascenzi, 2006). O domínio funcional AF2 está incluído numa hélix anfipática (H12) e é essencial para a actividade transcripcional ligando-dependente (Aranda and Pascual, 2001). O domínio de ligação à hormona (região E) para além de estar envolvido na ligação de estrogénio, medeia a homodimerização, interacção com proteínas de choque térmico e participa na actividade transcripcional ligando-dependente (Nilsson and Gustafsson, 2010).

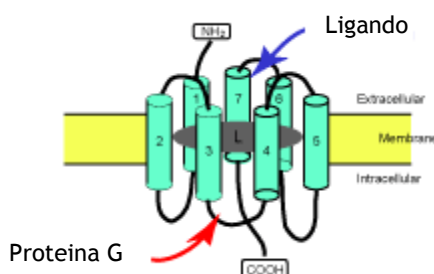
A região de dobradiça (região D) encontra-se compreendida entre o domínio C e o domínio E, permitindo a rotação do domínio de ligação ao ADN (Nilsson and Gustafsson, 2010). O domínio D contém resíduos cuja mutação anula a interacção com co-reguladores (Nilsson and Gustafsson, 2010).

A região F contém o domínio de ligação ao estrogénio e o domínio de transactivação ligando-dependente, incluindo o local de ligação de cofactores que são recrutados quando o ER fica activado (Zwart et al., 2010).

O GPR30, também denominado de GPER, é um membro da família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) que contém 7 segmentos transmembranares que transmitem sinais por interacção com proteínas G heterotriméricas (Figura 5) (Prossnitz and Maggiolini,

2009). Alguns autores defendem que o GPR30 se localiza no retículo endoplasmático, no aparelho de Golgi mas também na membrana plasmática (Mizukami et al., 2010).

O GPR30 contém uma região C-terminal intracelular com 47 aminoácidos, uma sequência envolvida na transdução de sinal no loop 2 intracelular (Thomas et al., 2005), um segundo loop extracelular com 10 aminoácidos (Thomas et al., 2005), duas cisteínas nos primeiros dois loops extracelulares que podem formar ligações dissulfido que ajuda a estabilizar a estrutura (Mizukami et al., 2010) e uma porção N-terminal extracelular com 57 aminoácidos contendo resíduos de ácido aspártico que podem ser modificados por glicosilação se o GPR30 se localiza na membrana plasmática (Mizukami et al., 2010). Pensa-se que a hormona se associa com o domínio N-terminal para activar o receptor (Mizukami et al., 2010). A proteína G trimérica liga-se ao terceiro loop do domínio intracelular (Mizukami et al., 2010).

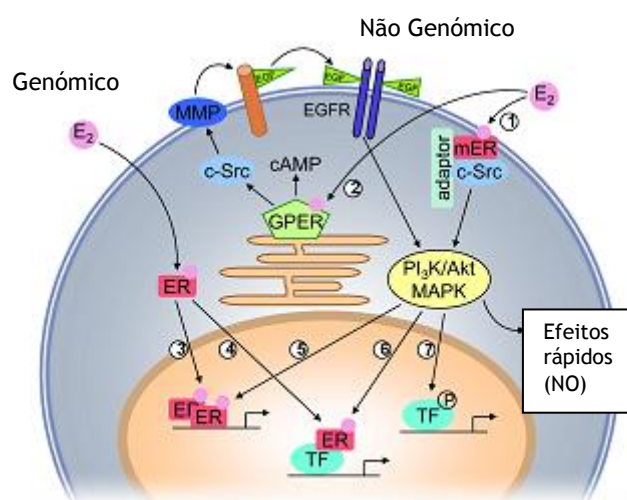


**Figura 5** Estrutura geral de um receptor acoplado à proteína G contendo sete segmentos transmembranais (adaptado de Chien et al., 2010)

### 1.2.3 - Mecanismos de acção dos receptores de estrogénio

Tradicionalmente, as respostas celulares aos compostos estrogénios têm sido consideradas como sendo mediadas por dois receptores de estrogénio nucleares  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER $\beta$ ), conhecida por sinalização mediada por estrogénios “genómica” (Figura 6 - (3)) (Meyer et al., 2009). Ambos os receptores funcionam como factores de transcrição activados por ligando que se localizam no citoplasma inactivados e associados a proteínas de choque térmico (Hsp) (por exemplo, Hsp90, Hsp70 e Hsp56) (Powell et al., 2010). Após ligação da hormona, as Hsp dissociam e os receptores são translocados para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes. A dissociação da Hsp90 leva à dimerização do receptor com formação de um homodímero ou heterodímero (ER $\alpha$ -ER $\alpha$ ; ER $\beta$ -ER $\alpha$ ; ER $\beta$ -ER $\beta$ ) de ER estável (Powell et al., 2010). Num segundo passo ocorre interacção com moléculas co-reguladoras (co-activadoras ou co-repressoras) (Powell et al., 2010; Zárate and Seilicovich, 2010). O dímero de ER activado interage com os elementos de resposta a estrogénio (ERE) (Powell et al., 2010). Os ERE são pequenas sequências de ADN no promotor de um gene específico que é

capaz de ligar ao dímero de ER e desta forma regula a transcrição. Por último o complexo ER-ERE promove a formação de um complexo de pré-iniciação de transcrição e facilita a disrupção da cromatina nos ERE; finalmente a ARN polimerase II e o resto da maquinaria de transcrição reúne-se ao promotor e o gene é transcrito. Dependendo da célula e do co-regulador, o receptor ligado ao ADN exerce um efeito positivo ou negativo na expressão do gene alvo (Barone et al., 2010).



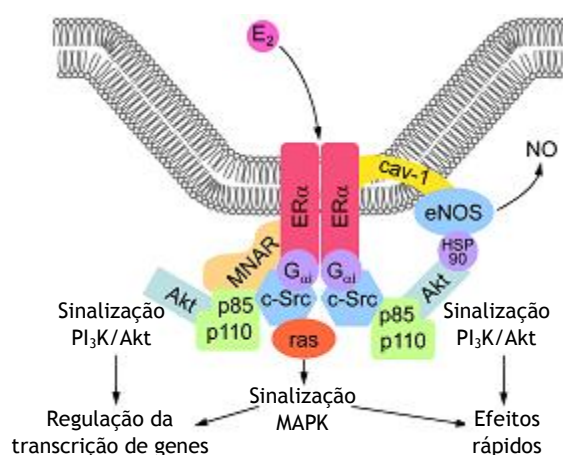
**Figura 6** Sinalização do receptor de estrogénio “genómica” e “não genómica” (adaptado de Meyer et al., 2009)

No entanto, o estrogénio também se pode ligar ao receptor de estrogénio acoplado à proteína G, localizado no retículo endoplasmático (Figura 6 - (2)) (Meyer et al., 2009). O GPR30 activa efectores como a adenilato ciclase (o que resulta na produção de cAMP) e c-Src. O c-Src activa a matriz de metaloproteinases (MMP) que cliva o factor de crescimento epidérmico ligado à pró-heparina (EGF), libertando EGF que transactiva o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) (Meyer et al., 2009). A activação do EGFR origina vários eventos incluindo a activação da MAPK e PI3K (Meyer et al., 2009). Uma vez activado, as cascatas de MAPK e PI3K/Akt podem induzir ou efeitos rápidos ou influenciar a transcrição de genes (Meyer et al., 2009).

Por outro lado, o ER activado modula a função de outras classes de factores de transcrição (TF) através de interacção proteína-proteína (4) (Meyer et al., 2009). A actividade transcripcional pode ser aumentada por fosforilação (5), ou outros factores de transcrição podem ser activados e ou interagem directamente com o ER (6), ou ligam independentemente do ER (7) na região do promotor do gene alvo (Meyer et al., 2009).

Uma variedade de respostas celulares a concentrações fisiológicas de estrogénios ocorrem rapidamente entre alguns segundos e minutos, que portanto não podem ser mediadas por processos de transcrição e síntese proteica (Figura 6 - (1); Figura 7) (Meyer et

al., 2009). Os efeitos rápidos mediados por estrogénio são transmitidos por via enzimática ou canais iónicos através da activação receptores de estrogénio acoplados à membrana (mER) e são referidos como “não genómicos” (Meyer et al., 2009). A interacção directa da proteína G, G<sub>ai</sub>, com o ER é essencial para activação do c-Src e representa o passo inicial na sinalização celular rápida mediada por mER (Meyer et al., 2009). O modelador da actividade não genómica do receptor de estrogénio (MNAR) promove a formação de um complexo com ER, c-Src e p85 (a subunidade regulatória da PI3K) (retratado como subunidade p85 e p110), e portanto facilitando a sinalização da via da PI3K/Akt (Meyer et al., 2009). Alternativamente a c-Src activa a GTPase p21ras (ras) monomérica que é capaz de recrutar quinases da via da proteína quinase activada mitogenio (MAPK) (Meyer et al., 2009). Uma vez activado o mER tanto as vias PI3K/Akt como a MAPK podem modular a transcrição de genes (Meyer et al., 2009).



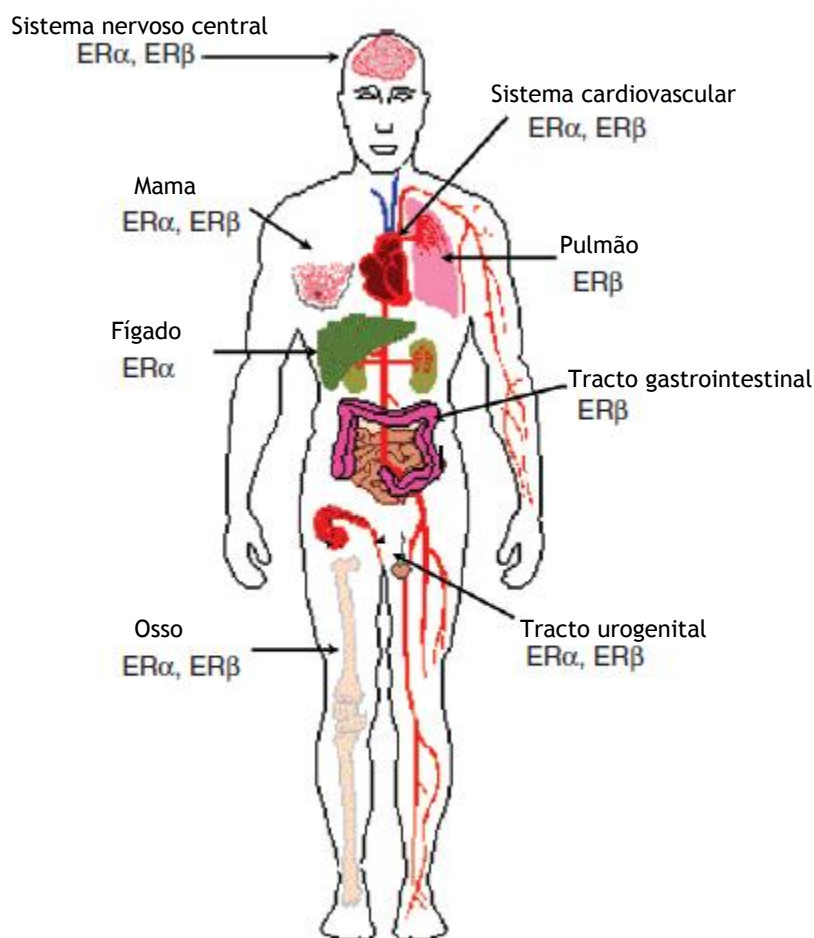
**Figura 7** Mecanismo “não genómico” da proteína ERα na membrana plasmática (adaptado de Meyer et al., 2009)

### 1.3 - Receptores de estrogénio alfa vs. Receptores de estrogénio beta

As proteínas ERα e o ERβ exercem diferentes efeitos na organização, crescimento e diferenciação de vários tecidos (Zwart et al., 2010).

Em alguns órgãos os níveis de expressão do gene ERα e ERβ são similares, no entanto, estes níveis podem variar entre células do mesmo órgão ou tecidos diferentes e, noutros locais um dos subtipos de ER pode dominar (Nilsson and Gustafsson, 2011). O gene ERα é expresso predominantemente no útero, estroma da próstata, células da teca dos ovários, células de Leydig dos testículos, epidídimo, osso, tecido mamário, fígado, rins, tecido adiposo branco e varias regiões do cérebro (Figura 8) (Nilsson and Gustafsson, 2011). O gene ERβ expressa-se predominantemente no sistema imunitário (Deroo and Buensuceso, 2010), cólon,

epitélio da próstata, testículos, células da granulosa dos ovários, medula óssea, glândulas salivares, endotélio vascular, pulmões, bexiga certas regiões do cérebro (Figura 8) (Nilsson and Gustafsson, 2011).



**Figura 8** Localização dos dois subtipos “clássicos” de receptores de estrogénio (Adaptado de Nilsson and Gustafsson, 2011)

As proteínas ER $\alpha$  e ER $\beta$  diferem na transactivação mediada pelo estradiol, devido a uma constituição de aminoácidos diferente e/ou diferentes interações com os vários domínios do receptor como já foi referido (1.2.2) (Zwart et al., 2010).

Deste modo, o ER $\beta$  difere significativamente do ER $\alpha$  na região N-terminal (18% de homologia), na região de dobradiça (30% de homologia), nos domínios de ligação à hormona (59% de homologia) e domínio F na região C-terminal (18% de homologia), sendo estas diferenças responsáveis por diferenças nas actividades transcricionais (Shao and Brown, 2003; Zwart et al., 2010).

Segundo o artigo de revisão de Aranda and Pascual de 2001, a região A/B dos receptores nucleares tem actividade de promotor e é específica para a célula o que pode contribuir para a especificidade de acção entre as isoformas do receptor (revisão de Aranda and Pascual, 2001). O domínio AF1 do ER $\alpha$  tem a capacidade de interagir com o co-activador SRC-1 (Zwart et al., 2010). Esta ligação, em combinação com a região de dobradiça do ER $\alpha$ , é

responsável pela transactivação pelo estrogénio e pela transactivação ligando-independente. Ambas as funções não se encontram no ER $\beta$  o que reflecte uma diferença na região AF-1 que afecta a resposta a ligandos (Zwart et al., 2010).

A activação transcripcional pelo ER $\alpha$  é mediada pela acção sinérgica entre as duas funções de activação distintas, mas apesar de a AF-1 ser constitutivamente activa é em geral mais fraca que a actividade da AF-2. Em contraste, a proteína ER $\beta$  parece não ter actividade significativa da AF-1 e portanto depende inteiramente da actividade ligando-dependente da AF-2 (Zwart et al., 2010).

A região de dobradiça do ER sofre modificações pós-translacionais que afectam a estabilidade e actividade do receptor, portanto alterações tanto na composição como no comprimento do domínio D afectam a capacidade de transcrição (Zwart et al., 2010). Por exemplo os resíduos na região de dobradiça entre K299 e S305 sofrem acetilação, ubiquilação, metilação e fosforilação (Zwart et al., 2010). Estas modificações são interdependentes e podem afectar a activação final do ER $\alpha$  (Barone et al., 2010). Estas sequências e possíveis modificações e modulações do receptor estão ausentes na região de dobradiça do ER $\beta$  uma vez que esta região é consideravelmente mais curta que no ER $\alpha$  (Zwart et al., 2010).

Por outro lado, a região C, ou domínio de ligação ao ADN, das proteínas ER $\alpha$  e ER $\beta$  é idêntica (96% de homologia) e, deste modo, ambos os receptores são capazes de se ligar a elementos de resposta a estrogénio com especificidade e afinidade semelhantes (Nilsson and Gustafsson, 2000). Embora os dois subtipos de ER possam interagir com os mesmos elementos de resposta a estrogénio, seja como homodímeros ou heterodímeros (Grober et al., 2011), o ER $\beta$  liga-se com menor afinidade ao ERE em comparação com o ER $\alpha$  (Deroo and Buensuceso, 2010). Por outro lado, quando se liga ao ERE, o ER $\beta$  sofre alterações conformacionais específicas para cada ERE, resultando em recrutamento diferencial de co-activadores (Grober et al., 2011; Deroo and Buensuceso, 2010). Portanto, a menor afinidade e as alterações conformacionais dependentes de ERE, podem contribuir para diferenças na actividade transcripcional dos dois subtipos de receptores de estrogénio (Deroo and Buensuceso, 2010). Por exemplo, embora o tamoxifeno (fármaco modulador dos receptores de estrogénio) seja um agonista parcial no ER $\alpha$ , age como antagonista no ER $\beta$ . No entanto, o raloxifeno (fármaco modulador dos receptores de estrogénio) actua como um agonista selectivo do ER $\beta$  (Deroo and Buensuceso, 2010).

Hall et al., 2001 propôs que o ER $\beta$  pode inibir a actividade transcripcional do ER $\alpha$  nas células onde ambos sejam expressos, e que a resposta ao estrogénio depende do ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  (artigo de revisão de Hall et al., 2001). Recentemente tem sido destacado um papel importante na diferente acção estrogénica entre o ER $\alpha$  e o ER $\beta$  nos cancros da mama. Apesar de o ER $\alpha$  ser predominantemente expresso nos carcinomas da mama, a maioria destes cancros também expressa ER $\beta$  (Grober et al., 2011). Pensa-se que a expressão de ER $\beta$  altera a expressão de ER $\alpha$  em tecidos onde ambos são expressos (Grober et al., 2011). Os níveis de ER $\beta$  diminuem durante a progressão de muitos tipos de tumor e o ER $\beta$  tem sido descrito como um supressor de tumor (Grober et al., 2011). Em contraste, a proteína ER $\alpha$  tem sido associada

com a promoção da proliferação, resultando em crescimento e progressão de tumores (Grober et al., 2011).

## 1.4- Receptores de estrogénio alfa

### 1.4.1 - Importância da fosforilação e acetilação dos receptores de estrogénio

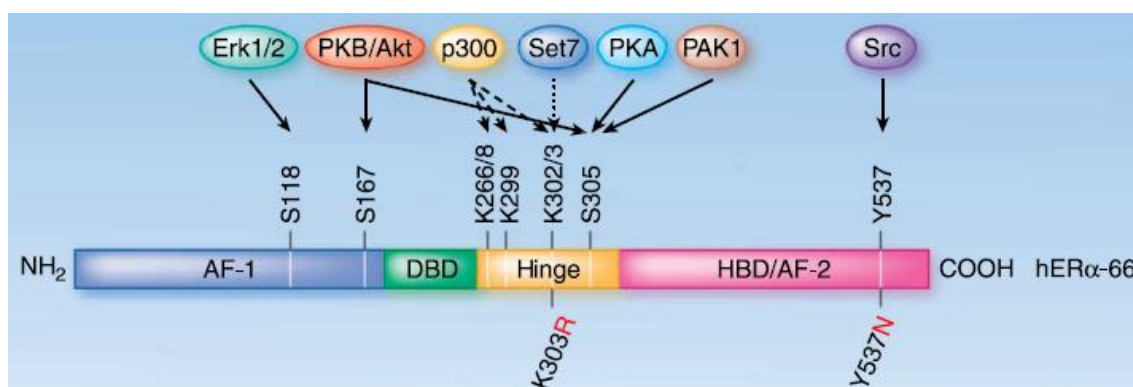
Segundo o artigo de revisão de Barone et al.,2010, a fosforilação dos ER por segundos mensageiros tem elevada relevância devido à sua participação na acção do receptor. Entre as quinases que podem fosforilar o ER $\alpha$  existem moléculas como a Akt, a quinase regulada extracelular (Erk) 1/2, a MAPK, p21-quinase activada 1 (PAK-1), e a proteína quinase A (PKA), resultando em várias respostas a ligandos (Figura 9) (Barone et al.,2010). Por exemplo a fosforilação da serina (S) 167 pela Akt e S118 pela Erk1/2 pode resultar em resistência adquirida ao anti-estrogénio tamoxifeno e activação do ER $\alpha$  ligando-dependente (Barone et al.,2010). Fosforilação da S305, que é mediada pelo sinal da PKA e PAK-1, pode alterar a sensibilidade ao estrogénio e a resposta ao tamoxifeno (Barone et al.,2010). Estes eventos são bastante complexos e actuam de forma interdependente (Barone et al.,2010). Por exemplo, a fosforilação da S305 pode regular a fosforilação subsequente da S118, e a acetilação do receptor (Barone et al.,2010).

A região de dobradiça é um domínio multifuncional que se liga a varias proteínas co-regulatórias e participa na ligação do ADN ao receptor de estrogénio (Barone et al.,2010). Os resíduos de lisina K266, K268, K299, K302, e K303 dentro do domínio D podem ser acetilados pela proteína histona acetilase p300 (Figura 9) (Barone et al.,2010). A acetilação da K266 e K268 induz a activação da ligação dependente do ADN e do ligando, enquanto a acetilação da K302 e K303 inibe a activação do ER $\alpha$ (Barone et al.,2010). A fosforilação do ER $\alpha$  S305 regula a acetilação do K302/303, sensibilizando o ER $\alpha$  para a estimulação do ligando(Barone et al.,2010). O ER $\alpha$  K302 é também metilado pela SET7 metiltransferase (Figura 9); esta metilação estabiliza o receptor e é necessária para o recrutamento dos genes alvos e subsequente transcrição (Barone et al.,2010). Acetilação da K303 diminui a transcrição, não apenas por antagonismo via acetilação mas também inibição da metilação da K302 e, subsequente destabilização do receptor (Barone et al.,2010). Outras modificações, como a ubiquitinação da K302 e sumoilação da K266 e K268, também afectam a estabilidade e actividade do ER $\alpha$  (Barone et al.,2010).

O estrogénio afecta a velocidade de *turnover* e modula a transcrição de genes alvo do ER $\alpha$  (Kocanova et al., 2010). Foi mostrado que a degradação do ER induzida pelo estrogénio é necessária para activar a transcrição rapidamente (Kocanova et al., 2010). Os níveis



intracelulares de ER $\alpha$  são sub-regulados na presença de estrogénio, através da via ubiquitina/proteossoma (Ub/26S)(Kocanova et al., 2010). A poliubiquitinação é catalisada por pelo menos três enzimas: a enzima E1 activada por ubiquitina, a ubiquitina activada é conjugada pela E2 com resíduos de lisina através de uma ligação isopeptídica catalisada pela E3 ubiquitina ligase (Kocanova et al., 2010). O ER $\alpha$  poliubiquitinado é direccionado para o proteossoma para degradação (Kocanova et al., 2010).



**Figura 9** Representação de domínios estruturais e locais de modificações pós-translacionais (Adaptado de Barone et al., 2010)

#### 1.4.2 - Co-reguladores: co-activadores e co-supressores

Segundo os investigadores de Zárate and Seilicovich, 2010 a activação do receptor pelo estradiol requer uma alteração conformacional no domínio de ligação à hormona que inclui a formação de uma bolsa hidrofóbica e modificação da superfície para facilitar a interacção com proteínas co-regulatórias que podem potenciar ou suprimir a actividade transcripcional.

Na ausência de ligandos activadores a transcrição pelos receptores de estrogénio é reprimida pela presença de proteínas co-supressoras, que existem em complexos de multiproteínas contendo enzimas como as histonas deacetilases, responsáveis por suprimirem a transcrição (Zárate and Seilicovich, 2010). Os co-repressores são libertados através de alterações na conformação e dinâmica do domínio de ligação ao estrogénio, o que favorece o recrutamento de co-activadores (Zárate and Seilicovich, 2010). Os co-supressores e co-activadores ligam-se em locais sobrepostos na proteína do ER pelo que a sua ligação é mutualmente exclusiva (Santos et al., 2011).

Os co-activadores como o co-activador do receptor de esteróide-1 (SRC-1), SRC-2 e SRC-3 aumentam a transcrição mediada por ER $\alpha$  através da actividade da histona acetiltransferase e recrutamento de outros co-activadores, incluindo a proteína de ligação-CREB (CBP) e p300/factor associado-CBP (Zárate and Seilicovich, 2010).

Os co-repressores actuam por metilação do ADN e por ligação a proteínas de ligação-metil-CpG que recrutam complexos co-repressores e a histona deacetilase (Zárate and Seilicovich, 2010). A capacidade dos ER para recrutar diferentes co-reguladores pode explicar diferentes respostas em diferentes células (Zárate and Seilicovich, 2010).

## 1.5 - Papel funcional dos receptores de estrogénio. Relação com algumas doenças e fisiologia celular

Os receptores estão associados ao risco, prognóstico e resposta terapêutica de diversas patologias como a hiperplasia benigna da próstata (HBP) e cancro da próstata, doença de Alzheimer, diabetes, osteoporose, doenças cardiovasculares e cancro da mama.

A evidência aponta para que haja uma acumulação de estradiol no núcleo das células do estroma na hiperplasia benigna da próstata, sugerindo que a elevação da expressão de ER $\alpha$  pode estar associada com a etiologia da HBP (Prins and Korach, 2008). No carcinoma da próstata o gene ER $\alpha$  está metilado, ocorrendo um silenciamento do gene, perda da transcrição de ER $\alpha$  e da formação de proteína ER $\alpha$  (Prins and Korach, 2008). O grau de metilação do ER $\alpha$  e o silenciamento do gene aumenta com a progressão da doença de HBP para cancro da próstata (Prins and Korach, 2008).

Os níveis de estradiol nas mulheres com doença de Alzheimer são consideravelmente mais baixos em comparação com pessoas saudáveis da mesma idade (Pike et al., 2009). Uma vez que a apoptose neural é causada pela neurotoxidade da proteína  $\beta$ -amilóide, a regulação da apoptose pelo estrogénio é o mecanismo chave para a protecção contra a proteína  $\beta$ -amilóide (Pike et al., 2009). Por outro lado, o estrogénio tem sido implicado na regulação dos membros da família Bcl-2 nos neurónios, que contêm membros responsáveis pela sobrevivência das células e membros que promovem a apoptose (Pike et al., 2009).

Os estrogénios têm efeitos directos nas culturas de ilhotas de Langerhans, por produzirem insulina e aumentarem a sobrevivência das células (Liu and Mauvais-Jarvis, 2009). Estudos comprovam que o estradiol aumenta o conteúdo e secreção de insulina nas células  $\beta$ , e tem um papel no aumento da sobrevivência das ilhotas de Langerhans (Liu and Mauvais-Jarvis, 2009). O estrogénio protege também contra o *stress* oxidativo e a apoptose pró-inflamatória induzida por citocinas (Liu and Mauvais-Jarvis, 2009).

Uma vez que as citocinas são potentes indutores da osteoclastogénese do osso *in vitro*, várias citocinas expressas em tecidos extra-ósseo têm sido estudadas na sua relação com a osteoclastogénese (Imai et al., 2010). A deficiência de estrogénio activa as respostas imunes adaptativas levando à estimulação da produção de IL-7 e IGF-1 pelas células T ósseas que posteriormente induz a secreção de interferão- $\gamma$  (Imai et al., 2010). O interferão- $\gamma$  tem

acção osteoclastogénica em conjugação com o NF- $\kappa$ B e o factor de necrose tumoral (TNF) (Imai et al., 2010).

As duas isoformas “clássicas” do ER, o ER $\alpha$  e o ER $\beta$ , são encontradas em miócitos cardíacos tanto em neonatos como em adultos (Bhupathy et al. 2010). Por outro lado, está também descrito a presença de receptor de estrogénio acoplado à proteína G (GPR30) em cardiomiócitos adultos (Deschamps et al., 2010). Num estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, o tratamento agudo com estradiol reduz a apoptose dos cardiomiócitos e protege os miócitos através da activação da via de sinalização da PI3K/Akt (Bhupathy et al. 2010). Noutro estudo foi descoberta uma interacção directa proteína-proteína entre o ER $\alpha$  activado após ligação com a hormona e a subunidade regulatória p85 do PI3K nas células endoteliais através de mecanismos não genómicos nos quais o estradiol activa a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) via activação do PI3K/Akt (Deschamps et al., 2010).

### 1.5.1 - Cancro da mama

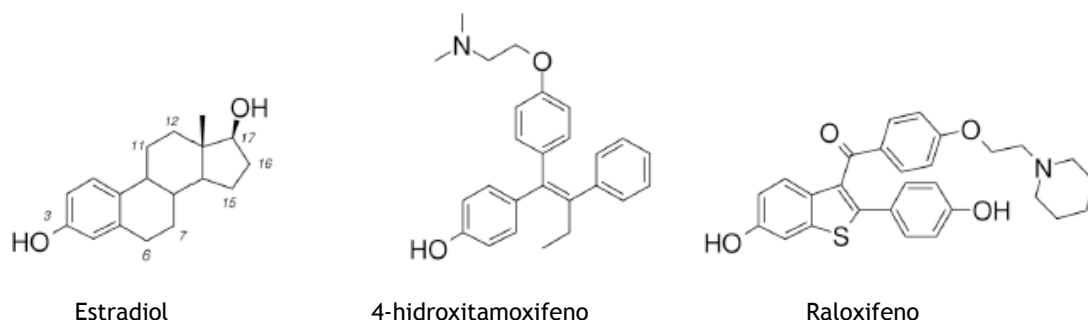
Para além do seu papel na fisiologia do tecido mamário, os estrogénios estão associados com o desenvolvimento e progressão do cancro da mama (artigo de revisão Kok and Linn, 2010). Aproximadamente 75% dos cancros da mama expressam receptores de estrogénio, ou seja, são ER-positivos (artigo de revisão Kok and Linn, 2010). Foi demonstrado que existe uma relação entre a expressão de genes dependentes de estrogénio nos carcinomas ER positivos e os níveis basais de estradiol no plasma, sugerindo que diferenças nos níveis plasmáticos de estradiol entre doentes têm influência significativa no comportamento dos carcinomas da mama (artigo de revisão Kok and Linn, 2010).

Os estudos de perfil epigenético revelaram que a estrutura da cromatina e as marcas epigenéticas estão correlacionadas com o estado transcripcional (artigo de revisão Welboren et al., 2009). As marcas epigenéticas como acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação são adicionadas e removidas por complexos co-regulatórios de uma forma ordenada e combinada. Por exemplo, a hipermetilação na arginina 260 de ER $\alpha$  está associada a cancro da mama em 55% dos carcinomas, enquanto a arginina fracamente metilada está associada células epiteliais normais (Poulard et al. 2010). Uma mutação somática no gene ER $\alpha$ , que origina uma substituição de uma lisina 303 por uma arginina, está presente em 50% dos casos e está associada com mau prognóstico (Poulard et al. 2010). Por outro lado, apesar da fosforilação do S118 e S167 estar associada a parâmetros como a via de sinalização dependente de estrogénio intacta e melhor resposta ao tratamento com tamoxifeno, está também associada com varias quinases como MAPK/ERK1/2, p90RSK e AKT, que por sua vez estão associadas a um pior prognóstico em doentes com cancro da mama tratados com tamoxifeno. Existe uma relação entre a fosforilação da S305 e a expressão nuclear de PAK1,

que associado ao co-activador SCR-1 pode induzir um fenómeno de resistência ao tamoxifeno (Poulard et al. 2010). Recentemente, a fosforilação da S305 tem mostrado resultados promissores a nível de diagnóstico, uma vez que a detecção de S305 poderá estar associada a características de tumores mais agressivos (artigo de revisão de Murphy et al., 2011). Por outro lado, a fosforilação da S305 também está associada a cancro de tamanho mais pequeno (artigo de revisão de Murphy et al., 2011).

#### 1.5.1.1 - Terapêutica do cancro da mama: SERMs e SERDs

As acções do estrogénio são antagonizadas pelos anti-estrogénios, que se ligam competitivamente ao receptor de estrogénio (ER) e inibem a transcrição de genes (Katzenellenbogen, 1991). As estruturas de alguns estrogénios e anti-estrogénios encontram-se na figura 10. Desde há muito tempo que se identificaram os anti-estrogénios como particularmente importantes devido à sua eficácia em suprimir a proliferação e metástase de células dependentes de estrogénio, como o tecido cancerígeno mamário (Katzenellenbogen, 1996).



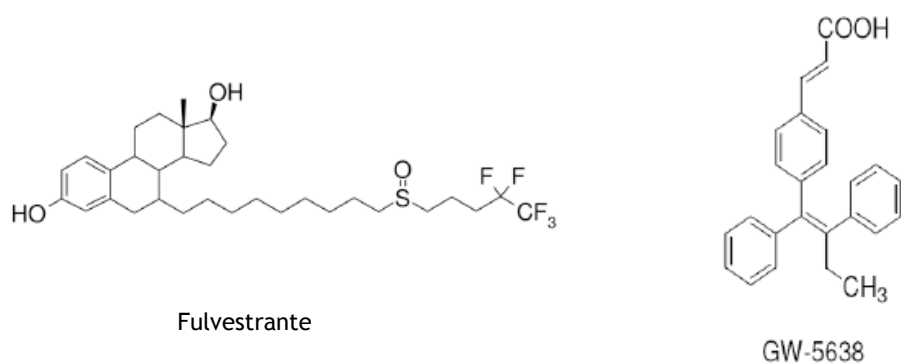
**Figura 10** Estruturas do estradiol e dois anti-estrogénios que são capazes de se ligar ao ER (Adaptado de Kieser et al., 2010)

Os anti-estrogénios tamoxifeno e raloxifeno pertencem ao grupo dos moduladores selectivos dos receptores de estrogénio (SERMs) e inibe a transactivação mediada por ER $\alpha$  através da manutenção da conformação do ER $\alpha$  de modo a que o local que interage com o cofactor SRC-1 seja coberto pela hélix 12 do domínio de ligação à hormona (Zwart et al, 2010). No entanto, o tamoxifeno também tem fraca actividade agonista. Este comportamento agonista pode ser potenciado pela fosforilação da serina 305 na região de dobradiça pela PKA (Zwart et al., 2010).

No entanto muitos tumores têm resistência adquirida ao tamoxifeno ou desenvolvem resistência durante ou após a terapêutica com tamoxifeno (Murphy et al., 2011). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência incluem: múltiplos receptores de

estrogénio ou variantes genéticas destes, múltiplas localizações subcelulares, vários co-activadores e co-repressores, modificações pós-translacionais ou sinalização por outras vias (Murphy et al., 2011). Os GPR30 têm sido associados à resistência ao tamoxifeno uma vez que se encontra sobre-regulado durante a progressão para cancro (Murphy et al., 2011). O mecanismo está associado a quinases activadas pelo GPR30 que são capazes de fosforilar e alterar a actividade do ER $\alpha$  independente do ligando (Murphy et al., 2011).

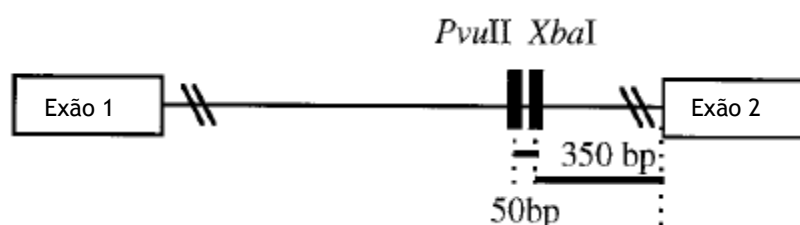
Os sub-reguladores selectivos dos receptores de estrogénio (SERDs) são uma nova classe de compostos capazes de regular o nível e a actividade do receptor de estrogénio (Kieser et al., 2010). Estes compostos apresentam mecanismos de acção distintos dos ligandos de receptores de estrogénio como o tamoxifeno ou o seu metabolito activo, 4-hidroxitamoxifeno, que actuam tanto como agonistas ou antagonistas dependendo do tecido alvo (Kieser et al., 2010). Apesar de certos SERMs serem clinicamente úteis em terapêuticas de substituição hormonal e prevenção e tratamento do cancro da mama há necessidade de novos ligando dos receptores de estrogénio que sejam capazes de superar a resistência endócrina adquirida no cancro da mama (Kieser et al., 2010). O ICI 182,780 também conhecido por fulvestrante, tem maior actividade antagonista que os SERMs e é capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas resistentes ao tamoxifeno (Kieser et al., 2010). Os SERDs são utilizados principalmente para o tratamento de cancro da mama metastático e a sua actividade clínica pensa-se que deriva da capacidade para sub-regular a proteína ER assim como bloquear a acção do ER (Kieser et al., 2010). O fulvestrante tem fraca biodisponibilidade oral e a pesquisa por novos fármacos originou a descoberta do composto GW-5638 (Kieser et al., 2010). Este composto é agonista no osso mas actua como antagonista na mama e pode inibir o crescimento de tumores resistentes ao tamoxifeno (Kieser et al., 2010).



**Figura 11** Estrutura química de dois SERDs (Adaptado de Kieser et al., 2010)

## 1.6 - Polimorfismos dos receptores de estrogénio alfa: PvuII e XbaI

Foram identificados diversas alterações na sequência do gene de ER $\alpha$  e inúmeros polimorfismos de nucleótido único (SNPs) associados a um aumento ou diminuição de risco de algumas doenças. Dentre estes, os SNPs melhores caracterizados do gene ER $\alpha$  foram os polimorfismos PvuII e XbaI, ambos localizados no intrão 1 do gene ER $\alpha$ , a -397 e -351 pares de bases acima do exão 2, numa região do gene aparentemente não funcional (Figura 12) (Jakimiuk et al., 2007).



**Figura 12** Localização dos polimorfismos PvuII e XbaI no receptor de estrogénio alfa (Adaptado de Han et al., 1997)

Estes polimorfismos são comumente designados pelos nomes das enzimas de restrição que os detectaram, PvuII e XbaI, ou pelos números de referência ID rs2234693 e rs9340799. O polimorfismo PvuII é determinado por uma substituição do nucleótido timina por citosina (T $\rightarrow$ C) e o polimorfismo XbaI por uma substituição do nucleótido de adenina por guanina (A $\rightarrow$ G) (Yoon et al., 2010). Deste modo o genótipo TT e AA representam o genótipo *wild-type* para o polimorfismo PvuII e XbaI, respectivamente, e CC e GG representam o genótipo *variante* dos polimorfismos PvuII e XbaI, respectivamente. O genótipo TC e o genótipo AG são heterozigóticos para o polimorfismo PvuII e XbaI, respectivamente.

Estes polimorfismos estão relacionados com alteração da expressão do gene ER $\alpha$ , por alteração da ligação de factores de transcrição e influência no *splicing* diferencial do mRNA do gene ER $\alpha$  (Jakimiuk et al., 2007). O *splicing* alternativo do gene ER $\alpha$  origina uma transdução em proteínas estáveis com diferentes capacidades para ligar ao estrogénio, translocar para o núcleo e interagir com ADN (Jakimiuk et al., 2007). Estudos efectuados demonstram que estes polimorfismos estão relacionados com doenças como cancro da mama e da próstata, osteoporose, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares, como factores de protecção ou de risco (Jakimiuk et al., 2007).

O mecanismo molecular da influência destes polimorfismos no ER $\alpha$  ainda não é claro, embora Herrington et al., 2002 tenha descoberto uma associação entre o polimorfismo PvuII e uma redução dos níveis de selectina-E em mulheres após administração de terapêutica hormonal de substituição, que pode estar relacionado com uma possível elevação dos níveis de HDL. Neste estudo, revelam que a transição T $\rightarrow$ C, ou seja o alelo C, resulta num potencial local de ligação para factores de transcrição *myb*, que na presença de *B-myb*, é capaz de aumentar *in vitro* a transcrição de genes (Herrington et al., 2002). Sugere-se que em alguns casos, a presença do alelo C pode amplificar a transcrição de ER $\alpha$  e portanto o alelo C pode estar mais frequentemente associado a doenças relacionadas com estrogénio que envolvam a activação da proteína ER $\alpha$ .

Os polimorfismos XbaI e PvuII localizam-se numa região intrónica e aparentemente não funcional do gene, no entanto, por estarem apenas separados por 50 pares de bases, estão em desequilíbrio de *linkage* (Gennari et al., 2004). Os alelos A e T bem como os alelos G e C do polimorfismo XbaI e PvuII, respectivamente, estão fortemente associados entre si. No entanto, apesar de o haplotipo AC não ser observado na maioria dos estudos, o haplotipo TG é detectado, embora com uma frequência baixa, o que indica que o desequilíbrio não é completo (Gennari et al., 2004). Por outro lado, os dois polimorfismos podem estar em desequilíbrio de *linkage* com outros polimorfismos noutra região do gene ER $\alpha$  e também, embora menos provavelmente, noutro gene adjacente (Gennari et al., 2004). Becherini et al., 2000 constatou que os polimorfismos do intrão 1 estão em desequilíbrio de *linkage* com polimorfismos de repetição de dinucleótidos de tiamina-adenina (TA) na região do promotor do gene ER $\alpha$ .

### **1.6.1 - Papel funcional dos polimorfismos dos receptores de estrogénio alfa. Relação com a fisiologia celular e doença.**

A associação dos polimorfismos dos receptores de estrogénio alfa, PvuII e XbaI, com diversas patologias já há muito tem vindo a ser descrita. Vários estudos associaram um aumento, diminuição ou nenhum efeito de risco acrescido com a presença dos alelos mutados. As patologias estudadas incluem doenças cardiovasculares, osteoporose, patologias do sistema nervoso, adenomiose, endometriose e leiomioma, cancro da mama e cancro do endométrio.

Lussana et al., 2006 demonstraram existir uma associação entre a trombose venosa profunda e o genótipo TT e AA em homens caucasianos. Shearman et al., 2005 associou a variante CC com o aumento de risco de AVC em homens. Por outro lado, Koch et al., 2005 não encontraram associação entre enfarte do miocárdio e os polimorfismos XbaI e PvuII em homens ou mulheres caucasianos. Schuit et al., 2004 observaram um aumento do risco de

enfarte do miocárdio/isquémia em mulheres pós-menopausa que continham a variante alélica CC e GG do polimorfismo PvuII e Xbal, respectivamente. Alevizak et al., 2007 investigaram um possível efeito dos polimorfismos do gene ER $\alpha$  na severidade da doença coronária em mulheres pós-menopausa e associaram as variantes G e C dos polimorfismos Xbal e PvuII, com doença coronária mais severa. Lu et al., 2002 demonstraram que o genótipo GG do polimorfismo Xbal é um factor independente para predizer o risco de desenvolver uma doença coronária em doentes com hipercolesterolemia familiar.

Numerosos estudos têm tentado encontrar uma possível associação entre os polimorfismos do ER $\alpha$ , PvuII e Xbal, e o risco de desenvolver osteoporose (Gennari et al., 2004). Albagha et al., 2001 demonstraram existir uma correlação em mulheres caucasianas pós-menopausa entre a osteoporose e os polimorfismos Xbal e PvuII. Num estudo realizado numa amostra de mulheres da Bulgária (Ivanova et al., 2007) revelou que os polimorfismos Xbal e PvuII dos receptores de estrogénio estão associados com uma diminuição da densidade óssea. Noutro estudo realizado em mulheres mais velhas, os investigadores encontraram uma associação entre o haplotipo CG com redução da densidade óssea e aumento do risco de fractura (van Meurs et al., 2003). Em contraste, Ioannidis et al., 2004 revelou existir um papel protector do genótipo AA, em mulheres caucasianas, contra a diminuição da densidade óssea e o risco de fractura, sem aparente efeito do polimorfismo PvuII. Do mesmo modo, uma análise em mulheres caucasianas demonstrou uma associação entre o genótipo AA e TT e uma menor alteração da densidade óssea (Sowers et al., 2004). Segundo Liu et al., 2001, o genótipo CC e AA do gene ER $\alpha$  tem um papel protector para manter a densidade óssea em mulheres asiáticas. Por outro lado, um estudo efectuado numa população Italiana (Gennari et al., 1998) não foi encontrada associação, com resultados significativos, entre o genótipo PvuII e/ou Xbal e a densidade óssea ou remodelação do osso.

O estrogénio influencia as emoções e a aprendizagem humana e portanto os receptores de estrogénio podem modular a acção do estrogénio no cérebro. Segundo Weickert et al., 2008, o genótipo CC do polimorfismo PvuII do gene ER $\alpha$  está associado com diagnóstico de esquizofrenia numa população afro-americana em amostras de tecido cerebral *postmortem*. Kim et al., 2010 demonstraram que os polimorfismos do gene ER $\alpha$ , Xbal e PvuII, estão relacionados com a depressão em mulheres pós-menopausa. No entanto, Sand et al., 2002 não encontram nenhuma associação entre ataques de pânico e os polimorfismos Xbal e PvuII independente da existência de um diagnóstico adicional de agorafobia.

#### 1.6.1.1 - Adenomiose, endometriose e leiomioma

A endometriose é uma doença de origem multifactorial, relacionada com interacções complexas entre hormonas, processos inflamatórios, factores genéticos e ambientais



(Kennedy, 1998). A endometriose desenvolve-se principalmente em mulheres em idade reprodutiva e regride após a menopausa ou ovariectomia, o que sugere uma dependência de estrogénios para o seu crescimento (Kennedy, 1998). O leiomioma desenvolve-se também sob uma componente estrogénio-dependente e sob factores genéticos e ambientais (Urabe et al., 1990). A adenomiose partilha a patofisiologia do leiomioma e endometriose, uma vez que se desenvolve em mulheres em idade reprodutiva e o seu crescimento é estrogénio-dependente (Kitawaki et al., 2001).

Os genótipos de receptores de estrogénio determinam a função do sistema de hormonas esteróides não só ao nível do receptor mas também a nível da síntese hormonal (Zofkova et al., 2002). Estudos sugerem uma relação entre os polimorfismos do ER $\alpha$ , Xbal e PvuII, e uma predisposição para o desenvolvimento de endometriose e leiomioma (Hsieh et al. 2006). Kitawaki et al., 2001 demonstrou que as alterações genéticas do PvuII estão bastante correlacionadas com a susceptibilidade para a endometriose, com menor relação com o Xbal. Nesse estudo os autores observaram que a frequência do genótipo TT foi baixa em doentes com endometriose, adenomiose e leiomioma, embora tenha sido elevada em pessoas sem doença, sugerindo que o alelo T é protector contra a endometriose, adenomiose e leiomioma.

#### 1.6.1.2 - Cancro da mama

Os polimorfismos do receptor de estrogénio alfa, Xbal e PvuII, são possíveis factores de risco implicados na iniciação e desenvolvimento da via mutagénica do cancro da mama. No entanto, os resultados obtidos nos últimos anos são conflituosos e dependem de factores como a idade do doente no diagnóstico, o estado da menopausa e a etnia dos doentes.

Ladd et al., 2008 estudou os polimorfismos em mulheres caucasianas pós-menopausa, demonstrando existir um aumento, embora não significativo, do risco de cancro da mama para o alelo G do polimorfismo Xbal e o alelo C do polimorfismo PvuII. Do mesmo modo, Wedrén et al., 2004, observou que em mulheres suíças a variação alélica de ambos os polimorfismos, Xbal e PvuII, do ER $\alpha$  podem estar associados com aumento do risco de cancro da mama ductal na pós-menopausa, sendo esta associação mais pronunciada em mulheres com índice de massa corporal mais elevado.

Modugno et al., 2005 relacionou, em mulheres caucasianas e pós-menopausa, os polimorfismos da proteína ER $\alpha$ , individualmente ou em combinação com factores reprodutivos ou de estilo de vida, com uma alteração do risco do cancro da mama. Neste estudo, o alelo A do polimorfismo Xbal está associado com uma diminuição do risco de cancro da mama, sendo esta protecção superior em não fumadoras. Por outro lado, o polimorfismo do PvuII não estaria associado ao aumento do risco do cancro da mama, mas o alelo T estaria relacionado com uma redução do risco de cancro da mama em mulheres nulíparas e provavelmente

aumento do risco de cancro da mama em mulheres a fazer terapêutica hormonal de substituição. Shin et al, 2003 e Kang et al., 2003 demonstraram que a distribuição do polimorfismo PvuII não revelou diferenças entre casos e controlos, mas que o alelo A do polimorfismo do Xbal demonstrou uma diminuição do risco para o desenvolvimento de cancro da mama, comparativamente com o genótipo GG, sendo esta diminuição atribuível a mulheres pós-menopausa.

Em contraste, em mulheres chinesas, o genótipo TC e CC do polimorfismo PvuII foram associados a um risco aumentado de cancro da mama, sendo o polimorfismo Xbal associado a um risco aumentado não significativamente estatístico (Cai et al., 2003). Do mesmo modo, o polimorfismo PvuII foi associado a um aumento do risco de desenvolver cancro da mama, no entanto, não foi encontrada nenhuma diferença entre casos e controlos em relação ao Xbal, em mulheres egípcias. Por outro lado foi encontrada uma forte associação entre o alelo C do PvuII e doentes com metáteses nos nódulos linfáticos (Saad et al., 2008). Shen et al., 2006 demonstrou existir uma relação, embora não estatisticamente significativa, associada ao genótipo TC e CC do polimorfismo PvuII e AG e GG do polimorfismo Xbal, quando comparado com o genótipo *wild type* TT e AA, respectivamente. Esta associação entre risco de desenvolver cancro da mama e TC, CC, AG ou GG foi superior em mulheres com história familiar de cancro da mama.

Em contraste, outros estudos efectuados em mulheres caucasianas e asiáticas referem não existir associação entre os polimorfismos Xbal e PvuII e o risco de cancro da mama (Einarsdóttir et al., 2007; Iwasaki et al., 2009).

#### 1.6.1.3 - Cancro endométrio

A exposição endógena e exógena a estrogénios é um grande factor no desenvolvimento e progressão de cancro do endométrio. O receptor de estrogénio alfa é o principal mediador de estrogénio no endométrio. Portanto, o gene que codifica o ER $\alpha$  pode ter um papel na susceptibilidade e prognóstico do cancro do endométrio.

Os potenciais factores de risco para o aumento da susceptibilidade para cancro do endométrio incluem o índice de massa corporal (mulheres obesas), pressão arterial elevada, diabetes e nuliparidade. Cada um destes factores pode contribuir para a elevação do risco em 5 a 10 vezes em relação a mulheres sem estas características (Iwamoto et al., 2003).

Iwamoto et al., 2003, e Weiderpass et al., 2000 demonstraram que em mulheres japonesas e suíças os genótipos AA e TT estavam associados a uma diminuição significativa do risco de cancro do endométrio, principalmente quando incluíram outras co-variáveis no modelo como a diabetes *mellitus*, os níveis de triglicédeos e HDL no sangue, nuliparidade e estado da menopausa. Estes resultados sugerem que o receptor de estrogénio pode ter um

papel na diminuição da susceptibilidade para o cancro do endométrio através de interacções com outros factores de predisposição como o diabetes *mellitus*, os níveis de triglicéridos e HDL, nuliparidade e estado da menopausa.

Em mulheres australianas (Ashton et al., 2009), ambas as variações C e G respectivamente dos polimorfismos Pvull e Xbal do gene ER $\alpha$  foram associadas com um aumento do risco de cancro do endométrio sem ou com associação com os factores de risco anteriores. Wedrén et al., 2008 demonstrou que numa amostra de mulheres suíças os homozigóticos para o alelo variante G do polimorfismo Xbal tinham quase metade do risco de desenvolver cancro do endométrio quando comparadas com mulheres homozigóticas para o alelo A do polimorfismo Xbal, no entanto esta análise foi baseada numa amostra reduzida e portanto pouco significativa.

Em contraste, Einarsdóttir et al., 2009 não encontrou associação entre as variantes polimórficas Pvull e Xbal do gene ER $\alpha$  e o aumento de susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro do endométrio.

#### 1.6.1.4 - Duração da exposição a estrogénio e fertilidade

A menarca é regulada por uma variedade de factores ambientais e genéticos. Por outro lado, a idade da menarca pode influenciar a duração total da exposição dos tecidos ao estrogénio. Um estudo efectuado em adolescentes gregas revelou que nas adolescentes com genótipo AA a idade da menarca é meio ano mais tardia em comparação com adolescentes com o genótipo AG ou GG (Stravou et al, 2002). Foi demonstrada uma tendência idêntica para o genótipo TT quando comparado com o genótipo TC ou CC do polimorfismo Pvull, embora a diferença não tenha sido significativa (Stravou et al, 2002). Quando associado o haplótipo TA a diferença foi ainda superior, sendo que em média homozigóticos TA tem um atraso na menarca de 8 meses (Stravou et al, 2002). Do mesmo modo, Xu et al., 2005 demonstraram uma associação entre os polimorfismos do receptor de estrogénio alfa, o gene Apal do receptor da vitamina D (VDR) e a idade da menarca, e observaram que mulheres chinesas com o polimorfismo do gene Apal do VDR e o haplótipo TA do gene ER $\alpha$ , tiveram em média 6 meses mais tarde a idade da menarca (Xu et al., 2005). No entanto, nem o gene ER $\alpha$  nem o gene VDR tiveram uma associação significativa com a idade da menarca individualmente (Xu et al., 2005). No entanto, Gorai et al., 2003 concluiu não existirem diferenças na idade da menarca em mulheres japonesas com os polimorfismos Pvull ou Xbal ou combinações destes genótipos (Xu et al., 2005).

Os polimorfismos do gene ER $\alpha$  também se encontram relacionados com a fertilidade em homens e mulheres como demonstrou Corbo et al., 2007, que observou um aumento da eficiência reprodutiva associada com o genótipo GG e CC dos polimorfismos Xbal e Pvull,

respectivamente. Neste estudo os autores encontraram uma associação entre os genótipos GG e haplotipo CCGG e um maior número de filhos em homens italianos saudáveis (Corbo et al., 2007). No mesmo estudo relacionaram o genótipo CC e haplotipo CCGG e menor número de abortos em mulheres italianas, enquanto em mulheres africanas foram associados com maior número de filhos (Corbo et al., 2007).

Um início precoce da menopausa está associado com risco aumentado de doenças cardiovasculares, osteoporose e cancro do ovário, embora por outro lado, um atraso no início da menopausa esteja associado com risco aumentado de cancro do endométrio e cancro da mama (Gorai et al, 2003). Weel et al., 1999, demonstraram que mulheres com o genótipo AA têm 1,1 anos precocemente a menopausa comparadas com mulheres com o genótipo CC, tendo-se observado um efeito alelo dependente, ou seja, por cada alelo A a idade da menopausa é 0,5 anos precoce. O risco de menopausa induzida por cirurgia foi superior para mulheres homozigóticas para o genótipo AA, quando comparadas com o grupo CC, com efeito predominante em mulheres que realizaram uma histerectomia devido a fibrose ou menorrágia (Weel et al., 1999). Em contraste, Kok et al., 2005 não encontraram nenhuma relação entre as variantes Xbal e Pvull do gene ER $\alpha$  e a idade natural da menopausa.

Schuit et al., 2005 observou que a variação dos níveis de estradiol em mulheres pós-menopausa é dependente dos polimorfismos do gene ER $\alpha$ , relacionando o nível mais reduzido de estradiol com os alelos T e A dos polimorfismos Pvull e Xbal, respectivamente. Esta associação não é influenciada ou explicada por factores como a idade, anos desde a menopausa, índice de massa corporal, hábitos tabágicos e níveis de testosterona, precursor do estradiol (Schuit et al., 2005).

## 2. Objectivos

### 2.1 - Objectivos gerais

- ✓ Analisar a prevalência dos polimorfismos PvuII e Xbal na consulta de ginecologia oncológica do Centro Hospitalar da Cova da Beira.
- ✓ Estudar a associação entre os polimorfismos e os diversos tipos de patologias ginecológicas.
- ✓ Relacionar a presença de polimorfismo com risco aumentado de doença ginecológica.
- ✓ Analisar o efeito dos polimorfismos em grupos de doentes com patologias ginecológicas específicas.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 - População-alvo**

Foram recolhidas aleatoriamente amostras de sangue em papel de filtro de mulheres que se dirigiram ao Centro Hospitalar Cova da Beira para a consulta de ginecologia oncológica entre o dia 15 de Março e 12 de Abril de 2011. Neste estudo o grupo de doentes continha 21 mulheres, com idades compreendidas entre os 28 e os 74 anos, com uma média de 48.86 anos, na altura da recolha da amostra. O grupo de controlo continha 121 mulheres com uma média de idades de 56.28 anos, sem história pessoal ou familiar de cancro, cujas amostras foram recolhidas pela Dra. Ana Cristina Ramalinho e gentilmente cedidas para o propósito deste trabalho. No grupo de doentes foram recolhidas informações dos seus processos clínicos como, história de contracepção, menstruação e reprodução, doenças concomitantes, antecedentes familiares, hábitos tabágicos e alcoólicos entre outras. No grupo de controlos foi recolhida informação como a idade, etnicidade e história menstrual e reprodutiva. Todas as mulheres assinaram um termo de responsabilidade antes de serem aceites no estudo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E.

### **3.2 - Extracção de ADN e Genotipagem**

#### **3.2.1 - Extracção de ADN com recurso ao Chelex 100 da Bio-Rad.**

A resina de Chelex 100 é um copolímero de estireno de divinilbenzeno que contém iões iminodiacetato, que actua como quelante por ligação a iões metálicos. Apesar de ser classificada como uma resina de troca catiónica fraca, difere dos outros membros da sua classe pela sua elevada selectividade e afinidade para iões metálicos. O Chelex 100 actua por ligação aos contaminantes metálicos nas soluções de ADN sem alterar a concentração de iões não metálicos (Walsh et al., 1991).

Neste trabalho o ADN do sangue foi extraído usando o método de Chelex a 10%. Uma pequena porção de papel foi adicionada a 100 µL de Chelex a 10%. Foi incubado a 100°C durante 20 minutos e posteriormente centrifugado a 13000 rpm durante 3 minutos. A

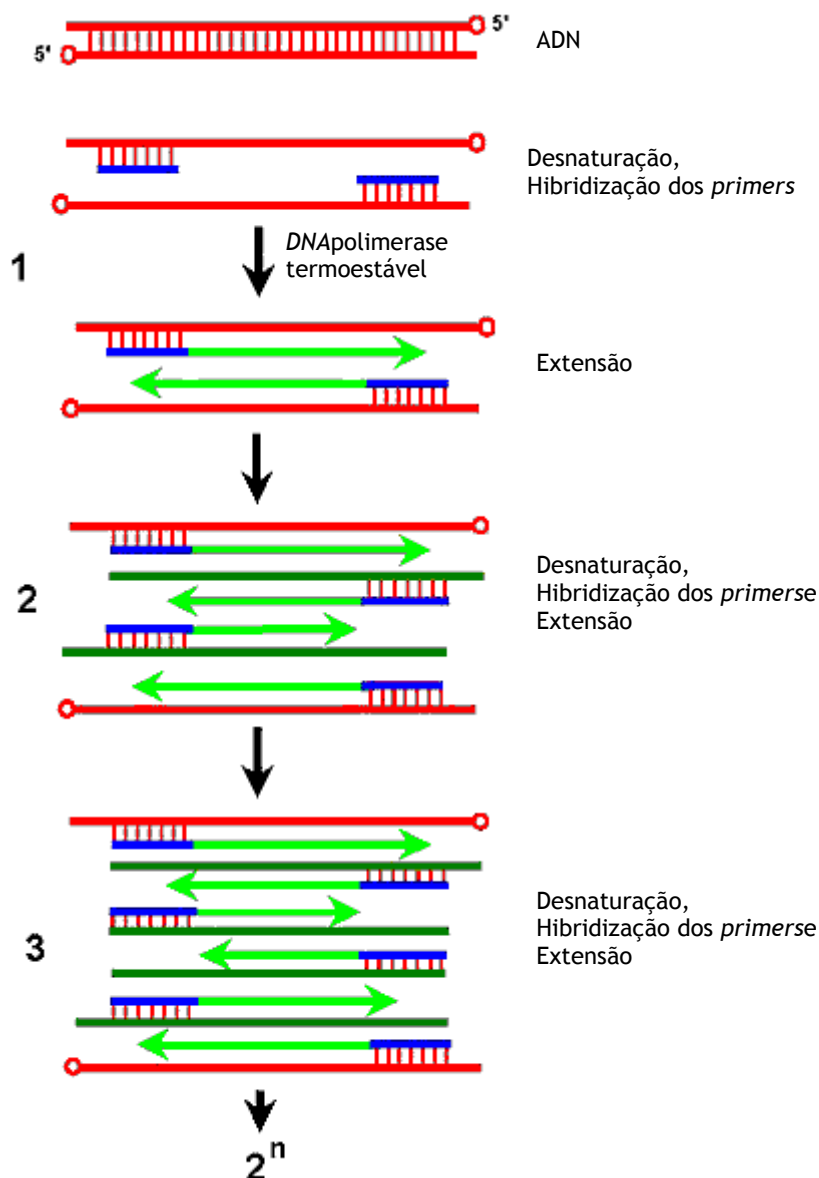
amplificação era imediata utilizando para tal o sobrenadante. A amostra foi amplificada por PCR-RFLP.

### 3.2.2 - Amplificação do ADN presente na amostra por PCR-RFLP (polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição).

A técnica de PCR (polymerase chain reaction - reacção em cadeia pela polimerase) baseia-se no processo de replicação de ADN que ocorre *in vivo*. Durante o PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de ADN em duas cadeias simples, permitindo então a ligação dos *primers*, que são oligonucleótidos iniciadores. A DNA polimerase utiliza uma das cadeias como molde para sintetizar ADN complementar, num processo que envolve vários ciclos, amplificando assim o ADN numa concentração de  $2^n$  (Reischl, 1996).

A mistura contendo pequenas quantidades de ADN alvo, tampão, polimerase, *primers*, desoxinucleótidos constituintes do ADN e o cofactor  $Mg^{2+}$  é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem num primeiro passo na desnaturação do ADN pelo calor, de modo a separar as duas cadeias (geralmente 1 minuto a 94-96°C) (Figura 13). De seguida ocorre a hibridização dos *primers* por ligações de hidrogénio ao ADN em cadeia simples. Para permitir essa associação, a temperatura da reacção é diminuída (geralmente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto). Por último, ocorre a extensão dos *primers* através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (geralmente a 72°C durante 1 minuto). Este processo repete-se em vários passos produzindo ADN suficiente para que seja visualizado após electroforese em gel de agarose e o tamanho estimado por comparação de padrões lineares de ADN (Reischl, 1996).

Uma vez que durante o PCR a temperatura varia bastante, a DNA polimerase utilizadas deve ser termoestável, tendo tal sido conseguido com o isolamento da DNA polimerase da estirpe termofílica *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) que actua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reacção (Reischl, 1996).



**Figura 13** Representação esquemática de uma reacção em cadeia pela polimerase (PCR) (adaptado de Reischl, 1996)

O PCR-RFLP permite identificar os génotipos polimórficos através da análise das sequências de nucleótidos de dimensões diferentes resultantes da acção de enzimas de restrição. Se um local for reconhecido pela enzima de restrição são criados dois fragmentos mais pequenos que aparecem na electroforese final e se o local não for reconhecido aparece apenas um fragmento maior (Reischl, 1996).

Os génotipos do gene ER $\alpha$  foram identificados por PCR-RFLP. Os primers utilizados foram: 3'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-5' (reverse) e 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3' (forward). Estes primers originaram um fragmento de 1,3 kb. Cada 50 $\mu$ L de mistura PCR continha 1 $\mu$ L de ADN, 5 $\mu$ L de tampão para



PCR, 3µL de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de deoxinucleasido trifosfato, 1µL de cada *primer* e 0,2µL de TaqDNA polimerase. A reacção foi inicialmente desnaturada a 94°C durante 3 minutos, seguindo-se de 36 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 61°C durante 45 segundos e 72°C durante 2 minutos. O PCR foi finalizado com um ciclo a 72°C durante 7 minutos. O produto resultante da amplificação foi digerido por enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo.

### 3.2.3 - Digestão da amostra e genotipagem

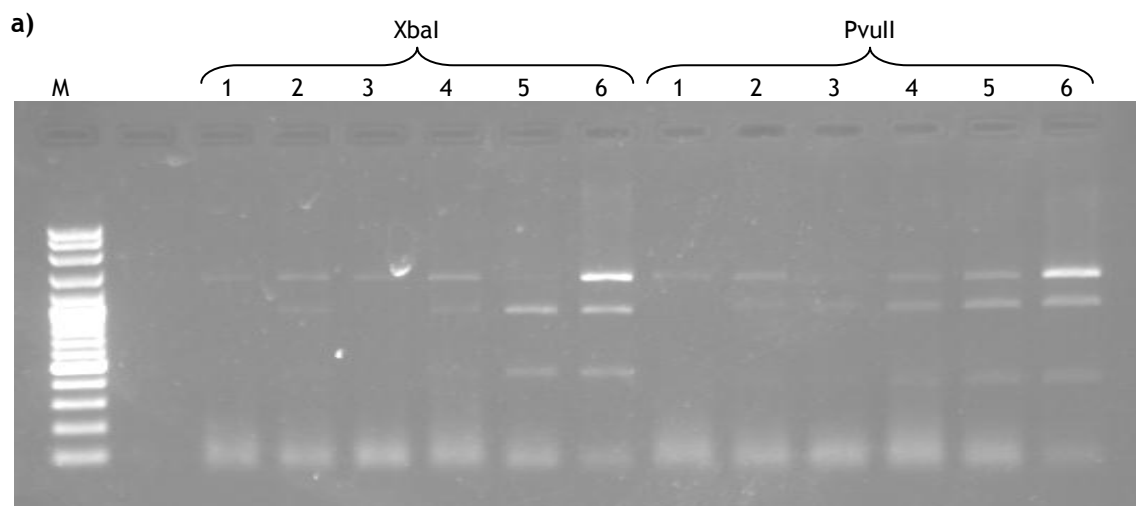
A digestão foi realizada no produto de PCR com recurso a enzimas de restrição PvuII e XbaI para cada polimorfismo a 37°C, *overnight*. Os fragmentos de ADN foram separados com recurso à electroforese em gel de agarose a 1,5% e detectados por ultravioleta (UV). Os resultados foram analisados conforme presença ou ausência de locais de restrição sendo que TT e AA significam ausência de local de restrição, originando um fragmento de 1,3 kb. O genótipo CC significa a presença de enzima de restrição PvuII em ambos os alelos e foi digerido em dois fragmentos (0,85 kb e 0,45 kb). O genótipo GG foi revelado por digestão com a enzima XbaI originando dois fragmentos (0,9 kb e 0,4 kb).

## 3.3 - Análise estatística

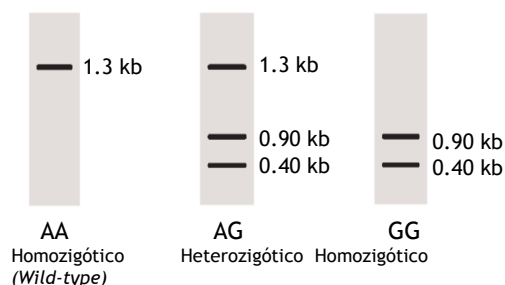
A análise estatística foi realizada com recurso ao programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0. Foi usado o teste de Qui-quadrado com calculo dos coeficientes de Pearson para estimar a correlação entre os polimorfismos XbaI e PvuII e risco de doença. Os Odds Ratio foram estimados com um intervalo de confiança de 95%.

## 4. Resultados/Discussão

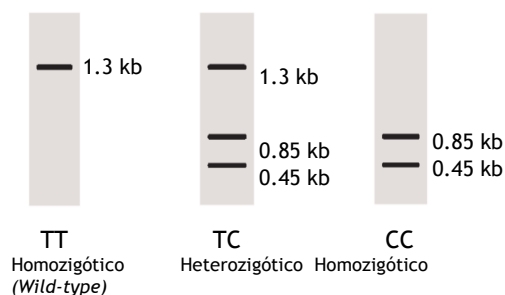
Após extracção do ADN, amplificação por PCR-RFLP e digestão da amostra a visualização dos resultados foi feita através da electroforese em gel de agarose e detectados por UV. Na Figura 14 encontra-se uma imagem obtida por electroforese em gel de agarose.



b) XbaI



c) PvuII



**Figura 14** Resultados obtidos após electroforese. a) Exemplo de resultados obtidos durante o trabalho experimental; b) Representação esquemática dos resultados para o polimorfismo XbaI; c) Representação esquemática dos resultados para o polimorfismo PvuII. M- marcador de peso molecular.

Para análise dos resultados organizámos os mesmos nos seguintes grupos: “Grupo de Mulheres com Patologia” (GMP) e “Grupo Controlo” (GC). No entanto, com o objectivo de estudar as correlações dos polimorfismos com doenças específicas subdividimos o grupo GSP em quatro pequenos grupos: “Crescimento anormal de células”; “Cancro”; “Infecção por HPV”; “Processos inflamatórios”. Na Tabela 1 esta divisão encontra-se esquematizada.

**Tabela 1** Organização dos grupos para fins estatísticos.

<i>Grupo Controlo (GC)</i>	121 mulheres saudáveis	
<i>Grupo de Mulheres com Patologia (GMP)</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <i>Crescimento anormal de células (inclui 2 mulheres com adenomiose e 2 mulheres com leiomioma - 4 mulheres)</i></li> <li>2) <i>Cancro (inclui 6 mulheres com cancro da mama e 2 mulheres com cancro do endométrio - 8 mulheres)</i></li> <li>3) <i>Infecção por HPV (6 mulheres)</i></li> <li>4) <i>Processos inflamatórios (inclui 1 mulheres com prurido vulvar, 1 mulheres com inflamação do colo do útero e 1 mulheres com erosão do mamilo - 3 mulheres)</i></li> </ol>	21 mulheres

## 4.1 - Análise de parâmetros do grupo de controlo (GC) e o grupo de mulheres com patologia (GMP)

Na tabela 2 estão representadas as distribuições por frequência dos parâmetros que caracterizam a população estudada. Os dados são apresentados para avaliar a consistência da distribuição destes factores entre os dois grupos. Em relação à população estudada não existem diferenças significativamente estatísticas nas características estudadas entre o grupo GSP e o grupo GC ( $p>0.05$ ).

**Tabela 2** Distribuição por frequência dos parâmetros que caracterizam a população estudada.

	GC, n (%)	GMP, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
Total	121 (100)	21 (100)		
Idade da menarca				
< 15 anos	98 (81)	19 (90.5)	1.0	—
≥ 15 anos	23 (19)	2 (9.5)	2.230 (0.485-10.257)	0.236
Idade na primeira gravidez de termo				
< 30 anos	68 (70.8)	18 (90)	1.0	—
≥ 30 anos	28 (29.2)	2 (10)	3.706 (0.806-17.041)	0.06
Número de gravidezes de termo				
Nulíparas	25 (20.7)	1 (25.7)	1.0	—
1	19 (15.7)	4 (19)	0.190 (0.020-1.841)	0.138
2+	77 (63.6)	16 (76.2)	0.193 (0.024-1.526)	0.071
Estado da menopausa				
Pré-menopausa	46 (38)	10 (47.6)	1.0	—
Pós-menopausa	75 (62)	11 (52.4)	0.675 (0.266-1,713)	0.276

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

Podemos observar na Tabela 2 que não existem diferenças significativas entre a idade da menarca do grupo GMP e do grupo GC. Segundo Mitrune and Hirvonen et al., 2003 a

idade da menarca influencia a duração da exposição total dos tecidos a estrogénio. Os estudos efectuados em mulheres portuguesas adolescentes e jovens adultas revelam que a idade da menarca é de  $12.53 \pm 1.27$  anos (Padez and Rocha, 2003) e 12.32 anos (Padez, 2003), o que está de acordo com os estudos desenvolvidos por Danubio e Sanna (Danubio and Sanna, 2008) que referem que nas últimas décadas tem-se vindo a observar uma antecipação dos sinais de puberdade, nomeadamente a idade da menarca. Um estudo realizado numa amostra de mulheres portuguesas com idade superior a 44 anos revelou que a média da idade da menarca neste grupo de mulheres mais velhas é de  $14.34 \pm 1.98$  anos (Gama, 2008). A escolha dos intervalos da idade da menarca no nosso estudo deve-se ao facto de a população estudada, seja no grupo GMP ou no grupo GC, ter uma média de idades de 48.86 anos e 56.28 anos, respectivamente, cuja idade da menarca será também mais elevada.

A idade da primeira gravidez e o número de gravidezes têm sido associados a aumento do risco de patologias como o cancro da mama, sendo que as mulheres que têm filhos tardiamente e as mulheres nulíparas têm risco aumentado de cancro da mama (Reeves et al., 2009; Phipps et al., 2010). No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres do grupo GMP e as mulheres do grupo GC em relação à idade na primeira gravidez de termo e o número de filhos, apesar de existirem 6 mulheres com cancro da mama no grupo de mulheres GMP.

Posto isto, podemos afirmar que a amostra do grupo GSP e do grupo GC são homogéneas em relação às características apresentadas.

## 4.2 - Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo de mulheres com patologia (GMP)

### 4.2.1 - Análise da distribuição dos polimorfismos Xbal e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC)

Após a análise dos resultados da Tabela 3 é possível observar que existe diferença estatisticamente significativa ( $p=0.009$ ) entre o grupo de GMP e grupo GC para as portadoras do genótipo CC do polimorfismo PvuII, sugerindo uma maior susceptibilidade para doenças ginecológicas neste grupo de mulheres. As mulheres portadoras do genótipo CC têm risco 18 vezes mais elevado de desenvolver doença em relação às mulheres com o genótipo TT (*wild-type*).

**Tabela 3** Distribuição dos polimorfismos Xbal e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC).

		GC, n (%)	GMP, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
Xbal	AA	7 (5.8)	1 (25)	1.0	—
	AG	59 (48.8)	3 (75)	2.810 (0.256-30.814)	0.392
	GG	55 (45.5)	0 (0)	0.875 (0.673-1.137)	0.127
PvuII	TT	10 (8.3)	4 (19)	1.0	—
	TC	66 (54.5)	16 (76.2)	1.650 (0.458-5.945)	0.481
	CC	45 (37.2)	1 (4,8)	18.000 (1.812-178.808)	0.009

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

Observando os resultados da Tabela 3 podemos concluir que existe uma correlação entre o grupo GMP, ou seja, doentes com várias patologias ginecológicas, e a existência de polimorfismo PvuII. Vários autores relataram o papel deste polimorfismo em patologias ginecológicas específicas como a adenomiose (Kitawaki et al., 2001), leiomioma (Kitawaki et al., 2001), cancro da mama (Cai et al., 2003) e cancro do endométrio (Ashton et al., 2009), que o grupo GMP engloba, mas do nosso conhecimento nenhum autor referiu a importância do polimorfismo PvuII no desenvolvimento de doença ginecológica no geral.

Tal como descrito anteriormente, Herrington et al., 2002, demonstrou que o alelo T para o polimorfismo PvuII resulta na eliminação do local de ligação funcional para o factor de transcrição *B-myb*. A presença deste alelo pode resultar na menor transcrição da proteína ER $\alpha$ . Por outro lado, o estrogénio ao ligar-se aos receptores regula a expressão de múltiplos

genes. Num estudo realizado por Shuit et al., 2005 foi proposto que um desses genes seria a 17 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenase, enzima responsável pela produção de estrogénio. Estes autores reportaram que o alelo T e A do polimorfismo PvuII e XbaI, respectivamente, estão associados com menores níveis plasmáticos de estrogénio em mulheres pós-menopausa. A diminuição da expressão de ER $\alpha$  causada pelos alelos T e A origina uma menor expressão da enzima da biossíntese de estrogénio, o que gera redução da produção de estrogénio. Podemos por analogia sugerir que a presença dos alelos C e G do polimorfismo PvuII e XbaI está associada a concentrações plasmáticas de estrogénio mais elevadas.

Existindo uma provável ligação entre os níveis de estrogénio, a expressão da proteína ER $\alpha$  e os polimorfismos PvuII (Herrington et al., 2002, Shuit et al., 2005) podemos propor que os níveis superiores de estrogénio e a maior expressão de ER $\alpha$  em mulheres que contêm o genótipo CC do polimorfismo PvuII do gene ER $\alpha$  parecem aumentar a susceptibilidade para desenvolver doenças ginecológicas neste grupo de mulheres.

#### 4.2.2 - Análise da frequência alélica dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC)

Ao analisar os resultados obtidos para as frequências alélicas dos polimorfismos XbaI e PvuII (Tabela 4) verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de controlo e o grupo de mulheres com patologia que demonstra que o alelo G ( $p=0.000$ ) e o alelo C ( $p=0.010$ ) do polimorfismo XbaI e PvuII, respectivamente, conferem risco acrescido de desenvolver doença do foro ginecológico. O alelo G e C aumentam a susceptibilidade de desenvolver doença 3.8 vezes e 2.4 vezes, respectivamente, em relação aos alelos *wild-type*.

**Tabela 4** Frequência alélica dos polimorfismos XbaI e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC).

		GC, n (%)	GMP, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
<b>XbaI</b>	A	73 (30.2)	26 (61.9)	1.0	—
	G	169 (69.8)	16 (38.1)	<b>3.762 (1.905-7.430)</b>	<b>0.000</b>
<b>PvuII</b>	T	86 (35.5)	24 (57.1)	1.0	—
	C	156 (64.5)	18 (42.9)	<b>2.419 (1.243-4.705)</b>	<b>0.010</b>

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

A presença do alelo mutado em qualquer um dos dois polimorfismos parece acrescentar risco de desenvolver patologia ginecológica, sendo que a presença do alelo G do polimorfismo XbaI parece ter um risco superior de desenvolver doença ginecológica em

relação ao alelo C do polimorfismo PvuII (3.7 vezes de risco acrescido para as portadoras do alelo G e 2.4 vezes de risco acrescido para as portadoras do alelo C).

No entanto, apesar de esta análise nos indicar a importância dos alelos mutados dos polimorfismos Xbal e PvuII na susceptibilidade de desenvolver doença ginecológica, é necessário realçar que ao abranger num só grupo patologias tão diferentes, e com uma amostra tão pequena de cada patologia, o efeito de um alelo pode ser ocultado pela presença de uma patologia que esteja em número superior neste grupo, e portanto esta análise não pode ser extrapolada para outra amostra.

#### 4.2.3 - Análise dos haplotipos dos polimorfismos Xbal e PvuII no grupo de mulheres com patologia com patologia (GMP) e no grupo de controlo (GC)

A análise de combinações entre os dois polimorfismos revelam existir diferença estatisticamente significativa para os genótipos GG/TC ( $p=0.007$ ), GG/CC ( $p=0.002$ ) e AG/CC ( $p=0.007$ ) (Tabela 5). Os resultados obtidos revelam existir uma forte associação entre a presença do genótipo GG/TC (OR=28.000 (2.291-342.150)) e GG/CC (OR=41.333 (3.423-499.146)) e o aumento da susceptibilidade para doenças do foro feminino, em contraste, o genótipo AG/CC (OR=0.429 (0.182-1.008)) parece ter um papel protector no desenvolvimento destas doenças.

**Tabela 5** Análise dos haplotipos dos polimorfismos Xbal e PvuII no grupo de mulheres com patologia (GMP) e no grupo controlo (GC).

	GC, n (%)	GMP, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
AA/TT	3 (2.5)	4 (19)	1.0	—
AA/TC	3 (2.5)	3 (14.3)	1.000 (0.104-9.614)	1.000
AA/CC	1 (0.8)	0 (0)	0.429 (0.182-1.008)	1.000
AG/TT	4 (3.3)	0 (0)	0.429 (0.182-1.008)	0.194
AG/TC	42 (34.7)	12 (57.1)	4.667 (0.916-23.785)	0.070
AG/CC	13 (10.7)	0 (0)	<b>0.429 (0.182-1.008)</b>	<b>0.007</b>
GG/TT	3 (2.5)	0 (0)	0.429 (0.182-1.008)	0.200
GG/TC	21 (17.4)	1 (4.8)	<b>28.000 (2.291-342.150)</b>	<b>0.007</b>
GG/CC	31 (25.6)	1 (4.8)	<b>41.333 (3.423-499.146)</b>	<b>0.002</b>

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

Em Portugal nenhum estudo de que tenhamos conhecimento foi realizado com o intuito de analisar os haplotipos mais prevalentes na população, no entanto na nossa amostra



verificámos que o haplotipo mais prevalente é o heterozigótico para ambos os polimorfismos, o haplotipo AG/TC, seguido do haplotipo GG/CC e o haplotipo GG/TC.

Analisando a Tabela 5 é possível observar que embora o haplotipo GG/TC e o haplotipo GG/CC aumentem o risco de desenvolver doença do foro feminino, o genótipo AG/CC parece ter efeito protector. O valor observado para o genótipo AG/CC tem uma significância de origem dúbia uma vez que neste estudo nenhuma mulher do grupo GMP continha este haplotipo e esse valor seja apenas devido a extrapolação estatística. No entanto, esta tabela permitiu-nos sugerir que a presença concomitante do genótipo GG com o genótipo TC ou CC acrescenta ainda mais risco de desenvolver uma doença do foro ginecológico do que a presença de apenas um polimorfismo mutado. Deste modo, na nossa amostra a frequência alélica do alelo C do polimorfismo PvuII aumenta a susceptibilidade de desenvolver uma doença ginecológica 2.4 vezes em relação às portadoras do alelo T (Tabela 4) e a presença do alelo mutado G do polimorfismo Xbal aumenta 3.8 vezes o risco de desenvolver doença do foro feminino em relação a mulheres portadoras do alelo A (Tabela 4). No entanto, a combinação GG/TC aumenta o risco de desenvolver patologia ginecológica 28 vezes e a combinação GG/CC aumenta o risco de desenvolver doença 41 vezes em relação à combinação AA/TT. Assim, a combinação do genótipo GG do polimorfismo Xbal com pelo menos um alelo mutado do polimorfismo PvuII parece acrescentar risco em relação à análise da frequência alélica, relevando um papel aditivo destes polimorfismos no desenvolvimento de uma patologia do foro ginecológico.

### 4.3 Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo composto por doentes com uma infecção causada pelo Papilomavírus Humano (HPV) (Infecção por HPV)

#### 4.3.1 - Análise da distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC)

Após análise da Tabela 6 constatou-se que existe diferença estatisticamente significativa ( $p=0.003$ ) para afirmar que as portadoras do alelo G do polimorfismo XbaI demonstram ter maior susceptibilidade de contrair uma infecção por HPV, sendo que estas portadoras têm 16 vezes o risco aumentado de desenvolver a doença.

**Tabela 6** Distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC).

		GC, n (%)	Infecção HPV, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
XbaI	AA	7 (5.8)	3 (50)	1.0	—
	AG/GG	114 (94.2)	3 (50)	<b>16.286 (2.766-95.896)</b>	<b>0.006</b>
PvuII	TT	10 (8.3)	1 (16.7)	1.0	—
	TC/CC	111 (91.7)	5 (83.3)	2.220 (0.236-20.904)	0.426

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

A análise dos resultados obtidos para o grupo “Infecção por HPV” permite-nos extrapolar uma correlação entre as portadoras do alelo G do polimorfismo XbaI e o risco de desenvolver infecção por HPV. Do nosso conhecimento nenhum estudo foi publicado até agora que relacione a infecção por HPV e os polimorfismos XbaI e PvuII do gene ER $\alpha$ . No entanto, a interdependência entre o estrogénio e a infecção por HPV já tinha sido descrita, uma vez que os contraceptivos orais e a gravidez têm demonstrado ser factores de risco para aquisição de HPV e displasia cervical, enquanto múltiplas gravidezes também têm sido associadas à persistência de infecção por HPV (Mitrani-Rosenbaum et al., 1989; Shew et al., 2002; Brake and Lambert, 2004). O estrogénio estimula a transcrição pelo HPV de proteínas oncogénicas (proteína E6, proteína E7 e proteína E5) responsáveis pela imortalização e/ou transformação de células na zona de transformação do cérvix, local preferencial para o desenvolvimento de

displasia cervical (Mitrani-Rosenbaum et al., 1989; Arbeit et al., 1995; Webster et al., 2001) e o crescimento continuado e a persistência de tumores no cérvix são dependentes de estrogénio (Brake and Lambert, 2004). Por outro lado, os receptores de estrogénio encontrados nesta zona são predominantemente ER $\alpha$  e estes estão envolvidos no desenvolvimento de cancro do colo do útero (Chung et al., 2008). Deste modo, podemos sugerir que as portadoras do alelo G do polimorfismo Xbal parecem estar mais susceptíveis à acção do estrogénio sob o ER $\alpha$ , o que aumenta o risco de desenvolvimento e progressão da infecção por HPV, neste grupo de portadoras.

#### 4.3.2 - Análise da frequência alélica do polimorfismo Xbal e PvuII em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC)

Segundo os resultados mostrados na Tabela 7 existe diferença estatisticamente significativa ( $p=0.002$ ) entre o grupo de doentes e controlos para as portadoras do alelo G do polimorfismo Xbal, sugerindo uma maior susceptibilidade para doenças causadas por HPV em mulheres doentes. Estes resultados sugerem um risco acrescido de 7 vezes de desenvolver doença em mulheres portadoras do alelo G.

**Tabela 7** Frequência alélica do polimorfismo Xbal e PvuII em doentes com infecção por HPV e grupo de controlo (GC).

		GC, n (%)	Infecção HPV, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
<b>Xbal</b>	A	73 (30.2)	9 (75)	1.0	—
	G	169 (69.8)	3 (25)	<b>6.945 (1.827-26.396)</b>	<b>0.002</b>
<b>PvuII</b>	T	86 (35.5)	7 (58.3)	1.0	—
	C	156 (64.5)	5 (41.7)	2.540 (0.782-8.243)	0.130

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

Ao observarmos a tabela acima verificamos que tal como na Tabela 6 apenas o alelo G parece ter um papel importante no aumento de risco de infecção por HPV, sem qualquer efeito do polimorfismo do PvuII. Portanto, podemos afirmar que, nesta amostra populacional estudada, apenas o polimorfismo Xbal tem um papel significativo no aumento do risco para desenvolver infecção por HPV, embora o reduzido número da amostra possa não ter evidenciado o papel do polimorfismo PvuII nesta doença.

Foi proposto que a acumulação do metabolito do estrogénio, o 16 $\alpha$ -hidroxiestrone, pode resultar em danos no ADN o que pode conduzir à acumulação de mutações, que posteriormente originam cancros (*Abstract* de Auborn et al., 1991).

Apesar do mecanismo de infecção do HPV não estar perfeitamente esclarecido, sabe-se que um dos parâmetros que o HPV altera é o processo de metilação e deacetilação das histonas. Eventualmente poderemos colocar como hipótese que as portadoras do alelo G do polimorfismo XbaI sejam mais susceptíveis a este processo epigenético.

## 4.4 Análise de diferenças entre o grupo de controlo (GC) e o grupo composto por doentes devido a um processo inflamatório (Processos inflamatórios)

### 4.4.1 Análise da distribuição do polimorfismo Xbal e PvuII no grupo de doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC)

A análise dos resultados obtidos permitiu constatar que existe diferença estatisticamente significativa para considerar que a presença do genótipo GG ( $p=0.048$ ) do polimorfismo Xbal aumenta o risco de desenvolver um processo inflamatório, mas a presença do genótipo AG ( $p=0.016$ ) contribui para uma relativa protecção em relação a doenças inflamatórias do foro feminino (Tabela 8). O genótipo GG aumenta o risco em 15.7 vezes em relação ao genótipo AA enquanto o genótipo AG o risco é de 0.8 vezes em relação ao genótipo AA.

**Tabela 8** Distribuição do polimorfismo Xbal e PvuII no grupo de doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC).

		GC, n (%)	Processos inflamatórios, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
Xbal	AA	7 (5.8)	2 (66.7)	1.0	—
	AG	59 (48.8)	0 (0)	<b>0.778 (0.549-1.103)</b>	<b>0.016</b>
	GG	55 (45.5)	1 (33.3)	<b>15.714 (1.257-196.487)</b>	<b>0.048</b>
PvuII	TT	10 (8.3)	1 (33.3)	1.0	—
	TC	66 (54.5)	1 (33.3)	6.600 (0.382-114.155)	0.264
	CC	45 (37.2)	1 (33.3)	4.500 (0.259-78.204)	0.352

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

Ao analisar a Tabela 8 é possível observar que embora, o genótipo GG aumente o risco de desenvolver uma patologia ginecológica de origem inflamatória, o genótipo AG do polimorfismo Xbal parece ter um papel protector nesta patologia. No entanto, devemos ter em consideração que nenhuma mulher possuía o genótipo AG neste subgrupo do GMP e que estamos perante um número muito pequeno de amostra (3 mulheres), o que influencia os resultados e portanto serão necessários novos estudos para avaliar o verdadeiro efeito deste genótipo.

O estrogénio tem um papel importante na imunomodulação embora exista um paradoxo acerca da função dos estrogénios na inflamação. Se por um lado, é reconhecida uma

função anti-inflamatória como a de inibição da reabsorção de osso e supressão da inflamação de doenças inflamatórias crónicas (Straub et al., 2007), por outro lado, os estrogénios têm um papel importante em caso de trauma/sepsis e efeitos pró-inflamatórios em algumas doenças crónicas auto-imunes em humanos (Straub et al., 2007).

No entanto, em condições inflamatórias, Straub et al., 2007, referiu que existe uma predominância de ER $\beta$  em relação a ER $\alpha$  o que pode influenciar os efeitos do estrogénio (Straub et al., 2007). O autor mencionou que no início do processo inflamatório pode existir um balanço entre a proteína ER $\alpha$  e a proteína ER $\beta$ , enquanto numa fase crónica do processo, o ER $\beta$  pode estar mais expresso nos tecidos do que ER $\alpha$  (Straub et al., 2007). Apesar de no nosso trabalho termos apenas analisado o papel do ER $\alpha$ , sem analisar a importância do ER $\beta$ , podemos afirmar que com base nos nossos resultados o ER $\alpha$  parece ter também um papel importante no desenvolvimento de doenças de origem inflamatória.

#### 4.4.2 - Análise da distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC)

Segundo os resultados obtidos as mulheres com alelo mutado (AG/GG) do polimorfismo XbaI têm maior susceptibilidade de desenvolver uma doença de carácter inflamatório em relação a mulheres sem essa mutação (Tabela 9), sendo que o risco de desenvolver doença é 32.5 vezes maior nas portadoras do alelo G.

**Tabela 9** Distribuição por frequência dos portadores e não portadores dos alelos mutados em doentes com processos inflamatórios e grupo de controlo (GC).

		GC, n (%)	Processos inflamatórios, n (%)	OR (95% IC) <sup>a</sup>	P value
XbaI	AA	7 (5.8)	2 (66.7)	1.0	—
	AG/GG	114 (94.2)	1 (33.3)	<b>32.571 (2.624- 404.357)</b>	<b>0.014</b>
PvuII	TT	10 (8.3)	1 (33.3)	1.0	—
	TC/CC	111 (91.7)	2 (66.7)	5.550 (0.462-66.683)	0.245

<sup>a</sup>ORs odds ratio; IC intervalo de confiança

A análise dos resultados da Tabela 9 permitiu-nos observar que existe uma correlação entre o risco de desenvolver uma doença de origem inflamatória neste grupo de mulheres e a presença de polimorfismo XbaI.

Moeinpour et al. de 2007, Calippe et al. de 2008 e Callipe et al. de 2010 demonstraram que a exposição crónica a estrogénio aumenta a produção de várias citocinas como a IL-1 $\beta$ , a IL-6 e a IL-12, assim como a expressão de iNOS, pelos macrófagos em resposta à activação do TLR4 pelo lipopolissacarídeo das células Gram negativas. A promoção pelo estrogénio durante a inflamação parece ser mediada pelo interferão gama (IFN- $\gamma$ ) que induz a iNOS que por sua vez induz a ciclooxigenase-2 (COX-2), que é responsável pela secreção de prostaglandinas (Karpuzoglu et al., 2006).

Após análise bibliográfica da acção dos estrogénios na inflamação compreendemos que esta regulação não é linear e que muitos processos intervêm nesta modulação, dificultando a crítica deste trabalho. Sugerindo que a expressão de ER $\alpha$  e os níveis de estrogénios estão aumentados na presença do alelo G do polimorfismo XbaI (Schuit e tal., 2005), a mulheres portadoras deste polimorfismo parecem ter maior susceptibilidade à inflamação, o que parece contradizer a bibliografia consultada. Por outro lado, apesar da modulação pelos estrogénios ser efectuada em grande parte pelo ER $\beta$  e que os níveis superiores de estrogénio parecem ter um papel protector (Straub, 2007), o nosso estudo sugere que a modulação da inflamação também poderá ser feita pelo ER $\alpha$ . Esta aparente contrariedade pode ser explicada pelo facto de o ER $\alpha$  e o ER $\beta$  diferirem na transactivação mediada por estradiol, devido a uma constituição de aminoácidos e diferentes interacções com os domínios do receptor (Zwart et al., 2010), como referido anteriormente. Esta diferença está presente, por exemplo nos carcinomas da mama e no osso onde o ER $\alpha$  e o ER $\beta$  desempenham funções diferentes nas células (Grober et al., 2011). Deste modo sugerimos que tal como ocorre noutros tecidos a expressão de ER $\alpha$  mediada pelo estrogénio poderá ser diferente da expressão do ER $\beta$  mediada pelo mesmo ligando, no entanto, estudos adicionais serão necessários para avaliar o verdadeiro papel da expressão do gene ER $\alpha$  na inflamação.

## 5. Limitações do estudo

A principal limitação deste estudo é o pequeno número da amostra do grupo de mulheres com patologia (GMP). Por outro lado, embora todas as patologias tenham uma componente estrogénica a influência do estrogénio em cada uma varia e portanto analisar patologias tão diferentes num só grupo pode ocasionar um desvio dos resultados e não ser possível visualizar correctamente o efeito dos polimorfismos nestas doenças.



## 6. Conclusão

Concluimos que parece existir uma associação entre o alelo G do polimorfismo Xbal e o alelo C do polimorfismo PvuII do receptor de estrogénio alfa e o aumento de risco de doença do foro ginecológico;

Foi possível estabelecer uma relação entre as mulheres portadoras do alelo G do polimorfismo Xbal e o aumento do risco de desenvolver infecção por HPV;

Verificou-se que as mulheres portadoras do alelo G do polimorfismo Xbal estão associadas a aumento da susceptibilidade de desenvolver uma patologia inflamatória. No entanto, este trabalho apresenta limitações que obrigam à análise destes dados de uma forma muito cautelosa, mas que pode levar à realização de futuros estudos e desenvolvimentos na área.

## 7. Bibliografia

- Albagha OME, Pettersson U, Stewart A, McGuigan FEA, MacDonald HM, Reid DM, Ralston SH. Association of oestrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet* 2005;42;240-246.
- Alevizaki M, Saltiki K, Cimponeriu A, Kanakakis I, Xita N, Alevizaki CC, Georgiou I, Sarika H-L. Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: associations with common estrogen receptor  $\alpha$  polymorphic variants. *European Journal of Endocrinology* 2007;156;489-496.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 2001;81(3),1269-1304.
- Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93; 2930-2935.
- Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, Gilbert M, Hamann U, Scott RJ. Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. *BJOG* 2009;116;1053-1061.
- Auborn KJ, Woodworth C, DiPaolo JA, Bradlow HL. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 1991;49;867-869 (Abstract).
- Barone I, Brusco L, Fuqua SAW. Estrogen Receptor Mutations and Changes in Downstream Gene Expression and Signaling. *Clin Cancer Res* 2010;16;2702-2708.
- Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, Falchetti A, Gonnelli S, Fiorelli G, Tanini A, Brandi ML. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet.*2000;9;2043-2050.
- Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, Falchetti A, Gonnelli S, Fiorelli G, Tanini A, Brandi ML. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet.*2000;9;2043-2050.
- Bhupathy P, Haines CD, Leinwand LA, Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond Engl)* 2010 January;6(1);77-95.

- Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *PNAS* 2005 February;102(7); 2490-2495.
- Cai Q, Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng JR, Gao YT, Zheng W. Genetic Polymorphisms in the Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene and Risk of Breast Cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12;853-859.
- Calippe B, Douin-Echinard V, Delpy L, Laffargue M, Lélou k, Krust A, Pipy B, Bayard F, Arnal JF, Guéry JC, Gourdy P. 17 $\beta$ -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling in Macrophages In Vivo. *The Journal of Immunology* 2010;185;1169-1176.
- Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, Pipy B, Guéry JC, Bayard F, Arnal JF, Gourdy P. Chronic Estradiol Administration In Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *The Journal of Immunology* 2008; 180; 7980 -7988.
- Cerne JZ, Pohar-Perme M, Novakovic S, Frkovic-Grazio S, Stegel V, Gersak K. Combined effect of CYP1B1, COMT, GSTP1, and MnSOD genotypes and risk of postmenopausal breast cancer. *J Gynecol Oncol.* 2011 Jun 30;22(2):110-9.
- Chien EYT, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. *Science* 2010;330(6007);1091-1095.
- Chung S, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS, Lambert PF. Requirement for Estrogen Receptor Alpha in a Mouse Model for Human Papillomavirus-Associated Cervical Cancer. *Cancer Res.* 2008 December 1;68(23): 9928-9934.
- Corbo RM, Ulizzi L, Piombo L, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Scacchi R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns. *Molecular Human Reproduction* 2007;13(8);537-540.
- Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Polish Journal of Endocrinology* 2010;61(1);126-134.
- Danubio ME, Sanna E. Secular changes in human biological variables in Western countries: an updated review and synthesis. *J Anthropol Sci.* 2008;86:91-112.
- Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies. *Molecular Endocrinology* 2010;24;1703-1714.
- Deschamps AM, Murphy E, Sun J. Estrogen Receptor Activation and Cardioprotection in Ischemia Reperfusion Injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2010 April;20(3);73-78.
- Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, Vega A, Rodríguez R, Barbosa-Morais NL, Ponder BA; SEARCH, Low YL, Bingham S; EPIC, Haiman CA, Le Marchand L; MEC, Broeks A, Schmidt MK; ABCS, Hopper J, Southey M; ABCFS, Beckmann MW,

- Fasching PA; BBCC, Peto J, Johnson N; BBCS, Bojesen SE, Nordestgaard B; CGPS, Milne RL, Benitez J; CNIO-BCS, Hamann U, Ko Y; GENICA, Schmutzler RK, Burwinkel B; GC-HBOC, Schürmann P, Dörk T; HABCS, Heikkinen T, Nevanlinna H; HEBCS, Lindblom A, Margolin S; KARBAC, Mannermaa A, Kosma VM; KBCS, Chen X, Spurdle A; kConFab and the AOCs Management Group, Change-Claude J, Flesch-Janys D; MARIE, Couch FJ, Olson JE; for MCBCS, Severi G, Baglietto L; MCCS, Børresen-Dale AL, Kristensen V; NBCS, Hunter DJ, Hankinson SE; NHS, Devilee P, Vreeswijk M; ORIGO, Lissowska J, Brinton L; PBCS, Liu J, Hall P; SASBAC, Kang D, Yoo KY; SEBCS, Shen CY, Yu JC; TWBCS, Anton-Culver H, Ziogas A; UCIBCS, Sigurdson A, Struwing J; USRTS, Easton DF, Garcia-Closas M, Humphreys MK, Morrison J, Pharoah PD, Pooley KA, Chenevix-Trench G; BCAC. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Human Molecular Genetics*, 2009; 18(6); 1131-1139.
- Einarisdóttir K, Darabi H, Czene K, Li Y, Low YL, Li YK, Bonnard C, Wedrén S, Liu ET, Hall P, Liu J, Humphreys K. Common genetic variability in ESR1 and EGF in relation to endometrial cancer risk and survival. *British Journal of Cancer* 2009;100;1358 - 1364.
  - Einarisdóttir K, Darabi H, Li Y, Low YL, Li YQ, Bonnard C, Sjölander A, Czene K, Wedrén S, Liu ET, Hall P, Humphreys K, Liu J. ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival. *Breast Cancer Research* 2008;10;R15.
  - Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes J, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Research* 2000;60;1267-1275.
  - Gama A. Age at menarche in Portuguese rural women from Oleiros. *Ann Hum Biol.* 2008 Nov-Dec;35(6):639-55.
  - Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansanil R, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Montagni A, Lentini G, Becorpi AM, Brandi ML. Vitamin D and Estrogen Receptor Allelic Variants in Italian Postmenopausal Women: Evidence of Multiple Gene Contribution to Bone Mineral Density. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83(3);939-944.
  - Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetic of osteoporosis: a huge review. *Am J Epidemiol.* 2004;161;307-320.
  - Gorai I, Tanaka K, Inada M, Morinaga H, Uchiyama Y, Kikuchi R, Chaki O, Hirahara F. Estrogen-Metabolizing Gene Polymorphisms, But Not Estrogen Receptor-  $\alpha$  Gene Polymorphisms, Are Associated with the Onset of Menarche in Healthy Postmenopausal Japanese Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;88(2);799-803.
  - Grober OMV, Mutarelli M, Giurato G, Ravo M, Cicatiello L, Filippo MR, Ferraro L, Nassa G, Papa MF, Paris O, Tarallo R, Luo S, Schroth GP, Benes V, Weisz A. Global

analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics* 2011;12:36.

- Hall JM, Couse JF, Korach KS. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(40),36869-36872.
- Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, Meyers DA, Bleecker ER. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002;105;1879-82.
- Hsieh YY, Wang YK, Chang CC, Lin CS. Estrogen receptor  $\alpha$ -351 XbaI\*G and -397 PvuII\*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Molecular Human Reproduction* 2007;13(2); 117-122.
- Huang H, He J, Yuan Y, Aoyagi E, Takenaka H, Itagaki T, Sannomiya K, Tamaki K, Harada N, Shono M, Shimizu I, Takayama T. Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *The journal of medical investigation JMI* 2008;55 (1-2);133-141.
- Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Minireview: Osteoprotective Action of Estrogens Is Mediated by Osteoclastic Estrogen Receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol*, May 2010;24(5);877-885.
- Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogue X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG; GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*. 2004 Nov 3;292(17):2105-14.
- Ivanova JT, Doukova PB, Boyanov MA, Popivanov PR. PvuII and XbaI polymorphisms of the estrogen receptor gene and bone mineral density in a Bulgarian population sample. *Hormones* 2007;6(1);36-43.
- Iwamoto I, Fujino T, Douchi T, Nagata Y. Association of Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Polymorphisms With Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol* 2003;102;506 -11.
- Iwasaki M, Hamada GS, Nishimoto N, Netto MM, Motola Jr J, Laginha FM, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Kobayashi M, Ishihara J, Yamamoto S, Hanaoka T, Tsugane S. Isoflavone, polymorphisms in estrogen receptor genes and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Sci* 2009;100;927-933.

- Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, Rechberger T, Haczyński J. Prevalence of estrogen receptor PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2007;45(4);331-338.
- Kang D. Genetic Polymorphisms and Cancer Susceptibility of Breast Cancer in Korean Women. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 36(1);28-34.
- Karpuzoglu E, Fenaux JB, Phillips RA, Lengi AJ, Elvinger F, Ahmed SA. Estrogen Up-Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Cyclooxygenase-2 in Splenocytes Activated with T Cell Stimulants: Role of Interferon- $\gamma$ . *Endocrinology* 2006;147(2);662-671.
- Katzenellenbogen BS. Antiestrogen resistance: mechanisms by which breast cancer cells undermine the effectiveness of endocrine therapy. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1434-1435.
- Katzenellenbogen BS. Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways. *Biology of Reproduction* 1996;54:287-293.
- Kennedy S. The genetics of endometriosis. *J Reprod Med* 1998;43:263-268.
- Kieser KJ, Kim DW, Carlson KE, Katzenellenbogen BE, Katzenellenbogen JA. Characterization of the Pharmacophore Properties of Novel Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs). *Med Chem.* 2010 April 22; 53(8);3320-3329.
- Kim JJ, Pae CU, Kim MR, Mim JA, Kim KH, Lee CU, Lee C, Paik IH. Association between estrogen receptor polymorphism and depression in post-menopausal women: A preliminary study. *Psychiatry Investig.* 2010;7;224-227.
- Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Kado N, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Honjo H. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Human Reproduction* 2001;16(1); 51-55.
- Kocanova S, Mazaheri M, Caze-Subra S, Bystricky K. Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biology* 2010;11;98.
- Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. No Replication of Association Between Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene Polymorphisms and Susceptibility to Myocardial Infarction in a Large Sample of Patients of European Descent. *Circulation.* 2005;112;2138-2142.
- Kok HS, Onland-Moret N-C, van Asselt KM, van Gils CH, van der Schouw IT, Grobbee DE, Peeters PHM. No association of estrogen receptor  $\alpha$  and cytochrome P450c17a polymorphisms with age at menopause in a Dutch cohort. *Human Reproduction* 2005;20(2);536-542.
- Kok M, Linn SC. Gene expression profiles of the oestrogen receptor in breast cancer. *The Netherlands Journal of Medicine* 2010;68(10);291-302.

- Ladd AM G-Z, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker BHC, Pols HAP, Uitterlinden AG, van Duijn CM. Estrogen receptor  $\alpha$  polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107:415-419.
- Liu J, Zhu H, Zhu X. The effect of estrogen receptor gene P $\alpha$  haplotype on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2001 Nov 10;81(21):1295-7.
- Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M, Mabuchi H. Association of Estrogen Receptor- $\alpha$  Gene Polymorphisms With Coronary Artery Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:817-823.
- Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, Shvetsov YB, Matsuno RK, Carney ME, Palmieri RT, Wu AH, Pike MC, Pearce CL, Menon U, Gentry-Maharaj A, Gayther SA, Ramus SJ, Whittemore AS, McGuire V, Sieh W, Pharoah PDP, Song H, Gronwald J, Jakubowska A, Cybulski C, Lubinski J, Schildkraut JM, Berchuck A, Kjaer SK, Høgdall E, Fasching PA, Beckmann MW, Ekici AB, Hein A, Chenevix-Trench G, Webb PM, Beesley J, Goodman MT. Estrogen Receptor Beta rs1271572 Polymorphism and Invasive Ovarian Carcinoma Risk: Pooled Analysis within the Ovarian Cancer Association Consortium. *PLoS ONE* Junho 2011; 6(6).
- Lussana F, Faioni EM, Mavilia C, Bucciarelli P, Brandi ML, Cattaneo M, Bonomi A. Association of estrogen receptor- $\alpha$  gene polymorphisms with venous thrombosis. *Haematologica* 2006;91;279-280.
- Mannisto PTM, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999;51(4);593-698.
- Marino M, Ascenzi P. Estrogen Receptor- $\alpha$ : Plasma Membrane Localization and Functions. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* 2006;6;281-289.
- Maufort JP, Shai A, Pitot H, Lambert PF. A Role for HPV 16 E5 in Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010 April 1; 70(7): 2924-2931.
- Meyer MR, Barton M. ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and gpER: novel aspects of oestrogen receptorsignalling in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 2009;83;605-610.
- Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-Genomic Regulation of Vascular Cell Function and Growth by Estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2); 9-16.
- Mitrani-Rosenbaum S, Svieli R, Tur-Kaspa R. Oestrogen Stimulates Differential Transcription of Human Papillomavirus Type 16 in SiHa Cervical Carcinoma Cells. *J. gen. Virol.* 1989;70;2227-2232.
- Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research* 2003;544;9-41.

- Mizukami Y. In Vivo Functions of GPR30/GPER-1, a Membrane Receptor for Estrogen: From Discovery to Functions In Vivo. *Endocrine Journal* 2010;57 (2);101-107.
- Modugno F, Zmuda JM, Potter D, Cai C, Ziv E, Cummings SR, Stone KL, Morin PA, Greene D, Cauley JA. Association of estrogen receptor polymorphisms with breast cancer risk in older Caucasian women. *Int. J. Cancer* 2005;116;984-991.
- Moeinpour F, Choudhry MA, Kawasaki T, Timares L, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 17 $\beta$ -ESTRADIOL NORMALIZES TOLL RECEPTOR 4, MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES AND INFLAMMATORY RESPONSE IN EPIDERMAL KERATINOCYTES FOLLOWING TRAUMA-HEMORRHAGE. *Mol Immunol.* 2007 July ;44(13); 3317-3323.
- Murphy LC, Seekallu SV, Watson PH. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocrine-Related Cancer* 2011;18;R1-R14.
- Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2000;2;360-366.
- Nilsson S, Gustafsson J-A. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Nature* 2011;89(1);44-55.
- Padez C, Rocha MA. Age at menarche in Coimbra (Portugal) school girls: a note on the secular changes. *Ann Hum Biol.* 2003 Sep-Oct;30(5):622-32.
- Padez C. Social background and age at menarche in Portuguese university students: a note on the secular changes in Portugal. *Am J Hum Biol.* 2003 May-Jun;15(3):415-27.
- Phipps AL, Li CI, Kerlikowske K, Barlow WE, Buist DSM. Risk Factors for Ductal, Lobular, and Mixed Ductal-Lobular Breast Cancer in a Screening Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 June ; 19(6): 1643-1654.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron A. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009 July;30(2): 239-258.
- Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO Journal* 1988;7(11);3385-8.
- Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Romancer M. Les modifications posttraductionnelles orchestrent l'action du récepteur des oestrogènes Era dans les tumeurs mammaires. *Medecine/Sciences* 2010;26;636-40.
- Powell E, Wang Y, Shapiro DJ, Xu W. Differential Requirements of Hsp90 and DNA for the Formation of Estrogen Receptor Homodimers and Heterodimers. *The Journal of biological chemistry* 2010;285(21);16125-16134.
- Prins GS, Korach KS. The Role of Estrogens and Estrogen Receptors in Normal Prostate Growth and Disease. *Steroids.* 2008 March;73(3);233-244.
- Prossnitz ER, Arterburn JF, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.* 2008;70;165-190.



- Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 September 24; 308(1-2): 32-38.
- Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2009;100;538-544.
- Reischl U. APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY-BASED METHODS TO THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES. *Frontiers in Bioscience* 1996;1; e72-77.
- Saad AA, Ali LM, Monein NAA, Tawab SMA. Association between estrogen receptor  $\alpha$  polymorphism and the risk for breast cancer in a group of Egyptian Women. *Bull. Alex. Fac. Med.* 2008;44(4);833-840.
- Sand PG, Schlurmann K, Luckhaus C, Gotz M, Stober G, Lesch K-P, Riederer, Franke PP, Maier W, Nothen MM, Propping P, Fritze J, Deckert J. Estrogen Receptor 1 Gene (ESR1) Variants in Panic Disorder. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 2002;114;426-428.
- Santos GM, Fairall L, Schwabe JWR. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 2011; 22(3); 87-93.
- Schuit SCE, Jong FH, Stolk L, Koek WNH, van Meurs JBJ, Schoofs MWCJ, Zillikens MC, Hofman A, van Leeuwen JPTM, Pols HAP, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women. *European Journal of Endocrinology* 2005;153; 327-334.
- Schuit SCE, Oei HHS, Witteman JCM, van Kessel CHG, van Meurs JBJ, Nijhuis RL, van Leeuwen JPTM, Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pols HAP, Uitterlinden AG. Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene Polymorphisms and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA.* 2004;291:2969-2977.
- Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 2004;6;39-52.
- Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, Humphries SE, Mendelsohn ME, Housman DE, Miller GJ. Estrogen Receptor {alpha} Gene Variation and the Risk of Stroke. *Stroke* 2005;36;2281-2282.
- Shen Y, Li D, Wu J, Zhang Z, Gao E. Joint Effects of the CYP1A1 Mspl, ERa PvuII, and ERa XbaI Polymorphisms on the Risk of Breast Cancer: Results from a Population-Based Case-Control Study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15;342-347.
- Shew ML, McGlennen R, Zaidi N, Westerheim M, Ireland M, Anderson S. Oestrogen receptor transcripts associated with cervical human papillomavirus infection. *Sex Transm Infect.* 2002 Jun;78(3):210-4.
- Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, Noh DY, Choe KJ, Ahn SH, Hirvonen A, Kim JH, Yoo KY. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003;80;127-131.

- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6;131-137.
- Sowers M, Jannausch ML, Liang W, Willing M. Estrogen Receptor Genotypes and Their Association with the 10-Year Changes in Bone Mineral Density and Osteocalcin Concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;89(2):733-739.
- Stavrou I, Zois C, Ioannidis JPA, Tsatsoulis A. Association of polymorphism of estrogen receptor  $\alpha$  gene with age of menarche. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):1101-5.
- Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews* 2007;28(5):521-574.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 2005;146(2):624-632.
- Urabe M, Yamamoto T, Naito K, Kitawaki J, Honjo H, Okada H. Study on the local estrogen biosynthesis in human uterine leiomyoma. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1990;42;1229-1236.
- van Meurs JBJ, Schuit SCE, Weel AEAM, Klift M, Bergink AP, Arp PP, Colin EM, Fang Y, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JPTM, Pols HAP, Uitterlinden AG. Association of 50 estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Human Molecular Genetics* 2003;12(14); 1745-1754.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991 Apr;10(4):506-13.
- Webster K, Taylor A, Gaston K. Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. *Journal of General Virology* 2001; 82;201-213.
- Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvänen AC, Kindmark A, Landegren U, Fermér ML, Stiger F, Persson I, Baron J, Weiderpass E. Oestrogen receptor  $\alpha$  gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res* 2004, 6;R437-R449.
- Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvänen AC, Kindmark A, Landegren U, Fermér ML, Stiger F, Persson I, Baron JA, Weiderpass E. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and endometrial cancer risk - a case-control study. *BMC Cancer* 2008;8;322.
- Weel AEAM, Uitterlinden AG, Westendorp ICD, Burger H, Schuit SCE, Hofman A, Helmerhorst TJM, VAN Leeuwen JPTM, Pols HAP. Estrogen Receptor Polymorphism

Predicts the Onset of Natural and Surgical Menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84; 3146-3150.

- Weickert CS, Miranda-Angulo AL, Wong J, Perlman WR, Ward SE, Radhakrishna V, Straub RE, Weinberger DR, Kleinman JE. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 2008;17(15);2293- 2309.
- Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedrén S, Kindmark A, Baron JA. Estrogen receptor  $\alpha$  polymorphism and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 2000;21(4);623-627.
- Welboren WJ, Sweep FCGJ, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor  $\alpha$ : what are the targets and how are they regulated? *Endocrine-Related Cancer* 2009;16;1073-1089.
- Willing M, Sowers M, Aron D, Clark MK, Burns T, Bunten C, Crutchfield M, D'Agostino D, Jannausch M. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 1998;13;695-705.
- Xu H, Long J-R, Li M-X, Deng H-W. Interaction effects between estrogen receptor  $\alpha$  and vitamin D receptor genes on age at menarche in Chinese women. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005 Jul; 26 (7);860-864.
- Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. Analysis of the PvuII Restriction Fragment-length Gene in Breast Cancer and Peripheral Blood Polymorphism and Exon Structure of the Estrogen Receptor. *Cancer Res* 1992 Janeiro 1;52;77-83.
- Yoon SH, Choi YM, Hong MA, Lee GH, Kim JJ, Im HJ, Min EG, Kang BM, Yoon BK, Moon SY. Estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Human Reproduction* 2010;25(1);283-287.
- Zárate S, Seilicovich A. Estrogen Receptors and Signaling Pathways in Lactotropes and Somatotropes. *Neuroendocrinology* 2010;92;215-223.
- Zhang y, Fan S, Meng Q, Ma Y, Katiyar P, Schlegel R, Rosen EM. BRCA1 Interaction with Human Papillomavirus Oncoproteins. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2005;280(39);33165-33177.
- Zofkova I, Zajickova K, Hill M. The estrogen receptor alpha gene determines serum androstenedione levels in postmenopausal women. *Steroids* 2002;67;815-819.
- Zwart W, Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of Cell Science* 2010;123;1253-1261.