

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Estudo do envolvimento do Sistema Nervoso Autónomo na
Etiopatogenia de tumores ginecológicos – variação polimórfica
em genes do sistema Adrenérgico e Serotoninérgico**

Raquel Pacheco Carrilho

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Maria Clara Bicho
Doutora Deodália Antunes

2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e no Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral em Lisboa

Projeto parcialmente financiado pelo Instituto de Investigação Científica Bento Da Rocha Cabral

As Referências Bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas aplicadas na revista
Nature Genetics

*Em memória do meu querido Avô
Manuel Augusto Machado Pacheco*

“It does not matter how slowly you go as long as you do not stop”

Confucius

AGRADECIMENTOS

É com enorme orgulho que concluo esta etapa importante na minha vida, a qual só foi possível concretizar com o apoio de várias pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, desta forma quero expressar a minha eterna gratidão.

Começo por agradecer ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do mesmo.

Quero igualmente agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Maria Clara Bicho, pela orientação e ajuda prestada.

À Professora Doutora Deodália Dias, Professora e Coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, por ter aceite a minha candidatura a este Mestrado e pela ajuda prestada durante o mesmo, tendo também sido a minha orientadora interna.

A todos os doentes que colaboraram no estudo e forneceram as amostras. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

Ao Professor Doutor João Pisco do Hospital *St. Louis*, ao Professor Doutor Rui Medeiros do Instituto de Oncologia do Porto e ao Professor Doutor Mário Rui Mascarenhas da Faculdade de Motricidade Humana, por terem disponibilizado as amostras biológicas dos doentes para este estudo.

Ao Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral, pelo financiamento parcial deste projeto e pela cedência de instalações e equipamentos necessários. Agradeço igualmente a todos os seus funcionários pela ajuda prestada ao longo dos trabalhos realizados.

Aos colaboradores do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina por toda a ajuda prestada, nomeadamente à Doutora Joana Ferreira, Ildegário dos Santos, Andreia Carvalho, Sara Hassam e em especial à Laura Aguiar, por todo o apoio e tempo dedicado a ajudar-me tanto na parte laboratorial como na parte teórica e pelos conhecimentos transmitidos desde o início ao fim deste trabalho.

Ao Carlos Eduardo Vilaça, por toda a ajuda informática e apoio prestado durante este trabalho e a todos os meus amigos pela motivação, amizade e boa disposição que partilharam sempre comigo.

Por último, e não menos importante, o maior agradecimento de todos vai para a minha família, em especial para a minha Mãe, que sempre me apoiou e incentivou nos estudos. Sem ela não teria chegado onde cheguei e este sonho não poderia ter sido realizado. Obrigada por todo o amor e paciência.

À minha restante família. Ao meu querido mano Gonçalo e aos meus queridos e estimados avós, Maria Fernanda e Manuel Pacheco, que sempre cuidaram de mim e desejaram ver-me realizada nos estudos.

Um sincero e sentido Obrigado a todos.

RESUMO

Os leiomiomas uterinos, também conhecidos como fibromiomas, são tumores ginecológicos benignos muito frequentes em mulheres durante a idade reprodutiva e desenvolvem-se a partir de uma única célula do músculo liso uterino. Dependentemente do local onde se vão desenvolver, são classificados consoante a sua localização dentro do útero. Estes podem desenvolver-se no útero sob a influência local de fatores de crescimento e hormonas. Num grande número de mulheres, a presença de leiomiomas uterinos passa despercebida, noutros casos, a localização e o tamanho destes tumores benignos pode afetar a qualidade de vida, sendo uma preocupação para a saúde de muitas mulheres. O carcinoma do colo do útero é considerado um dos cancros mais comuns em mulheres de todo o mundo e a sua alta taxa de mortalidade deve-se à falta de terapêuticas eficazes para eliminar a doença, tornando-se assim, uma causa de morte em mulheres de todo o mundo. A infeção pelo Vírus do Papiloma Humano, ou HPV, é considerada uma das infeções de transmissão sexual mais comum a nível mundial, podendo originar lesões benignas e malignas (carcinoma do colo do útero), sendo este, o terceiro cancro mais frequente em mulheres de todo o mundo. O carcinoma do colo do útero está associado à infeção pelo HPV transmitida sexualmente e a sua presença é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da patologia maligna. Devido à grande incidência destes dois tipos de tumores, torna-se importante estudar os mecanismos envolvidos e investigar e identificar a suscetibilidade genética para o seu desenvolvimento e progressão.

Os efeitos do sistema nervoso autónomo na biologia do cancro foram inicialmente sugeridos por observações clínicas que ligavam o stresse e a progressão do cancro. Mais recentemente, os dados farmacológicos mostraram uma progressão reduzida da doença em pacientes com cancro que foram incidentalmente expostos a bloqueadores β -adrenérgicos, estes têm sido amplamente utilizados para controlar a hipertensão e, atualmente, esses agentes podem ter implicações significativas para a terapêutica do cancro, bloqueando adrenoceptores em tecidos tumorais. Estas influências podem ser refletidas na modulação da proliferação celular, apoptose, invasão e metástase, bem como a normalização da vasculatura tumoral.

Por outro lado, a serotonina bloqueia o sistema nervoso simpático (SNS), tal acontece devido à serotonina travar o SNS e regular a libertação de catecolaminas, inibindo a sua produção. Ao existir elevada serotonina na fenda sináptica há inibição de catecolaminas e consequentemente redução dos níveis de stresse.

Estudos genéticos permitem concluir sobre a associação entre polimorfismos e o risco de desenvolver uma patologia. Neste trabalho, dois tipos de tumores ginecológicos (leiomiomas uterinos e carcinoma do colo do útero) foram utilizados como modelos para avaliar a influência dos sistemas adrenérgicos e serotoninérgicos no desenvolvimento de tumores ginecológicos, sejam eles benignos (leiomiomas) ou malignos (carcinoma do colo do útero). Para tal foram analisados polimorfismos funcionais dos genes SLC6A4 do transportador da serotonina e 5HT2A do transportador 2A da serotonina, e um polimorfismo do gene ADBR2 relacionado com o recetor β 2-adrenérgico, a fim de determinar a relevância destes polimorfismos para a suscetibilidade de tumores através de vias neurotransmissoras.

Deste modo foram analisadas amostras de DNA de mulheres com idades compreendidas entre os 19 e 89 anos, dos quais 136 correspondem a mulheres com leiomiomas, 135 correspondem a mulheres com carcinoma do colo do útero e 777 correspondem a mulheres sem qualquer patologia associada, sendo estas parte integrante do grupo controlo.

Os resultados deste estudo mostraram uma associação estatisticamente significativa entre algumas variantes genéticas e ambas as patologias. Nomeadamente o alelo Arg do gene ADBR2 está associado a um maior risco de leiomiomas (OR = 2,310), IC (95%) = [1,568 – 3,403], $p < 0,001$) e o alelo Gly do mesmo gene está associado a um efeito protetor (OR = 0,433), IC (95%) = [0,293 – 0,637], $p < 0,001$. O mesmo se verificou no carcinoma do colo do útero, em que o alelo Arg do gene ADBR2 se mostrou de risco (OR = 3,521), IC (95%) = [1,862 – 6,654], $p < 0,001$) e o alelo Gly se mostrou protetor (OR = 0,284), IC (95%) = [0,150 – 0,536], $p < 0,001$.

No polimorfismo 5-HTVNTR, no carcinoma do colo do útero verificou-se que o genótipo 12/10 teve um risco três vezes superior de desenvolver carcinoma do colo do útero (OR = 3,194; IC (95%) = [1,581 – 6,452], $p < 0,001$) e o genótipo 12/12 teve efeito protetor associado (OR = 0,433 IC (95%) = [0,206 – 0,907]; $p = 0,027$).

Os resultados apontaram para um papel proeminente do stresse no crescimento e desenvolvimento de tumores benignos e malignos, sendo que o sistema nervoso simpático e a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, têm de facto impactos funcionais e biológicos no microambiente tumoral.

Relativamente à análise epistática, verificou-se que nesta interação um dos genes pode melhorar a expressão do/s outro/s (epistasia antagonista) ou por outro lado pode reforçar a expressão do outro gene (epistasia sinérgica).

Este estudo pode ser um ponto de partida para outras equipas de investigação pesquisarem ou adaptarem terapêuticas já existentes, a novas tecnologias.

Palavras-chave: ADBR2, SLC6A4, 5HT2A

ABSTRACT

Uterine leiomyomas, also known as fibroids, are benign gynecological tumors very common in women during reproductive age that develop from a single uterine smooth muscle cell. Depending on where they will develop, they are classified according to their location within the uterus. These can develop in the uterus under the local influence of growth factors and hormones. In a large number of women, the presence of uterine leiomyomas goes unnoticed. In other cases, the location and size of these benign tumors can affect the quality of life, being a concern for the health of many women. Cervical carcinoma is considered one of the most common cancers in women worldwide and its high mortality rate is due to the lack of effective therapies to eliminate the disease, thus becoming the second leading cause of death in women all over the world. Human papillomavirus (HPV) infection is considered to be one of the most common sexually transmitted infections in the world. It can lead to benign lesions and malign (cervical carcinoma), the third most frequent cancer in women worldwide. Cervical carcinoma is associated with sexually transmitted HPV infection, and its presence is necessary, but not sufficient for the development of the disease. Due to the high incidence of these two types of tumors, it is important to study their involved mechanisms and to research and identify their genetic susceptibility for its development and progression. The effects of the autonomic nervous system on cancer biology were initially suggested by clinical observations linking stress and cancer progression. More recently, pharmacological data showed a reduced progression of the disease in cancer patients who were incidentally exposed to β -adrenergic blockers. In fact, β -adrenergic blockers have been widely used to control hypertension, and currently such agents may have significant implications for cancer therapy by blocking adrenoceptors in tumor tissues. These influences may be reflected in modulation of cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis, as well as normalization of tumor vasculature. Serotonin blocks the sympathetic nervous system (SNS), this happens because serotonin decelerates the SNS and regulates the release of catecholamines, inhibiting their production. When there is high serotonin levels in the synaptic cleft there is inhibition of catecholamines and then reduction of stress levels.

Genetic studies allow us to conclude about the association between polymorphisms and the risk of developing a pathology. In this project, two types of gynecological tumors (cervical carcinoma and uterine leiomyomas) will be used as models to evaluate the influence of the adrenergic and serotonergic systems in the development of gynecological tumors, whether benign (leiomyomas) or malignant (cervical carcinoma). Functional polymorphisms of the serotonin transporter SLC6A4 and 5HT2A genes of serotonin transporter 2A and a polymorphism of the β 2-adrenergic receptor-related ADBR2 gene were analyzed to determine the relevance of these polymorphisms for the susceptibility of tumors through neurotransmitter pathways.

For this, DNA samples from women aged 19-89 years were analyzed, of which 136 corresponded to women with leiomyomas, 135 corresponded to women with cervical carcinoma, and 777 corresponded to women without any associated pathology, part of the control group.

The results of this study showed a statistically significant association between some genetic variants and both pathologies. In particular, the presence of the Arg allele of the ADBR2 gene is associated with a higher risk of leiomyomas (OR = 2,310), CI (95%) = [1,568 – 3,403], $p < 0.001$) and the Gly allele of the same gene is associated with a protective effect (OR = 0.433), CI (95%) = [0.293 – 0.637], $p < 0.001$. The same was observed in cervical carcinoma, where the Arg allele of the ADBR2 gene was shown to be at risk (OR = 3,521), CI (95%) = [1,862 – 6,654], $p < 0.001$), and the Gly allele was protective (OR = 0,284), CI (95%) = [0,150 – 0,536], $p < 0.001$.

In the 5-HTTVNTR polymorphism, in cervical carcinoma, 12/10 genotype was found to have a three-fold increased risk of developing carcinoma (OR = 3,194 (CI = 95%) = [1,581 – 6,452], $p < 0.001$) and genotype 12/12 had associated protective effect (OR = 0,433 (CI (95%) = [0,206 – 0,907], $p = 0,027$).

The results pointed that stress has a prominent role in the growth and development of benign and malignant tumors. The sympathetic nervous system and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis have functional and biological impacts on the tumor microenvironment.

Taking into account the epistatic analysis, it has been found that in this interaction one of the genes may enhance the expression of the other/s (antagonist epistasis) or on the other hand may enhance the expression of the other gene (synergistic epistasis).

This study may be a starting point for other research teams to research or adapt existing therapies, to new technologies.

Keywords: ADBR2, SLC6A4, 5HT2A

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
β 2AR	Recetor β_2 -Adrenérgico (<i>Beta 2 Adrenergic Receptor</i>)
5-HT	Serotonina (5-Hidroxitriptamina)
5-HTR	Recetor da serotonina
5-HTR _{2A}	Transportador 2A da serotonina
5-HTT	Transportador da serotonina
A	Adenina
ADRB2	Recetor β_2 -Adrenérgico (<i>Beta 2 Adrenergic Receptor</i>)
AINE'S	Anti-Inflamatórios Não Esteroides
Arg	Arginina
Cl	Ião Cloro
CNVs	Polimorfismo de Variação do número de cópias (<i>Copy Number Variants</i>)
CRH	Hormona Libertadora de Corticotrofina (<i>Corticotropin-releasing hormone</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EAU	Embolização das Artérias Uterinas
Gly	Glicina
gl	Graus de Liberdade
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina (<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>)
GPCR	Recetor acoplado à proteína G (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GWAS	Estudos de associação genómica ampla (<i>Genome Wide Association Studies</i>)
H ₂ O	Água
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human Papiloma Virus</i>)
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
IC	Intervalo de Confiança
IL-1 β	Interleucina-1
IMC	Índice de massa corporal
Indels	<i>Insertion/Deletion</i>
K ⁺	Ião potássio
Kb	Quilobase
Kg	Quilograma

L	<i>Long</i>
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Na⁺	Ião Sódio
ng	Nanograma
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORFs	Grelha de Leitura aberta/Unidades de tradução (<i>Open Read Frames</i>)
P	Valor de p (<i>p-value</i>)
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SERT	Transportador da serotonina (<i>Serotonin transporter</i>)
SLC6A4	<i>Solute Carrier Family 6 Member 4</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
V	<i>Volts</i>
VNTR	Repetições em <i>tandem</i> de número variável (<i>Variable Number Tandem Repeat</i>)
μl	Microlitro
μM	Micromolar
χ²	Qui-quadrado
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	IV
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tumores – Características gerais	1
1.2 Útero – Anatomia e fisiologia	2
1.3 Tumores Ginecológicos - Leiomiomas Uterinos	3
1.3.2 Epidemiologia.....	4
1.3.3 Sintomas, diagnóstico e tratamento	4
1.3.4 Embolização das artérias uterinas.....	6
1.4 Tumores Ginecológicos - Carcinoma do colo do útero	7
1.4.1 Características gerais	7
1.4.1 Epidemiologia HPV – Carcinoma do colo do útero	8
1.4.3 Etiologia, HPV e progressão.....	8
1.4.4 Sintomas, diagnóstico e prevenção	10
1.5 Sistema nervoso Autónomo	11
1.6 Polimorfismos Genéticos	13
1.7 Fatores Genéticos Associados aos Tumores Ginecológicos	14
1.7.1 Sistema Serotoninérgico	14
1.7.2 Recetor β 2-Adrenérgico.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Amostra populacional	21
3.1.1 Caracterização das populações	21
3.2 METODOLOGIA	22
3.2.1 Extração de DNA.....	22
3.2.2 Quantificação de DNA.....	22

3.2.3 Amplificação do DNA.....	22
3.2.4 Genotipagem do DNA.....	23
3.3 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Caracterização das populações em estudo.....	25
4.1.1 População de mulheres com leiomiomas.....	25
4.1.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero.....	25
4.1.3 População de grupo controlo.....	25
4.2 Análise do polimorfismo 5-HTTVNTR do gene do transportador da serotonina.....	26
4.2.1 População de mulheres com leiomiomas.....	26
4.2.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero.....	27
4.3 Análise do polimorfismo T102C do gene do recetor 2A da serotonina.....	28
4.3.1 População de mulheres com leiomiomas.....	28
4.3.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero.....	29
4.4 Análise do polimorfismo Arg16Gly do gene do recetor β_2 -adrenérgico.....	31
4.4.1 População de mulheres com leiomiomas.....	31
4.4.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero.....	32
4.5 Análise de relações epistáticas.....	34
4.5.1 Análise das relações epistáticas nos leiomiomas.....	34
4.5.2 Análise das relações epistáticas no carcinoma do colo do útero.....	36
5. DISCUSSÃO.....	39
5.2 Discussão da análise dos polimorfismos na população de mulheres com leiomiomas e carcinoma do colo do útero.....	39
5.2 Discussão dos resultados de relações epistáticas nos leiomiomas e carcinoma do colo do útero.....	43
6. CONCLUSÕES.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS.....	54
Anexo I – Consentimento Informado.....	54
Anexo II – Tampões para PCR e eletroforese em gel de agarose e enzimas de restrição utilizadas.....	55
Anexo III – Géis de agarose com perfil eletroforético.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Desenvolvimento tumoral.....	1
Figura 1.2 - Aparelho reprodutor feminino	2
Figura 1.3 - Localização dos leiomiomas uterinos.....	3
Figura 1.4 - Proposta de tratamento dos leiomiomas.	5
Figura 1.5 - Técnica de embolização das artérias uterinas.....	6
Figura 1.6 - Zona de transformação do colo do útero (a cinzento)	7
Figura 1.7 - Modelo epidemiológico do cancro do colo do útero	7
Figura 1.8 - Representação esquemática do genoma do HPV.....	9
Figura 1.9 - Ciclo de vida do HPV	10
Figura 1.10 - Ativação dos recetores acoplados às proteínas G	12
Figura 1.11 - Sinalização da serotonina no SNC.....	15
Figura 3.1 - IBM® SPSS Software utilizado na análise estatística.....	24
Figura 9.1 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genómica contendo o polimorfismo 5HTTVNTR do gene SLC6A4.	56
Figura 9.2 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genómica contendo o polimorfismo 5-HTR _{2A} do gene 5HTR2A.....	56
Figura 9.3 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genómica contendo o polimorfismo Arg16Gly do gene ADBR2.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Relações funcionais entre os polimorfismos em estudo e o risco de cancro.....	13
Tabela 3.1 - Primers, condições de PCR, componentes e tamanho dos fragmentos para cada polimorfismo em estudo	22
Tabela 3.2 - Condições de restrição, componentes e genótipo possível para cada polimorfismo em estudo	23
Tabela 4.1 - Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com leiomiomas e população controlo	26
Tabela 4.2 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com leiomiomas e população controlo	26
Tabela 4.3 - Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo	27
Tabela 4.4 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo	28
Tabela 4.5 - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C na população de mulheres com leiomiomas e população controlo.....	28
Tabela 4.6 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo T102C na população de mulheres com leiomiomas e população controlo	29
Tabela 4.7 - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo	30
Tabela 4.8 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo T102C na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo	30
Tabela 4.9 - Distribuição genotípica do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com leiomiomas e população controlo.....	31
Tabela 4.10 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com leiomiomas e população controlo	32
Tabela 4.11 - Distribuição genotípica do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo.....	32
Tabela 4.12 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo	33
Tabela 4.13 - Genótipos em estudo nas relações epistáticas	34
Tabela 4.14 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA -12/12 dos genes ADBR2 e SLC6A4 e leiomiomas	34
Tabela 4.15 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - 12/12 dos genes ARB2 e SLC6A4 e leiomiomas	35

Tabela 4.16 – Associação epistática entre a combinação genotípica AA – TT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas.....	35
Tabela 4.17 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - TT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas.....	35
Tabela 4.18 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - CT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas.....	36
Tabela 4.19 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - 12/10 dos genes ADRB2 e SLC6A4 e carcinoma do colo do útero	36
Tabela 4.20 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - CT dos genes ADRB2 e HTR2A e carcinoma do colo do útero.....	37
Tabela 4.21 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - CC dos genes ADRB2 e HTR2A e carcinoma do colo do útero.....	37
Tabela 4.22 - Associação epistática entre a combinação genotípica 10/10 - CC dos genes SLC6A4 e HTR2A e carcinoma do colo do útero.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores – Características gerais

A célula é a unidade básica da vida. Um tumor é designado por um conjunto de células que perderam a capacidade de responder aos mecanismos que controlam o seu crescimento, apresentando assim um crescimento anormal. Os tumores são patologias com uma expressão genética anormal. Dado isto podemos considerar dois tipos de tumores:

- Benignos: podem surgir em qualquer tecido e não invadem tecidos adjacentes, podendo fazer compressão ou obstrução de estruturas vizinhas. O seu crescimento é regular e localizado ¹;
- Malignos: subdividem-se em carcinoma *in-situ*, que se desenvolvem no epitélio da célula basal, não provocando rotura na membrana basal, estando restritas ao local da sua origem, e carcinoma invasivo, que possui a capacidade invasiva ou rotura da membrana basal e mesênquima subjacente. Estes tumores necessitam dos nutrientes que chegam através da corrente sanguínea (em tecidos normais) e alguns produzem proteínas que estimulam o crescimento de vasos sanguíneos no tumor (angiogénese), permitindo assim que ocorra um crescimento contínuo tumoral. Podem ainda ser transportados fragmentos tumorais pelos vasos linfáticos e sanguíneos para outros locais ou órgãos do corpo, onde podem produzir tumores secundários noutros tecidos (metástases) ¹.

O processo pela qual uma célula normal se transforma numa célula tumoral não é imediato e engloba várias etapas (**Fig.1.1**). A primeira etapa deste processo é a iniciação e consiste numa etapa essencial onde ocorre a indução de um agente carcinogénico. Uma vez que tenha ocorrido não há desenvolvimento imediato de um carcinoma invasivo, pois as células afetadas podem persistir estacionárias durante algum tempo (carcinoma intrapitelial). Caso estas não persistam, as células evoluem para um carcinoma ¹.

Estudos clínicos e epidemiológicos realizados nos últimos anos, forneceram evidências de ligações entre o stress, a depressão e o desenvolvimento de tumores. Estudos recentes identificaram vias de sinalização específicas que afetam a progressão do tumor e consequentes metástases ².

Neste trabalho, foram estudados dois tipos de tumores ginecológicos: tumores benignos (leiomiomas uterinos) e tumores malignos (carcinoma do colo do útero).

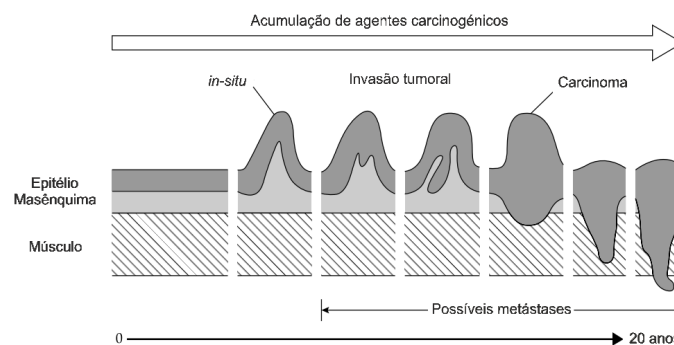


Figura 1.1 - Desenvolvimento tumoral. Esquema da progressão de um tumor *in-situ* para tumor invasivo através de acumulações de alterações durante um período de tempo. As mudanças são influenciadas por exposições ao meio e pela resposta do hospedeiro face a agentes carcinogénicos (Adaptado de Knowles, M. & Selby, P. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. (Oxford University Press, 2005).

1.2 Útero – Anatomia e fisiologia

Conhecer o sistema reprodutor feminino e a sua anatomia é fundamental para a compreensão da sua fisiologia e fisiopatologia. O útero é um órgão importante na mulher e essencial na reprodução humana, sendo a cavidade uterina onde o óvulo fecundado se dirige e deverá encontrar condições necessárias e propícias ao seu desenvolvimento no endométrio ³.

O útero (**Figura 1.2**) encontra-se na cavidade pélvica com dimensões variáveis, medindo cerca de 7,5 cm de comprimento e 5 cm de largura (diâmetro transversal). É ligeiramente achatado no sentido ântero-posterior e encontra-se com a porção mais arredondada e de maior diâmetro transversal, o fundo, orientado para cima e a porção mais estreita corresponde ao colo do útero, orientada para baixo. A parede uterina é composta por três camadas: camada serosa (externo), camada muscular (miométrio) e camada mucosa (endométrio). A serosa é constituído pelo peritoneu, subjacente a este existe o miométrio, formado por fibras musculares lisas; e a camada que reveste internamente o útero, o endométrio, é formado por epitélio simples e tecido conjuntivo ⁴.

No interior do útero, situa-se a cavidade uterina que continua com o canal cervical (colo do útero) e abre na vagina. A vagina termina na vulva que está em contacto com o exterior. O colo do útero inclui o canal cervical o endocolo (canal cervical) e o exocolo, que é a porção do colo que está localizada no fundo da vagina. Durante o período menstrual, o sangue e os tecidos que constituem a camada interna do útero (endométrio) são libertados. Durante a gravidez, o colo do útero encontra-se fechado para manter o feto no interior do útero, durante o parto o colo do útero dilata-se para permitir a passagem do feto através da vagina. Após a gestação, o útero demora 6 a 8 semanas para voltar à sua condição de repouso inicial ^{3 4}.

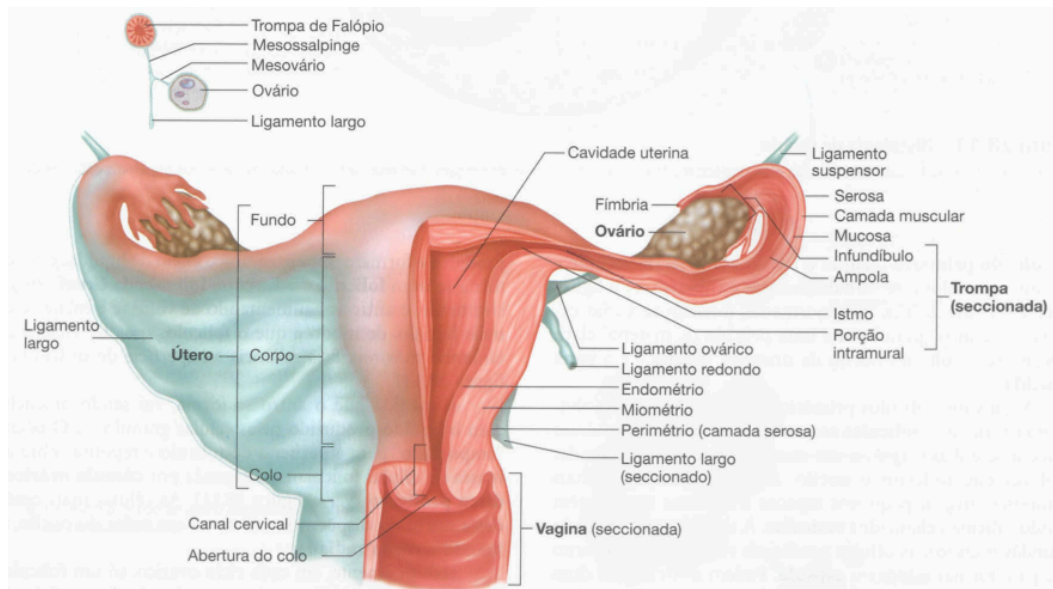


Figura 1.2 - Aparelho reprodutor feminino. Vista anterior do útero, vagina, trompas uterinas, ovários e ligamentos associados. O útero as trompas e a vagina apresentam uma secção cortada para visualização da anatomia interna (Rod R., S., Trent D., S. & Tate, P. Anatomia e Fisiologia, 6a ed. (Lusociência, 2003).

1.3 Tumores Ginecológicos - Leiomiomas Uterinos

1.3.1 Características gerais

Os leiomiomas (também conhecidos por fibromiomas uterinos) são tumores uterinos benignos que se originam a partir de células do músculo liso das paredes do útero. Em determinados casos podem desenvolver-se noutros locais do corpo, como no aparelho gastrointestinal ou nas paredes das artérias (leiomiomatose intravenosa) ⁵. Os leiomiomas uterinos são compostos por matriz extracelular com colagénio, fibronectina e proteoglicanos, e podendo ser únicos ou múltiplos, classificam-se de acordo com a sua localização ^{6 7} (**Fig.1.3**):

- Subserosos – na porção mais externa da parede uterina (seroso)
- Intramurais – dentro da parede uterina (miométrio)
- Submucosos – contidos ou com entrada na cavidade uterina (endométrio)

Alguns submucosos ou subserosos podem ficar ligados por um pedículo, designando-se leiomiomas pediculados ⁸.

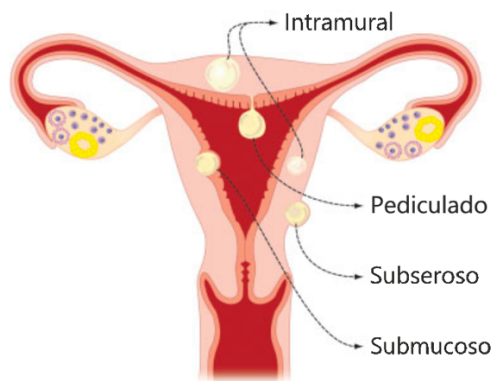


Figura 1.3 - Localização dos leiomiomas uterinos. A localização dos leiomiomas contribui para os vários sintomas apresentados (Adaptado de McWilliams, M. M. & Chennathukuzhi, V. M. Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. Semin. Reprod. Med. 35, 181–189 (2017).

Apesar da sua etiologia ser ainda desconhecida, atualmente, os leiomiomas são considerados os tumores benignos uterinos mais comuns nas mulheres em idade reprodutiva ^{6 9 10}, aparecendo raramente antes da menarca ¹¹ e com tendência a regredir após a menopausa ¹², o que torna evidente a sua dependência hormonal e o papel do estrogénio e da progesterona na regulação do seu crescimento ¹³. Ocasionalmente crescem durante a gravidez, em idades avançadas ¹⁴, um fenómeno que pode ser causado pelo aumento dos estrogénios e pelo aumento do fluxo de sangue e edema ¹⁵. A hipótese da dependência hormonal foi corroborada em projetos já realizados no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa, em que se verificou que as concentrações de estradiol circulante eram mais elevadas nas mulheres com leiomiomas ¹⁶.

Os leiomiomas são tumores benignos, no entanto podem progredir para tumores malignos (leiomiossarcomas) com uma incidência estimada de 0,1% ¹⁷.

1.3.2 Epidemiologia

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos epidemiológicos a fim de encontrar e avaliar os fatores de risco envolvidos na origem e desenvolvimento de leiomiomas. Os fatores de risco são variados: a idade da menarca, observou-se que uma menarca precoce (<10 anos) está associada a um aumento de risco para o aparecimento de leiomiomas, enquanto que uma menarca tardia (>16 anos) diminui o risco de leiomiomas uterinos¹⁸; a predisposição genética, uma vez que os leiomiomas são 2.2 vezes mais frequentes entre familiares de primeiro grau em famílias com dois ou mais indivíduos com leiomiomas¹⁹; a etnia, uma vez que os leiomiomas são mais comuns em mulheres de origem Africana, tendo estas leiomiomas 2 a 3 vezes maiores, em idades mais jovens e em maior tamanho, comparativamente às mulheres caucasianas,²⁰; o peso, uma vez que o risco de desenvolver leiomiomas é proporcional ao aumento do peso corporal, sendo que o risco aumenta cerca de 21% por cada 10 kg de peso²¹; a paridade, uma vez que existem evidências epidemiológicas que indicam que o seu aumento diminui o risco²², havendo assim uma associação inversa entre paridade e leiomiomas, sugerindo a gravidez como efeito protetor^{23 24}; o consumo de álcool, existindo associações positivas com os leiomiomas²⁵; e o consumo de cafeína, pois mulheres com menos de 35 anos de idade com alto consumo de cafeína foram associadas ao aumento do risco de leiomiomas²⁶.

Alguns fatores de risco não são consensuais e ainda geram alguma controvérsia tais como: dieta, exercício físico, toma de contraceptivos orais, hormonas de substituição e hábitos tabágicos, todos estes fatores carecem de mais estudos para esclarecer o seu papel exato na etiologia dos leiomiomas uterinos²⁷.

Existem ainda estudos que associam positivamente o diagnóstico de leiomiomas ao stresse e depressão, apoiando a hipótese de que o stresse aumenta o risco de leiomiomas uterinos^{28 29}, este pressuposto tem por base evidências de que o sistema nervoso pode ter influência no seu desenvolvimento, nomeadamente ao nível dos sistemas adrenérgico e serotoninérgico. A depressão pode causar desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, que por sua vez pode afetar a síntese de hormonas envolvidas na patogénese de leiomiomas uterinos^{28 30 31}.

1.3.3 Sintomas, diagnóstico e tratamento

Os padrões de crescimento, as localizações dentro do útero e o número de leiomiomas são os principais determinantes das manifestações clínicas dos leiomiomas³². Apesar de na maioria dos casos serem assintomáticos, estes podem causar vários sintomas em muitas mulheres, tais como dores na zona pélvica geralmente associadas à torção de leiomiomas pediculados; menstruações com padrões hemorrágicos excessivos, aumento da cavidade uterina e da área de superfície do endométrio; sintomas de pressão nos órgãos pélvicos devido à pressão que os leiomiomas exercem nos órgãos adjacentes; aumento do perímetro abdominal devido ao crescimento dos leiomiomas¹⁵ e problemas obstétricos tais como abortos e partos prematuros, os quais sofrem maior risco com o aumento da presença de múltiplos leiomiomas³³.

O diagnóstico dos leiomiomas ocorre através de exame ginecológico, sendo depois necessário recorrer a técnicas de imagiologia para confirmar a suspeita clínica de leiomioma. O diagnóstico definitivo pode ser determinado através de ultrassonografia, ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada (TC) ou através de histerossalpingografia, um procedimento que consiste na obtenção de imagens por meio de raios X do útero e trompas contrastados⁸.

As mulheres com leiomiomas assintomáticos não necessitam de tratamento, apenas vigilância e exame ginecológico de rotina, ³². Por sua vez, o tratamento de leiomiomas sintomáticos deve ser individualizado (Fig.1.4), uma vez que são levadas em consideração várias características como a idade da paciente (proximidade da menopausa), o desejo de gestação, os sintomas provocados, o tamanho, o número e a localização dos leiomiomas ³⁴. O tratamento de leiomiomas sintomáticos pode ser clínico ou cirúrgico. O objetivo do tratamento clínico é o alívio dos sintomas. Como na maioria das mulheres torna-se assintomático após a menopausa, o tratamento clínico pode tornar os sintomas aceitáveis até a chegada desta, evitando assim os riscos associados aos tratamentos cirúrgicos ³². O tratamento clínico passa pela toma de anovulatórios orais, eficazes na redução do sangramento menstrual ³⁴; progestagênicos que regulam negativamente o recetor da progesterona ³⁵; anti-inflamatórios não esteroides (AINE's), utilizados para regular no fluxo menstrual excessivo e dismenorreia ³⁶ e análogos da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH, do inglês Gonadotropin-Releasing Hormone), que conseguem reduzir os leiomiomas até 50% do seu volume em três meses de terapêutica, mas que ao promoverem a perda de massa óssea e sintomas menopáusicos, não devem ser usados por mais de seis meses ³². Este conjunto de fármacos permite o controlo dos leiomiomas e dos seus sintomas, no entanto os seus efeitos são temporários, fazendo da terapêutica clínica uma abordagem mais comum em mulheres na peri menopausa ou como estratégia pré-cirúrgica ³².

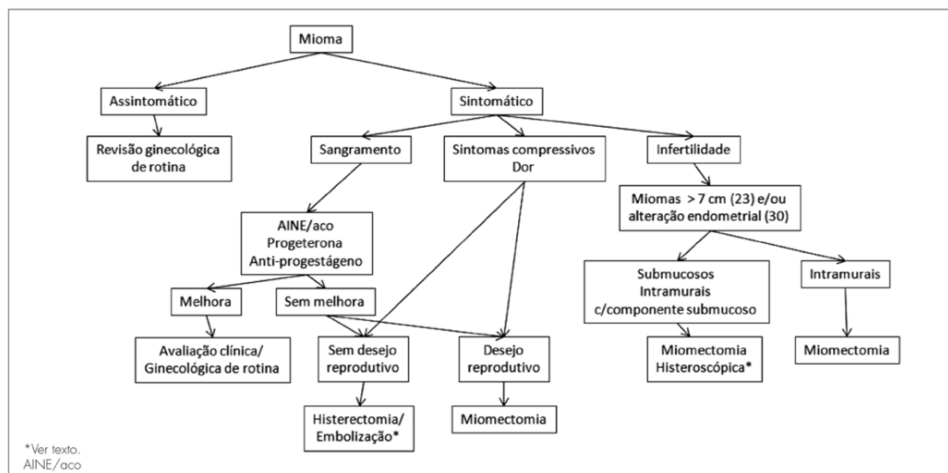


Figura 1.4 - Proposta de tratamento dos leiomiomas. Considerando a situação clínica e alternativas atuais (Corleta, H. von E., Chaves, E. B. M., Krause, M. S. & Capp, E. Current treatment of leiomyomas. Rev. Ginecol. e Obs. 29, 324–328 (2007).

No tratamento cirúrgico podem ser usadas diversas técnicas, dependendo do tamanho, número e localização dos leiomiomas. A histerectomia é um método definitivo que consiste na remoção total do útero laparoscopia ou laparotomia. Esta modalidade de tratamento é indicada para mulheres que tenham leiomiomas sintomáticos e que não tenham mais desejo de gestação, pois este método elimina a possibilidade de uma posterior gravidez e é prescrita a mulheres com leiomiomas sintomáticos para as quais os tratamentos clínicos falharam ³².

As mulheres que optam pela histerectomia relatam melhoria na qualidade de vida e têm melhores índices de satisfação comparativamente a outros tratamentos ³⁷. Por outro lado, a miomectomia permite preservar a fertilidade, pois conserva o útero, retirando apenas os leiomiomas individualmente através de cirurgia. As desvantagens deste método passam por complicações relacionadas com o procedimento cirúrgico e risco de reincidência, que aumenta com o número de leiomiomas ³², fazendo com que cerca de 20 a 25% de mulheres tenham de repetir o procedimento ou optar por histerectomia como terapêutica alternativa e definitiva ³⁷. Existem ainda outras opções de terapia, como a embolização das artérias uterinas ³⁷.

1.3.4 Embolização das artérias uterinas

A técnica surgiu pela primeira vez em França em 1989 por um ginecologista Francês, Jacques Ravina, como terapêutica inicial com a finalidade de diminuir a hemorragia após a miomectomia. Como se verificou uma grande redução da hemorragia, a partir de 2005 passou a ser efetuada como alternativa terapêutica^{38 39}. Em Portugal, realizou-se pela primeira vez em Junho de 2004 pelo Prof. Dr. João Martins Pisco, numa mulher anteriormente submetida a duas miomectomias sem resolução do quadro de menorragias^{7 9 10 38 40}.

Qualquer doente sintomática pode ser tratada por esta técnica, caso não seja portadora de tumores malignos ou de infeção pélvica³⁸. A embolização das artérias uterinas é uma opção para mulheres com leiomiomas sintomáticos que têm contraindicação ou que não desejam ser submetidas a riscos cirúrgicos^{32 41}. O procedimento (**Fig. 1.5**) é realizado com anestesia local e consiste na interrupção da circulação sanguínea que irriga os leiomiomas através da introdução de um cateter (cateterização) numa artéria femoral. Depois de introduzido são injetadas pequenas partículas ou polímeros de polivinil-álcool ou microesferas de polímero de tris-acril nos vasos sanguíneos das artérias uterinas que irrigam os leiomiomas, produzindo assim alterações isquémicas e bloqueando a irrigação sanguínea^{40 10}, por consequente estes deixam de ter irrigação e atrofiam, ficando inativos e reduzindo o seu tamanho em cerca de 50% e a sintomatologia atenuada em cerca de 85%. Esta técnica é pouco invasiva, tem duração de 30 a 90 minutos, requer pouco tempo de recuperação, e permite conservar o útero não comprometendo a fertilidade, sendo uma boa alternativa aos métodos cirúrgicos supramencionados^{10 15 32 10 38 41 42 107}.

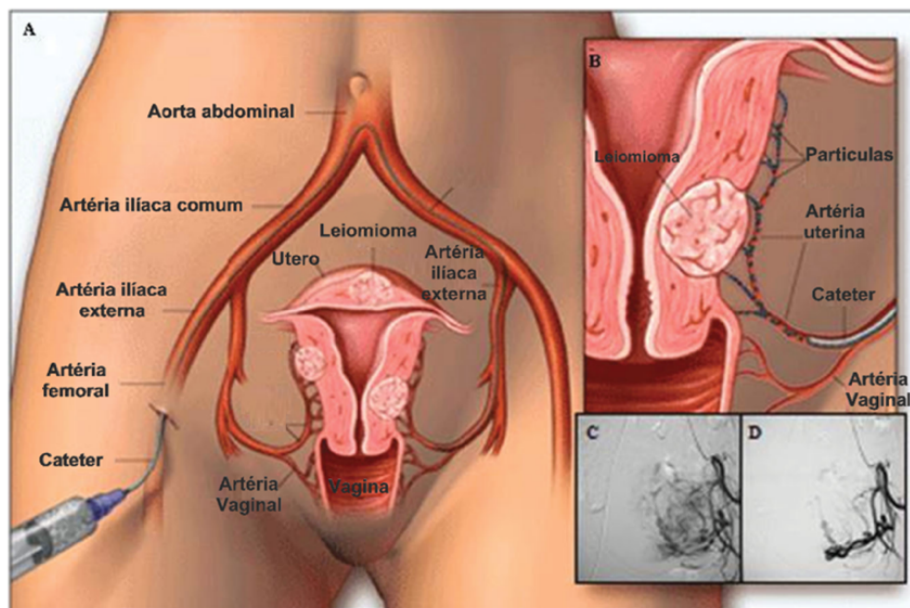


Figura 1.5 - Técnica de embolização das artérias uterinas. A técnica produzirá lesão isquémica aos leiomiomas, fazendo com que diminuam. Legenda: A e B – Ilustrações demonstrativas da técnica, C – Angiograma que demonstra o fluxo sanguíneo antes do procedimento, D – Angiograma que demonstra o fluxo sanguíneo após o procedimento. (Adaptado de Tropeano, G., Amoroso, S. & Scambia, G. Non-surgical management of uterine fibroid. Hum. Reprod. Update 14, 259–274 (2007).

1.4 Tumores Ginecológicos - Carcinoma do colo do útero

1.4.1 Características gerais

A investigação na etiologia do cancro no colo do útero nas últimas décadas tem feito grandes avanços e uma das principais descobertas foi a demonstração de que o cancro no colo do útero é causado pela infeção persistente de vários genótipos de alto risco do Vírus do Papiloma Humano (da sigla inglesa, HPV), sendo o cancro o resultado final de uma sequência de infeções a longo tempo. Esta descoberta foi destacada com Prémio Nobel em 2008, atribuída a Harald Zur Hausen^{43 44}.

Sendo o colo do útero uma zona suscetível à carcinogénese do HPV, as infeções por HPV são facilmente transmitidas através do contacto sexual com um parceiro infetado⁴⁵. A zona de transformação (**Fig.1.6**) aumenta durante a puberdade e gravidez, o que facilita a infeção durante estes períodos pois as células desta zona são mais vulneráveis à infeção⁴⁶. Apesar da maioria dos cancros associados ao HPV ocorrerem no colo do útero, o vírus também está associado ao desenvolvimento de outros tumores, nomeadamente na vagina, vulva, ânus, pénis⁴⁵, cavidade oral e orofaringe⁴⁷.

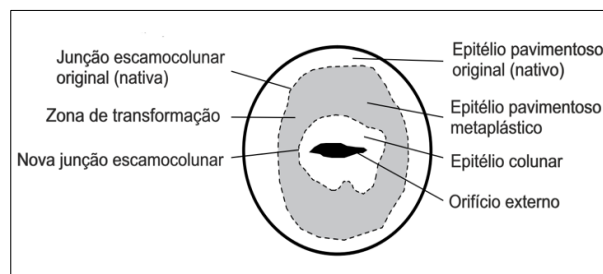


Figura 1.6 - Zona de transformação do colo do útero (a cinzento). Quando exposto ao ambiente ácido da vagina, o epitélio colunar que se estende para fora do canal cervical até à superfície do colo é substituído por epitélio pavimentoso (mais resistente), este processo normal de substituição denomina-se metaplasia escamosa (Organização Mundial da Saúde. Controle integral do câncer do colo do útero - Guia de práticas essenciais (2016).

As etapas necessárias na carcinogénese do colo do útero (**Fig.1.7**) incluem a infeção por HPV, a persistência do vírus ao longo de um determinado período de tempo (infeção persistente) que posteriormente progride para pré-cancro e por fim invasão. No entanto o retrocesso da infeção é possível, desaparecendo espontaneamente após alguns meses⁴⁵. Embora a presença do HPV seja necessária, esta não é suficiente, sendo outros cofatores determinantes para o desenvolvimento da patologia⁴⁸. O carcinoma no colo do útero desenvolve-se lentamente e é muitas vezes estabelecido mais de uma década após a infeção inicial. Este só se desenvolve em mulheres cujas infeções não se resolvem espontaneamente, ou seja, lesões persistentes⁴⁹.

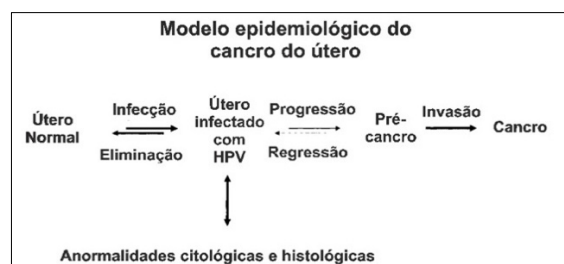


Figura 1.7 - Modelo epidemiológico do cancro do colo do útero. As principais etapas da carcinogénese cervical são a infeção pelo HPV, a progressão para pré-cancro e a invasão. A persistência do vírus é necessária para a progressão e invasão, sendo outros fatores determinantes para a progressão da infeção em tumor (Adaptado de Schiffman, M. & Kjaer, S. K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. **20852**, 14–9 (2003).

1.4.1 Epidemiologia HPV – Carcinoma do colo do útero

A infecção pelo vírus HPV é muito frequente, sendo uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns a nível global, como tal os homens e mulheres sexualmente ativos estão envolvidos na cadeia epidemiológica e são capazes de ao mesmo tempo serem portadores assintomáticos, transmissores e também serem infetados pelo HPV ⁴⁴. A maioria das pessoas sexualmente ativas irá adquirir o HPV em algum momento da sua vida, por sua vez a infecção será espontânea, autolimitada e assintomática, estima-se que no geral, 79% das mulheres sexualmente ativas serão infetadas com pelo menos um tipo de HPV na sua vida ⁵⁰.

O HPV apresenta uma distribuição geográfica considerável, sendo que a maioria das infecções ocorrem em regiões subdesenvolvidas ⁴⁶. A distribuição geográfica do HPV apresenta uma elevada prevalência no Leste de África, na América do Sul e nas Caraíbas, sendo menos comum na Austrália, América do Norte e Ásia Ocidental ^{46 51 52}. A principal razão destas disparidades deve-se à falta de programas organizados e eficazes na prevenção, deteção precoce e tratamento adequado em tempo oportuno, bem como a falta de acesso a esses programas ⁴⁶.

A organização Mundial de Saúde estima 266 mil mortes por ano e 530 mil novos casos de cancro no colo do útero por ano ^{53 54}. Nas últimas três décadas a taxa de incidência de cancro no colo do útero e a taxa de mortalidade diminuíram nos países desenvolvidos, tal mudança deve-se em grande parte à implementação de planos preventivos nos sistemas de saúde tais como rastreio, diagnóstico precoce, vacinas e tratamento de lesões precursoras em fase inicial, evitando assim a progressão da doença maligna ⁴⁶.

1.4.3 Etiologia, HPV e progressão

O HPV é exclusivo de transmissão sexual e pode ser transmitido pelo contato direto das áreas genitais ^{44 46}. Existem mais de 100 tipos de HPV identificados e cerca de 13 são classificados de alto risco (oncológicos) (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), uma vez que estão mais associados a doenças malignas, sendo consideradas os agentes causadores da maioria dos cancros do colo do útero, estando também associadas a outros carcinomas como na vulva, pénis, ânus e cavidade oral e outros locais ^{43 50}; os tipos 16 e 18 são responsáveis por 60% e 20% dos cancros cervicais, respetivamente, sendo as mais clinicamente relevantes, representando 70% dos tumores cervicais ^{43 50 49 55 56}; por sua vez, os tipos de baixo risco (HPVs 6 e 11), são as menos agressivas, não causam cancro no colo do útero mas estão associadas a 90% das verrugas anogenitais (condilomas) e alterações celulares benignas ^{43 44 50 49}.

O vírus do HPV pertence à família Papoviridae – género Papillomavirus. Apesar do seu pequeno tamanho, a sua biologia molecular é bastante complexa ⁵⁷. O seu genoma consiste numa molécula de DNA circular (Fig. 1.8) com aproximadamente 8Kb, protegida por uma cápside constituída por duas proteínas estruturais (L1 e L2). O genoma está dividido em três regiões, de acordo com a localização e propriedades funcionais, sendo estas: a região precoce “E” (do inglês, Early) e a região tardia “L” (do inglês, Late) ambas denominadas ORFs (Open Read Frames) ou unidades de tradução, e uma terceira região regulatória não codificante denominada URR (upstream regulatory region). Na região tardia “L” encontram-se dois genes (L1 e L2) responsáveis pela formação da cápside, já na região precoce “E”, encontram-se seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) responsáveis pela replicação do DNA viral (E1 e E2), transcrição do DNA (E2), montagem e libertação de novas partículas virais dentro das células infetadas (E4), transformação celular (E5, E6, E7) e imortalização (E6 e E7) ^{57 58 59}.

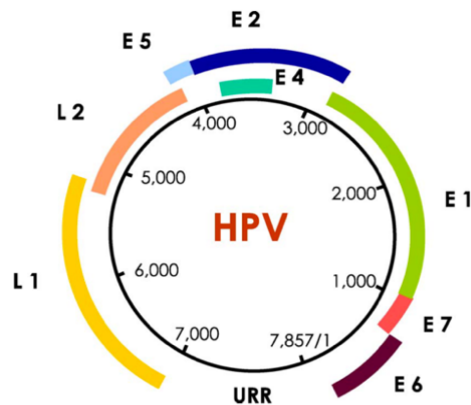


Figura 1.8 - Representação esquemática do genoma do HPV. Na figura está representado o genoma circular de cadeia dupla do vírus com as três regiões do genoma: a região não codificante URR (upstream regulation region) localizada entre L1 e E6, possuindo entre 500 e 1000 pb, a região precoce (E) com os seis genes precoces e a região tardia (L) com os dois genes tardios (Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24, 1–10 (2006).

O ciclo de vida do papiloma difere das restantes famílias de vírus, pois a infecção exige a disponibilidade de células epiteliais epidérmicas ou mucosas (células da camada basal) que ainda não têm a capacidade de proliferar, devido à sua baixa atividade⁵⁹. Este vírus adapta-se aos tecidos do hospedeiro, usando a sua maquinaria celular⁵⁸.

Para entender como a infecção por HPV resulta em desenvolvimento maligno, é importante primeiro descrever o seu ciclo de vida incomum, desde a etapa em que este se estabelece no hospedeiro até ao momento em que ocorre a sua transformação. O ciclo de vida do HPV é iniciado quando partículas virais infetam inicialmente a camada basal do epitélio, onde se ligam e entram no interior das células, através de pequenas lesões ou fissuras, este processo ocorre geralmente em micro lesões da pele ou da mucosa. Já nas células infetadas, o genoma viral é replicado resultando numa média de 100 cópias por célula infetada, podendo manter-se esta situação durante um longo período de tempo. Neste processo as proteínas virais precoces E1 e E2 são essenciais para a replicação, neste período dá-se então a persistência viral^{58 59}. Enquanto as células infetadas se dividem (células-filhas) ao longo da membrana basal e a população se espalha sofrendo diferenciação terminal, os genes tardios são expressos e algumas células infetadas migram para as camadas superiores (camada supra basal), onde os genes virais vão ser ativados, o DNA viral replicado e as proteínas da cápside formadas. Nesta altura a formação de partículas virais ocorre. De seguida as partículas são libertadas na superfície e podem infetar outros tecidos, podendo reiniciar o processo de infecção^{58 59}.

Dado isto, podemos descrever o ciclo de vida do HPV em quatro etapas distintas (Fig. 1.9): infecção pelo HPV, persistência viral na camada basal durante um certo período de tempo, progressão de células persistentemente infetadas para pré-cancro e nova invasão^{45 60}.

Constatou-se que uma grande percentagem de mulheres infetadas por HPV elimina a infecção através de mecanismos imunológicos, ou seja, têm regressão espontânea. Para o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero também é importante a presença de vários cofatores além do genótipo viral. Os cofatores determinantes para o desenvolvimento de uma infecção persistente passam por: consumo tabágico, toma prolongada de contraceptivos orais, paridade, coinfeção com outros agentes sexualmente transmissíveis, parceiros múltiplos, início precoce da atividade sexual e a genética^{43 48 50 52 58 59 61}.

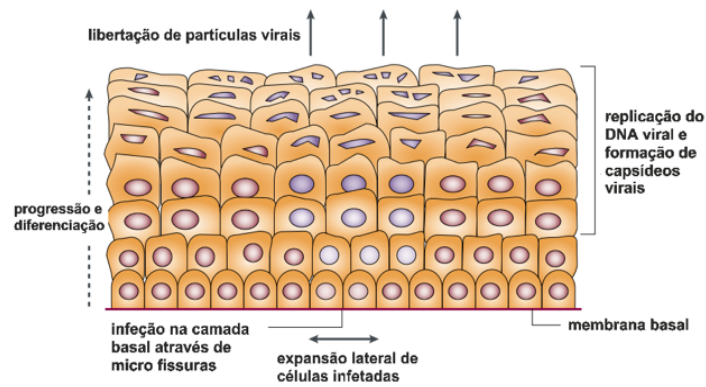


Figura 1.9 - Ciclo de vida do HPV. Na infecção, os genomas virais são estabelecidos no núcleo do hospedeiro. Este núcleo é replicado até atingir um valor basal e mantém este valor durante um período de tempo. As células basais afastam-se da camada basal, movimentando-se para a superfície do epitélio e iniciam diferenciação. Este fenômeno induz a fase produtiva do ciclo viral. O HPV replica-se e aproveita-se da descamação natural das camadas superficiais para ser libertado no ambiente, podendo reiniciar o processo de infecção noutros locais (Adaptado de Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2, 342–350 (2002).

1.4.4 Sintomas, diagnóstico e prevenção

Quando existentes, os sintomas tendem a aparecer em fases mais avançadas. As mulheres com carcinoma invasivo no colo do útero podem apresentar sintomas como: corrimento vaginal, hemorragias vaginais anormais, dor na região pélvica, desconforto vaginal, e em casos mais avançados urgência urinária, dor lombar (lombalgia), perda de peso e dores abdominais anormais ⁴⁶.

Atualmente, existem três técnicas de rastreio para deteção precoce, sendo eles a inspeção visual e colposcopia com recurso a ácido acético, o teste do HPV para pesquisa de tipos de alto risco (Cobas[®] HPV) e a citologia, que permite detetar precocemente lesões no colo do útero ⁴⁶.

O cancro do colo do útero pode ser prevenido através da vacinação contra o papilomavírus e por rastreio e tratamento de lesões precursoras. Quando há deteção precoce e tratamento, o cancro no colo do útero pode ser tratado ⁴⁶. A prevenção passa pela vacinação, estando atualmente disponíveis três vacinas profiláticas que inibem a infecção para um subconjunto de tipos de HPV de alto risco e prometem reduzir a incidência de cancro nas futuras gerações de mulheres, no entanto, não protegem as mulheres que já estão infetadas ⁴⁹. As vacinas existentes são: Cervarix[®] (GlaxoSmithKline) e Gardasil[®] (Merck & Co., Inc); a Cervarix[®], abrange os tipos 16 e 18 e a Gardasil[®] abrange os tipos 6, 11, 16 e 18. Posteriormente em 2014, surge a Gardasil[®]9, que protege dos tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Todas mostraram além de segurança, eficácia para a prevenção de lesões neoplásicas no colo do útero, bem como condilomas genitais, no caso da vacina Gardasil[®] ^{44 49}. A prevenção também passa pela educação, sensibilização e consciencialização do cancro no colo do útero. Segundo um estudo realizado em 2010 em jovens Portugueses, ainda há um grande desconhecimento em relação a este vírus ⁶².

Enquanto a maioria dos países industrializados introduziu a vacinação feminina contra o HPV nos programas nacionais de vacinação, esta não é suficiente, sendo a vacinação em rapazes e homens atualmente implementada em apenas alguns países, nomeadamente Austrália, Canadá, EUA e Áustria. A vacinação em ambos os sexos, pode reduzir ainda mais a incidência de cancro do colo do útero, do cancro anal, do peniano e o da de cabeça e pescoço. No entanto, é recomendado que seja administrada antes do início da vida sexual, com o objetivo de estabelecer uma maior proteção, sendo que em Portugal já está prevista a vacinação em rapazes em 2019 ⁶³.

1.4.5 Tratamento

As opções de tratamento do carcinoma do colo do útero podem ser combinadas e incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Dependendo do estágio do carcinoma e da saúde geral da mulher, a terapia primária pode ser a cirurgia ou a radioterapia, com ou sem quimioterapia. A cirurgia consiste na remoção variável de tecido da área infetada pelo tumor e de tecido circundante, podendo ser realizada por via vaginal ou através de incisão abdominal. Existem dois procedimentos cirúrgicos que retiram menos quantidade de tecido em comparação com a histerectomia radical, são eles a conização e a histerectomia total. Ambas as histerectomias causam infertilidade. Os procedimentos cirúrgicos existentes são: 1) conização, consiste em retirar um círculo de tecido que circunda a abertura do útero e inclui a parte inferior do canal cervical, é uma terapia indicada para quando a mulher deseja preservar a sua fertilidade; 2) histerotomia total, consiste em retirar o útero e o colo, através de uma incisão na parte inferior do abdômen ou através da vagina, mantendo habitualmente as trompas e os ovários, caso estes não tenham aparência anormal e histerectomia; 3) histerectomia radical, esta é a cirurgia mais comum para tratamento de carcinoma, onde são removidos os tecidos que circundam o útero, gânglios linfáticos da pélvis e ao redor da aorta. As trompas e os ovários são mantidos, a menos que tenham aparência anormal ⁴⁶.

1.5 Sistema nervoso Autônomo

O sistema nervoso autônomo (SNA), também conhecido por sistema involuntário, desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase, influenciando a atividade da maioria dos tecidos e sistemas, tais como a osmorregulação, a termorregulação, entre outras. Este regula processos do corpo que não estão sob dependência direta do controle voluntário, ou seja, funciona sem controle consciente, inervando o músculo cardíaco, o músculo liso e diversas glândulas endócrinas e exócrinas. Este sistema é importante em muitas doenças sistêmicas e na atuação de fármacos ⁶⁴.

O SNA é composto por duas divisões anatómicas e funcionalmente distintas, o sistema simpático e parassimpático, sendo que os tecidos são enervados por ambos os sistemas e cada sistema é acionado em diferentes condições. O sistema simpático predomina em reações de emergência, chamadas situações de “luta ou fuga”, aumentando o fluxo de sangue oxigenado e rico em nutrientes para os vários tecidos corporais, já o sistema parassimpático predomina em condições de repouso, conservando e armazenando energia e regulando as funções básicas corporais, tais como a digestão ⁶⁴.

Todos os efeitos do SNA em tecidos e órgãos são realizados através de três neurotransmissores capazes de estimular a atividade em alguns tecidos e inibir a atividade noutros. São eles a acetilcolina, a noradrenalina e a adrenalina, sendo que a acetilcolina é libertada nas fibras colinérgicas, e a noradrenalina e adrenalina são libertadas nas fibras adrenérgicas. Os neurotransmissores do SNA ligam-se a recetores específicos nas membranas celulares do tecido efetor. Todos os recetores adrenérgicos estão acoplados à proteína G (GPCR do inglês, *G Protein-Coupled Receptors*), que também está incorporada na membrana plasmática. Após a estimulação do recetor, este ativa a proteína G e assim inicia-se a transdução dos sinais celulares. O efeito causado por estas substâncias é determinado pela distribuição do seu recetor num tecido particular e pelas propriedades bioquímicas das células nesse mesmo tecido ⁶⁴ (**Figura 1.10**).

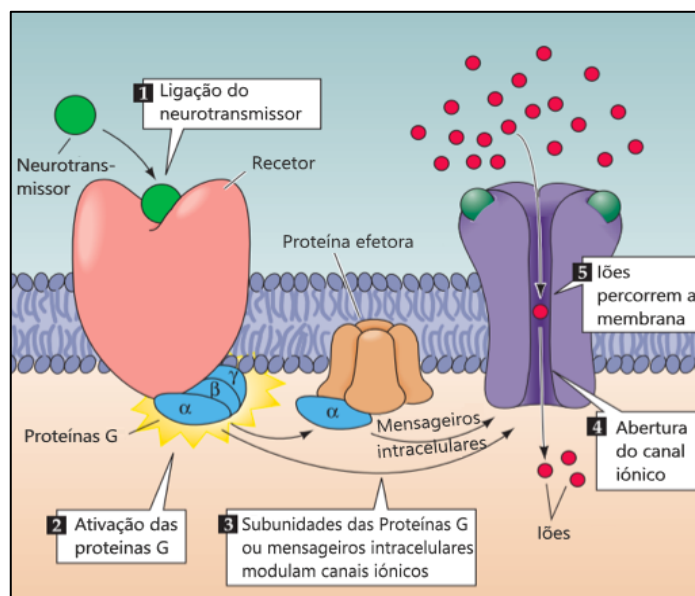


Figura 1.10 - Ativação dos receptores acoplados às proteínas G. Os neurotransmissores afetam a atividade das células pós-sinápticas. Estes ligam-se a receptores específicos nas membranas celulares do tecido efetor que por sua vez vão ativar as proteínas G. (Adaptado de Purves, D. et al. Neuroscience. Sunderland 3, (Sinauer Associates, Inc., 2004).

Vários estudos apontam para um papel proeminente do stress crônico no aumento da incidência de cancro e proliferação de metástases. O stress é um processo que inclui fatores ambientais e psicossociais que iniciam uma sequência de processamento de informação no sistema nervoso. Tanto os níveis de noradrenalina como de adrenalina são elevados em indivíduos com stress agudo ou crônico e os níveis de dopamina aumentam no cérebro durante o stress agudo. Um conjunto de fatores incluindo trauma, luto, depressão e isolamento social, têm sido associados à desregulação de várias hormonas neuroendócrinas, particularmente as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e cortisol, sendo que a adrenalina e noradrenalina são produzidas na medula suprarrenal e a dopamina uma percussora natural de ambas ⁴.

Consequentemente, estudos clínicos e epidemiológicos têm associado as vias de sinalização neuroendócrina e a progressão do cancro. Estudos mostraram que a sinalização adrenérgica pode regular vias necessárias para a progressão do tumor da mama, através de efeitos diretos nas células tumorais e no microambiente tumoral e modelos pré-clínicos demonstraram que a adrenalina e noradrenalina induzem a invasão e a migração de células tumorais na patogénese por metástases ⁶⁵. Estudos semelhantes concluíram o mesmo para outros tipos de tumores nomeadamente no ovário ⁶⁶, colón ⁶⁷ e próstata ⁶⁸. Em suma, há evidências crescentes de que o stress está correlacionado com o aumento do risco de cancro ou um retrocesso no seu tratamento devido à ativação do SNA e consequente aumento de catecolaminas, que por sua vez ativam a sinalização adrenérgica ^{69 70 71 72}.

O sistema nervoso autónomo simpático suprarrenal é travado pela serotonina. A serotonina na fenda sináptica regula as catecolaminas, isto é, inibe a sua produção, logo quando existe muita serotonina na fenda sináptica há inibição da libertação das catecolaminas (do sistema simpático suprarrenal), por outro lado, quando há baixa da serotonina na fenda sináptica, dá-se o efeito contrário, ou seja, o sistema fica constantemente ativado e por consequente há produção de catecolaminas ^{73 74 75}.

1.6 Polimorfismos Genéticos

O estudo da variação genética é a base do estudo da genética médica. Durante o decorrer da evolução, o fluxo constante de novas variações de nucleótidos tem assegurado um alto grau de diversidade genética e individualidade. A diversidade genética pode manifestar-se de diversas maneiras tais como organização do genoma, alterações de nucleótidos na sequência do genoma, variações no número de cópias de segmentos de DNA genômico e alterações na estrutura e quantidade de proteínas ⁷⁶.

Os genes são constituídos por DNA, que contêm sequências complexas de nucleótidos. Quando as formas alternativas nestas sequências de um gene ou de uma sequência intergênica ocorrem na população de forma estável, tendo uma frequência igual ou superior a 1% na população, são designados de polimorfismos de DNA. Os polimorfismos de DNA são herdados de uma forma mendeliana e são fonte de grande diversidade interindividual ⁷⁷.

Os polimorfismos de DNA podem ser do tipo SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphisms), VNTRs (do inglês, Variable Number of Tandem Repeats), CNVs (do inglês, Copy Number Variations) ou Indels (do inglês, Insertion/Deletion) ⁷⁶.

Os SNPs são os mais simples e comuns de todos os polimorfismos ⁷⁸, sendo caracterizados por uma mutação pontual num único nucleótido, sendo responsáveis pela maior parte da variabilidade genética humana interindividual, os VNTRs são polimorfismos de comprimento que resultam da repetição sequencial do mesmo conjunto de bases ⁷⁷; os CNVs incluem a variação do número de cópias de grandes segmentos do genoma, que variam o tamanho de 1000pb a muitas centenas de Kb; e por fim, os Indels, que resultam de variações causadas por inserção ou deleção, em qualquer parte, variando de 1 pb até aproximadamente 1000pb ⁷⁶.

A presença de determinados polimorfismos pode ter influência funcional relacionada com o produto do gene, podendo este ter participação em algumas alterações relacionadas com patologias ⁷⁹. Na seguinte tabela (Tabela 1.1) estão descritos os polimorfismos em estudo, bem como os genes a que pertencem, os alelos correspondentes à forma variante e os seus efeitos e risco esperado nas patologias em estudo.

Tabela 1.1 - Relações funcionais entre os polimorfismos em estudo e o risco de cancro. Sumário dos polimorfismos estudados neste trabalho e a direção teoricamente esperada do efeito no risco da presença da variante alélica

Polimorfismo	Rs	Gene	Variante	Possível efeito da variação alélica	Direção esperada do efeito no risco (Leiomiomas ou HPV)
Arg16Gly	rs1042713	ADRB2	Arg	Indivíduos com a mutação apresentam um aumento da atividade (mais stresse)	Aumenta
5-HTTVNTR	Não existente	SLC6A4	10	Indivíduos com a mutação apresentam mais serotonina circulante (menos stresse)	Diminui
T102C	rs6313	HTR2A	C	Indivíduos com a mutação apresentam menos expressão (mais stresse)	Aumenta

1.7 Fatores Genéticos Associados aos Tumores Ginecológicos

1.7.1 Sistema Serotoninérgico

Uma das primeiras referências científicas relativas à serotonina, data por volta de 1930, quando um investigador italiano chamado Dr. Vittorio Erspamer realizou um estudo sobre uma substância produzida pelas células enterocromafinas do intestino e existente no estômago dos mamíferos e nas glândulas salivares do polvo, ao qual deu o nome de “enteramina”, sendo uns anos mais tarde (1948) isolada e designada serotonina. Após esta descoberta, a serotonina tem sido um dos neurotransmissores mais estudados ⁸⁰.

A serotonina é um neurotransmissor derivado do aminoácido triptofano e é sintetizado num processo de duas etapas, pela qual o aminoácido triptofano é primeiramente hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase, convertendo-se em 5-hidroxitriptofano. Posteriormente, o 5-hidroxitriptofano sofre descarboxilação pela enzima L-aminoácido descarboxilase, originando assim a serotonina ⁸¹.

O neurotransmissor serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é uma monoamina presente no soro (sero) que é capaz de induzir vasoconstrição (tonina), daí a sua designação. Esta molécula é sintetizada por dois genes diferentes (Tph1 e Tph2) em dois locais diferentes e dependendo do seu local de síntese afeta processos fisiológicos diferentes. A maioria da serotonina é sintetizada nas células enterocromafinas no aparelho gastrointestinal, enquanto a restante é sintetizada no cérebro nomeadamente nos neurónios do sistema nervoso central (SNC), nos núcleos de rafe ⁸¹. Sendo sintetizada em locais distintos, e por não conseguir atravessar a barreira hematoencefálica devido à carga positiva do pH fisiológico, pode afirmar-se que a produção de serotonina, tanto no SNC como no sistema periférico, consegue funcionar quase isoladamente, proporcionando a este neurotransmissor funções diversas como a homeostasia corporal, a regulação do sono, do humor, do apetite, da dor, atividades gastrointestinais entre outras ^{80 82}.

Da quantidade total de serotonina no organismo, cerca de 95% encontra-se no sistema gastrointestinal, onde funciona como um fator parácrino que estimula o peristaltismo e a secreção de muco. Desta percentagem, uma parte encontra-se em circulação ou é metabolizada pela monoamina oxidase nas células endoteliais, a restante desta percentagem é armazenada em grânulos densos nas plaquetas através de um transportador específico da serotonina (5-HTT ou SERT, do inglês Serotonin Transporter), sendo libertada para estimular a agregação plaquetária e, consequentemente a coagulação sanguínea após lesão tecidual, bem como outros efeitos fisiológicos, tais como constrição ou dilatação dos vasos sanguíneos e hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso. Assim, as plaquetas funcionam como vesículas de armazenamento deste neurotransmissor ⁸².

A restante serotonina (5%) do organismo encontra-se no sistema nervoso central (SNC) e funciona como neurotransmissor onde desempenha diversas funções, influenciando o comportamento e funções fisiológicas e cognitivas, tais como regulação do humor, do sono e do apetite. Por isso, alguma alteração na regulação desta hormona pode trazer efeitos nocivos, tais como ansiedade, depressão, alteração de comportamento e/ou de apetite ⁸⁰. Todos estes efeitos são mediados por sete famílias de recetores ligadas à membrana (5-HTR₁ a 5-HTR₇), que se encontram no neurónio pós-sináptico e são regulados por um transportador específico (5-HTT) da serotonina na membrana plasmática. Este encontra-se no neurónio pré e pós-sináptico, sendo o responsável pela sua recaptação após a libertação ⁸².

O 5-HTT desempenha o papel principal na transmissão da serotonina (Figura 1.11), pois é o responsável pela regulação da duração da atividade de serotonina que se encontra no meio extracelular, a fim de remover a serotonina de volta ao neurônio pré e pós sináptico⁸³, através de um processo de transporte ativo usando gradientes transmembranares de sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e potássio (K^+), utilizando um potencial de membrana interno negativo. Os agentes farmacêuticos que antagonizam o 5-HTT, tais como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRIs, do inglês Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) são clinicamente frequentes, pois potencializam a atividade da serotonina e demonstraram aliviar sintomas depressivos⁸². Além de agentes farmacêuticos, também são conhecidas outras substâncias inibidoras da recaptação da serotonina, tais como a cocaína, e a 4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, conhecida por “ecstasy”), ambos os agentes modificam a transmissão serotoninérgica e elevam assim o humor em indivíduos deprimidos ou normais, sendo o 5-HTT um dos alvos no estudo de transtornos psiquiátricos, humor e ansiedade⁸⁴.

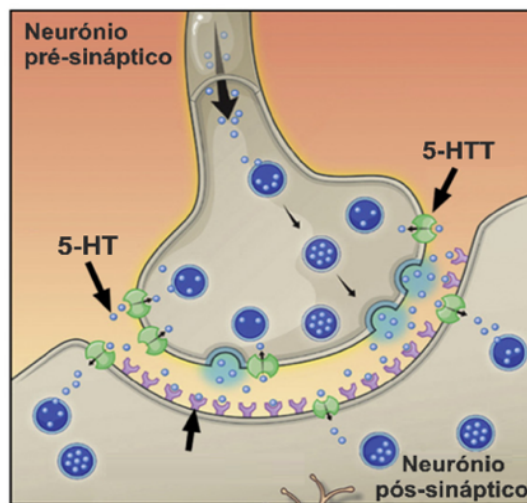


Figura 1.11 - Sinalização da serotonina no SNC. A serotonina (5-HT) é sintetizada pelos neurônios pré-sinápticos e armazenada em vesículas. As vesículas fundem-se com a membrana celular após um estímulo e libertam a 5-HT por exocitose na fenda sináptica. A 5-HT libertada, ativa e estimula o neurônio pós-sináptico (Adaptado de Warden, S. J., Robling, A. G., Haney, E. M., Turner, C. H. & Bliziotis, M. M. The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of the skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5). *Bone* **46**, 4–12 (2010).

O gene que codifica a proteína do 5-HTT é o SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 Member 4), e está localizado no cromossoma 17 na região 17q11.1-q12. Este abrange mais de 30kb, e consiste em 14 exões, codificando uma proteína de 630 aminoácidos^{83 85}. O gene SLC6A4 é um gene polimórfico, tendo sido até à data identificados dois polimorfismos genéticos. Um deles é a variante polimórfica 5-HTTLPR, caracterizada por uma inserção de 44pb na região promotora, resultando dois alelos diferentes: uma variante longa (L, do inglês long) composta por 16 cópias da unidade de repetição de 22 pares de bases (pb) e uma variante curta (S, do inglês short) consistindo em 14 cópias^{85 86}. A outra variante polimórfica é a 5-HTTVNTR, localizada no intrão 2 (SERT STin2) e consiste num número variável de repetições em tandem (VNTR do inglês, Variable Number Tandem Repeat) de um elemento sequencial de 17pb, originando três alelos diferentes (9, 10 e 12) e seis genótipos diferentes que serão descritos no capítulo seguinte, sendo este um dos polimorfismos em estudo neste projeto⁸⁷.

1.7.1.1 Polimorfismo (5-HTTVNTR) do gene do Transportador da Serotonina

A variante polimórfica 5-HTTVNTR é, tal como o nome indica, um polimorfismo no gene do transportador da serotonina, que consiste num número variável de repetições em *tandem* (VNTR do inglês, *Variable Number Tandem Repeat*)⁸⁷, contendo 9, 10 ou 12 repetições de um elemento de 17pb, que quando conjugados originam seis genótipos diferentes: 12/12, 12/10, 12/9, 10/10, 10/9 e 9/9, sendo que todos os genótipos afetam a expressão do gene, podendo modificar a transmissão neuronal devido à alteração na expressão da proteína⁸⁴.

Num estudo realizado em 2004, foram separados os genótipos em dois grupos, de acordo com a expressão quantitativa de mRNA (RNA mensageiro) e foi concluído que o alelo com 10 repetições era aquele que era menos expresso, o genótipo 12/12 foi considerado como um genótipo de taxa de transcrição elevada, ou seja está associado a uma maior taxa de recaptção de serotonina circulante, e os genótipos 12/10 e 10/10 foram considerados de expressão baixa, contudo, ainda existe bastante divergência quanto a este assunto. Na população em geral, o alelo com 10 repetições é o menos comum, sendo considerado recessivo e o alelo com 12 repetições o mais comum.⁸⁸.

Apesar de resultados anteriores que indicam o alelo com 12 repetições como um potenciador da transcrição, um estudo em 2008 demonstrou que homozigotos 12/12 têm uma tendência para exibir uma menor disponibilidade do transportador de serotonina⁸³.

Outro estudo em 2007 relatou associação entre o alelo com 12 repetições e pacientes com ansiedade e transtorno obsessivo compulsivo⁸⁹, no entanto em outros estudos anteriores os autores relataram associação entre os alelos 9 e 10 e transtornos de ansiedade⁹⁰. Outro estudo em 2010, demonstrou que heterozigóticos 12/10 têm menor risco do que homozigóticos 12/12 para enxaquecas, sugerindo que o alelo 12 tem efeito menos protetor em relação aos outros⁹¹, enquanto outros estudos mostram que uma frequência do alelo com 12 repetições aumenta o risco para depressão e transtorno bipolar, enquanto o genótipo 10/10 diminui esse risco, tendo um efeito protetor⁹².

Estudos realizados, relacionam alterações no gene do transportador de serotonina com vários distúrbios, tais como distúrbios afetivos, emocionais, agressividade, comportamento suicida entre outros. Mutações associadas ao 5-HTT podem modificar a sua função e contribuir para o desenvolvimento de depressão⁸⁵.

1.7.1.2 Polimorfismo (T102C) do gene do Recetor 2A da Serotonina

Para além do transportador de recaptção de serotonina, referido no capítulo anterior, a ação da serotonina no organismo também depende de uma família de recetores que estão subdivididos em sete famílias (5-HTR₁ a 5-HTR₇)⁸². O recetor chamado recetor 2A da serotonina é codificado pelo gene (HTR2A) do recetor 2A da 5-hidroxitriptamina (5HTR2A) e está localizado no cromossoma 13 (13q14-q21)⁹³, abrangendo 20kb, contendo três exões e mais de 200 SNPs que já foram identificados ao longo do gene⁹⁴.

O 5-HTR_{2A} tal como o nome indica, é um recetor da família 2A do recetor de serotonina e pertence à superfamília dos recetores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G Protein Coupled Receptors*). O principal efeito da serotonina no 5HTR_{2A} é aumentar a excitabilidade do neurónio hospedeiro, sendo o 5-HTR_{2A} o principal GPCR da família de recetores da serotonina⁹⁵.

O 5-HTR_{2A} é maioritariamente um recetor cortical, sendo o mais abundante no córtex e a sua expressão maior nesta zona do que em estruturas subcorticais (tálamo, gânglios basais e hipocampo), tendo assim implicações funcionais importantes na modulação dos circuitos neurais no hipocampo⁹⁵. Em termos de localização celular, estes recetores são maioritariamente expressos nos dendritos dos neurónios piramidais glutamatérgicos, no córtex⁹⁵. Os neurónios piramidais corticais são especialmente sensíveis à modulação via 5-HTR_{2A}, por isso são sensíveis a mudanças nas concentrações sinápticas de serotonina⁹⁵. Um efeito bem demonstrado da sinalização cortical (pré-frontal) é o mecanismo de *feedback* negativo que inibe a ativação de neurónios serotoninérgicos nos núcleos dorsais da rafe⁹⁶, sugerindo que o 5-HTR_{2A} desempenha um papel crucial na regulação da libertação de serotonina no córtex, através de uma influência moduladora descendente num circuito inibitório de *feedback* “cortical-rafe”⁹⁷. Estudos confirmaram uma relação deste recetor com a aprendizagem e que alterações deste podem levar a anomalias nas funções cognitivas e aprendizagem⁹⁸, estando este recetor também associado a ansiedade, neurogênese, depressão⁹⁵, obesidade⁹⁹ e transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia^{100 101}.

Este gene tem muitas variantes polimórficas, sendo as mais conhecidas: o SNP -783 A/G e o SNP -1483 A/G (rs6311), que se encontram ambos na região promotora, o SNP Hist452Tyr (rs6314) localizado no exão 3 e que é responsável por uma troca do aminoácido histidina pelo aminoácido tirosina na posição 452 e ainda a variante polimórfica T102C (rs6313) que vai ser estudada neste trabalho^{102 103}.

A variante polimórfica T102C (rs6313) do gene do recetor 2A da serotonina, encontra-se em desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) com o polimorfismo -1483 A/G, ou seja, existe uma associação não aleatória entre as duas variantes polimórficas^{102 103 104}.

Este polimorfismo consiste numa transição de uma timina (T) para uma citosina (C) na posição 102 (T102C) do recetor¹⁰⁵. A depressão, esquizofrenia, distúrbios psicológicos graves^{93 101 104} e comportamentos suicidas são patologias que estão associadas a este polimorfismo. Tem sido sugerido que esta variante resulta numa baixa atividade promotora afetando a transcrição do gene¹⁰¹, dado isto, o alelo T tem sido associado a um maior número de recetores de HTR_{2A} no sistema nervoso central e indivíduos com o genótipo homocigótico C têm expressões menores do gene^{106 107}, estando este associado a esquizofrenia^{101 107}. Os mecanismos subjacentes às diferenças de expressão são incertos, no entanto tem sido especulado que este polimorfismo afeta a estabilidade do mRNA¹⁰⁷.

Podemos então concluir que mutações associadas tanto a recetores de serotonina como ao transportador de serotonina desempenham um papel crucial na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos graves⁹⁴.

1.7.2 Recetor β₂-Adrenérgico

O recetor β₂-adrenérgico (β₂AR ou ADRB₂, do inglês *Beta 2 Adrenergic Receptor*) é codificado por um gene (ADRB₂) sem intrões, localizado no cromossoma 5 (5q31-32), codificando 413 aminoácidos¹⁰⁸. Os recetores β₂ adrenérgicos distribuem-se em diversos órgãos dos sistemas urogenital, pulmões e tecido adiposo, além dos vasos sanguíneos e coração⁷⁹.

O receptor β 2-adrenérgico, é necessário para a resposta fisiológica à adrenalina e à noradrenalina. A maior parte das terminações simpáticas pós-ganglionares utiliza a noradrenalina como neurotransmissor. Após ocorrer um potencial de ação, a noradrenalina ativa na fenda sináptica os recetores adrenérgicos na membrana pós-sináptica (recetores adrenérgicos pós-sinápticos tipo α e β) e na membrana pré-sináptica o recetor adrenérgico pré-sináptico α 2. A estimulação dos recetores adrenérgicos pós-sinápticos causam modificação do estado funcional das células efectoras, enquanto a estimulação dos recetores adrenérgicos pré-sinápticos (recetores α 2) causam inibição da libertação da noradrenalina, diminuindo assim a atividade simpática, resultado da ativação (recetores β 2), ou seja *feedback* negativo ⁷⁹.

Os recetores adrenérgicos são recetores acoplados à proteína G, cuja função é a transmissão de informações do ambiente extracelular para o interior da célula, estes podem ser do tipo alfa (α) na forma de dois subtipos: alfa1 (α 1), alfa2 (α 2) ou do tipo beta (β), designando-se a família de recetores β -adrenérgicos que pode ser dividida em três subtipos: beta1 (β 1), beta2 (β 2) e beta3 (β 3), consoante as diferenças de localização e de resposta farmacológica às catecolaminas e aos antagonistas específicos ¹⁰⁹.

De um modo geral, a diferença funcional nos receptores β 2-adrenérgicos deve-se a uma alteração na sensibilização destes receptores em relação aos agonistas β 2 exógenos assim como catecolaminas endógenas ⁷⁹.

A atividade no sistema nervoso simpático (SNS) é mediada pela produção e libertação das catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), sendo que estas atuam em recetores adrenérgicos localizados tanto no sistema nervoso central (SNC) como no sistema nervoso periférico (SNP) ⁷⁹. A noradrenalina e adrenalina são hormonas de stresse que ativam recetores adrenérgicos, como é o caso do recetor β 2-adrenérgico, membro da família de recetores acoplados à proteína G (GPRs, do inglês *G Protein Coupled Receptors*) ¹¹⁰.

Os recetores adrenérgicos são importantes na manutenção da homeostase em ambientes fisiológicos normais e em estados patológicos, sendo também alvos para agonistas e antagonistas administrados terapêuticamente ¹¹¹. A distribuição dos recetores β no coração pode ser alterado em situações patológicas ou através da ação de fármacos, levando a uma diminuição do seu número. A consequente diminuição na densidade de recetores para um determinado neurotransmissor ocorre em situações de excesso de estímulo, como na hiperatividade simpática mediada pelo aumento excessivo de catecolaminas, resultando numa reduzida sensibilidade da célula ao transmissor, sendo este fenómeno designado de *down-regulation*. Todos os recetores participam no processo de *down-regulation* e cada recetor apresenta uma resposta diferente entre si, sendo esta uma das grandes diferenças fisiológicas entre cada recetor ⁷⁹.

O bloqueio dos recetores β -adrenérgicos é realizado através de betabloqueadores. Estes fármacos pertencem a uma classe terapêutica que apresenta como mecanismo de ação o bloqueio de recetores através de inibição por competição. Estes fármacos têm sido usados no tratamento da hipertensão arterial, demonstrando eficácia na redução da pressão, inibindo as respostas à ação das catecolaminas nos recetores β -adrenérgicos ¹¹². O uso de betabloqueadores está associado também a uma menor progressão de tumores e ocorrência de mortalidade no cancro da mama, como relatam vários estudos, sugerindo que intervenções nas vias de sinalização adrenérgicas podem complementar as terapias já existentes ^{65 69 113 114 115}.

O uso de agonistas dos recetores β -adrenérgicos pode ser tornado um alvo terapêutico auxiliar no tratamento do cancro oral ¹¹⁶. Vários estudos indicaram que a via β 2-adrenérgica tem um papel importante no início e na progressão do cancro, incluindo no cancro da mama, da próstata, melanoma maligno, e gástrico. Estudos mais recentes demonstraram que a ativação da sinalização contribuiu para a invasão e metastização do adenocarcinoma colorretal e do cancro gástrico ⁷¹.

A família dos recetores β -adrenérgicos (β 1, β 2 e β 3) é muito polimórfica. Até à data foram descritos doze tipos de polimorfismos (SNPs) localizados em regiões codificantes, no gene (ADRB2) do recetor β 2, sendo que cinco destes polimorfismos (Arg16Gly, Gln27Glu, Trh164Ile, Val34Met e Ser220Cys) causam alterações (substituições) nos aminoácidos do recetor e apresentam importância funcional ¹¹⁷. As consequências do polimorfismo Ser220Cys ainda não são bem compreendidas e em relação ao polimorfismo raro Val34Me, estima-se que não provoque mudanças na função do recetor β 2. Os restantes, demonstram estar relacionados com alterações funcionais do recetor ¹⁰⁸.

Estudos realizados indicam que muitos dos polimorfismos alteram o aspeto da sinalização do recetor e que estes podem ser fatores de risco para doenças, ou alterar a resposta a terapias ¹¹¹. Diferentes formas polimórficas deste gene estão associados a aspetos funcionais do sistema nervoso simpático (SNS) e a estados patológicos relacionados com hiperatividade simpática, tais como elevação da pressão arterial, da frequência cardíaca, de níveis circulantes de noradrenalina, asma, diabetes e obesidade ^{79 108 117}.

1.7.2.1 Polimorfismo (Arg16Gly) do gene do Recetor Adrenérgico β 2

No polimorfismo Arg16Gly (rs1042713), ocorre a substituição do nucleótido Guanina pelo nucleótido Adenina, na posição 46 do gene do recetor β 2 (ADRB2), promovendo assim uma substituição do aminoácido de Glicina (Gly) por Arginina (Arg) no codão 16, sendo a variante Glicina a mais frequente ¹⁰⁸.

Nos estudos iniciais sobre este polimorfismo, considerava-se a Arginina como sendo o alelo mais frequente na população (alelo ancestral), entretanto, estudos posteriores demonstraram que o aminoácido Glicina era, na verdade, o alelo mais frequente (Arg/Gly, freq. alélica 0,40/0,60), sendo este o alelo ancestral. Contudo, por ter sido descrito inicialmente desta forma, o alelo Arginina permaneceu com a designação ¹⁰⁸.

A frequência dos alelos envolvidos nos polimorfismos dos recetores β 2 varia entre as diferentes populações. Em afro-americanos, a frequência do alelo Arg16 é de 49%, enquanto em caucasianos e asiáticos a frequência deste mesmo alelo é de 29% e 59%, respetivamente ¹¹¹.

Está estabelecido que este polimorfismo não altera a capacidade de ligação das catecolaminas para o recetor, no entanto, estudos realizados demonstram que este polimorfismo está relacionado com a suscetibilidade deste recetor ao *down-regulation* ¹¹⁸.

Estudos *in vitro* demonstraram que a presença do alelo Gly leva a um aumento na capacidade de *down-regulation*, ou seja, menor densidade de recetores na membrana quando comparado com Arg. A dessensibilização é então maior no alelo Gly ⁷⁹.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a existência de associação entre polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de ação de neurotransmissores (especificamente o recetor β_2 -adrenérgico e o transportador e recetor da serotonina) e tumores ginecológicos benignos (leiomiomas uterinos) e malignos (cancro do colo do útero).

Mais especificamente pretendeu-se:

1. Estudar o contributo do genótipo dos genes ADRB2 (rs1042713), SLC6A4 (5-HTTVNTR) e HTR2A (rs6313) na tumorigénese
2. Estudar o contributo isolado ou em epistasia de cada polimorfismo na suscetibilidade para a doença
3. Esclarecer acerca de mecanismos comuns de desenvolvimento de doença entre tumores ginecológicos benignos (leiomiomas) e malignos (carcinoma do colo do útero)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra populacional

Para a realização deste estudo recorreu-se a três populações diferentes: uma população controlo, composta por mulheres que não apresentam qualquer uma das patologias em estudo; e duas populações com patologia, sendo uma população “Leiomiomas” e outra “Carcinoma do colo do útero”.

Para este estudo consideram-se doentes todas as mulheres que têm a doença, as restantes consideram-se controlos independentes de patologias associadas.

O grupo patológico “Leiomiomas” corresponde a mulheres que recorreram ao serviço de Radiologia de Intervenção do Hospital *St. Louis* em Lisboa, onde realizaram a embolização das artérias uterinas. Estas amostras foram disponibilizadas pelo Professor Doutor João Martins Pisco.

O grupo patológico “Carcinoma do colo do útero”, corresponde a mulheres com carcinoma do colo do útero, resultante da infeção por HPV, provenientes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) delegações de Lisboa, disponibilizadas pela Professora Doutora Maria Clara Bicho e do Porto, disponibilizadas pelo Professor Doutor Rui Medeiros.

O grupo controlo foi fornecido pela Faculdade de Motricidade Humana provenientes do estudo “Mexa-se Mais” disponibilizadas pelo Professor Doutor Luís Sardinha, e é composto por mulheres que não apresentavam qualquer uma das patologias em estudo. Para este grupo controlo foram também estudadas mulheres, seguidas na consulta de endocrinologia na Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa Lda. pelo Professor Doutor Mário Rui Mascarenhas.

3.1.1 Caracterização das populações

Para a caracterização das populações com patologias, procedeu-se sempre que possível à recolha de dados clínicos importantes para o presente estudo.

Para a população controlo composta por mulheres saudáveis, procedeu-se à criação de uma base de parâmetros comuns às dos grupos com patologias em estudo.

Todas as mulheres foram previamente identificadas através da atribuição de um código alfanumérico e as informações recolhidas encontram-se registadas numa base de dados confidencial. As amostras de sangue total periférico utilizadas foram obtidas mediante o consentimento informado de todas as mulheres envolvidas (**Anexo I**).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Extração de DNA

As amostras anteriormente extraídas foram obtidas a partir de sangue periférico, utilizando o método de extração não enzimático designado de *salting-out*, adaptado de *Lahiri & Nurnberguer Jr., Nucleic Acid Research (1991)*.

3.2.2 Quantificação de DNA

A quantificação do DNA extraído (ng/μl) e a determinação da sua concentração e pureza (razão entre absorvências 260/280 e 230/260 do DNA extraído foi realizada através de um espectrofotômetro de espectro completo (NanoDrop® ND-2000, Thermo Scientific).

3.2.3 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi efetuada através do método PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que consiste numa reação cíclica de alternância de temperaturas, que permite a desnaturação da cadeia de DNA, o emparelhamento dos *primers* (*annealing*) e em seguida a síntese de novas cadeias de DNA.

Para este método utilizou-se um termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700) e seguiram-se condições de amplificação diferentes para cada polimorfismo em estudo, descritas na **tabela 3.1**. Em todas as reações foi efetuado um *Hotstart* a 94°C durante 2 min e ao fim de todos os ciclos uma extensão final a 72°C durante 5min.

Tabela 3.1 - *Primers*, condições de PCR, componentes e tamanho dos fragmentos para cada polimorfismo em estudo

Gene	Polimorfismo	Primers	Condições PCR	Componentes	Fragmentos Amplificados
ADBR2	Arg16Gly (rs1042713)	5'- CCTTCTTGCTGGCACCCAT - 3' 5'- GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA - 3'	40 ciclos: Desnaturação 30 seg. a 94°C Emparelhamento 30 seg. a 57°C Extensão 45 seg. a 72°C	DNA: 200ng <i>Primer F</i> : 10pmol <i>Primer R</i> : 10pmol <i>Master Mix</i> : 12,5μl H ₂ O: perfazer volume final Volume final: 25μl	308pb
SLC6A4	5-HTTVNTR	5'- GTCAGTATCACAGGCTGCGAG - 3' 5'- TGTTCTAGTCTTACGCCAG - 3'	35 ciclos: Desnaturação 30 seg. a 94°C Emparelhamento 30 seg. a 57°C Extensão 45 seg. a 72°C	DNA: 200ng <i>Primer F</i> : 10pmol <i>Primer R</i> : 10pmol <i>Master Mix</i> : 25μl H ₂ O: perfazer volume final Volume final: 50μl	12/12 – 299pb 12/10 – 299+265pb 10/10 – 256pb
5HT2A	T102C (rs6313)	5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3' 5'- TGTTCTAGTCTTACGCCAG-3'	40 ciclos: Desnaturação 30 seg. a 94°C Emparelhamento 30 seg. a 50°C Extensão 45 seg. a 72°C	DNA: 200ng <i>Primer F</i> : 10pmol <i>Primer R</i> : 10pmol <i>Master Mix</i> : 12,5μl H ₂ O: perfazer volume final Volume final: 25 μl	344pb

A confirmação dos resultados da amplificação dos fragmentos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose (Lonza SeaKem LE Agarose) com concentração adequada ao tamanho dos fragmentos amplificados (3% para o polimorfismo do gene SLC6A4 e 2% para os polimorfismos dos genes ADRB2 e 5HT2A) em 50 ml de TBE 1x concentrado (**Anexo II**) com 3μl de corante (Midori Green Advanced DNA Stain®).

A eletroforese foi realizada durante 120 min a 90V para o polimorfismo do gene SLC6A4 e 35min a 85V para os polimorfismos dos genes ADBR2 e 5HT2A numa tina de eletroforese (kuroGEL Mini 13, VWR®). Os resultados foram observados num transiluminador de ultravioleta (GenoSmart VWR®).

3.2.4 Genotipagem do DNA

Um dos polimorfismos estudados é do tipo VNTR (*Variable Number Repeat*), sendo apenas necessário recorrer ao método de amplificação (PCR). Os restantes polimorfismos são polimorfismos pontuais (SNP), pelo que a genotipagem é efetuada recorrendo à técnica PCR seguida de RFLP (*Restriction Frangment Length Polymorphism*), a qual consiste numa restrição enzimática que permite discriminar os alelos através da eletroforese em gel de agarose (Lonza SeaKem LE Agarose) 2% ou 3% concentrado num volume de 50ml de TBE 1x concentrado (**anexo II**) com 3µl de corante (Midori Green Advanced DNA Stain). A restrição é efetuada no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700), nas condições descritas na **Tabela 3.2**, sendo que a eletroforese em gel de agarose é efetuada a 85V para o polimorfismo do gene ADBR2 e a 120V para o polimorfismo do gene 5-HT2A, ambos durante 85 min. Após o método de PCR, a visualização dos produtos de restrição foi efetuada num transiluminador de ultravioleta (GenoSmart VWR®).

Tabela 3.2 - Condições de restrição, componentes e genótipo possível para cada polimorfismo em estudo

Gene	Polimorfismo	Condições da Restrição	Componentes	Genótipo possível
ADBR2	Arg16Gly (rs1042713)	15 min a 37°C 20 min a 65°C	Produto de PCR: 8,5µl Enzima: Speedy <i>NcoI</i> (1µl) Tampão: 10X NZYSpeedyBuffer Orange (2µl) H₂O: a perfazer para o volume final Volume final: 20µl	AA – 308pb AG – 308+291+17pb GG – 291+17pb
5-HT2A	T102C (rs6313)	1h a 37°C 20 min a 65°C	Produto de PCR: 10µl Enzima: Thermo Scientific <i>MspI (HpaII)</i> (1µl) Tampão: 10X Buffer Tango (2µl) H₂O: a perfazer para o volume final Volume final: 25µl	TT – 344pb CT – 344+217+127pb CC – 217+127pb

3.3 Análise Estatística

Após a obtenção dos dados obtidos decorrentes do trabalho laboratorial e para poder relacioná-los com os dados clínicos fornecidos, recorreu-se a um tratamento estatístico.

Para a análise estatística foi construída uma base de dados no Microsoft® Excel que depois foi transferida para a plataforma IBM® SPSS® versão 25 (**Fig.3.1**), onde se efetuou a análise estatística.

Para aferir sobre a distribuição normal da variável contínua idade, realizou-se o teste não-paramétrico Kolmogorov-Smirnov.

Para verificar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), para cada polimorfismo analisou-se a distribuição das frequências genotípicas observadas e esperadas através do teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson.

Para verificar a existência de diferenças significativas nas distribuições das frequências alélicas ou genótípicas entre a população patológica e a população controle, recorreu-se ao teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. Considerou-se a existência de diferenças significativas para $p \leq 0.05$.

Recorreu-se também ao cálculo de *Odds Ratio* (OR), para determinar o risco de ter os genótipos ou os alelos. O intervalo de confiança estabelecido foi de 95% ($p \leq 0,05$)¹¹⁹.

Foi também realizada uma análise epistática, a fim de aferir a interação entre genes que não fazem parte do mesmo locus.

Para isso, foi testada a associação entre genes, combinando-se vários genótipos e testada a existência de diferenças significativas nas distribuições dos genótipos combinados entre as populações patológica e controle. Também aqui se recorreu ao teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson e à análise de *Odds Ratio*.

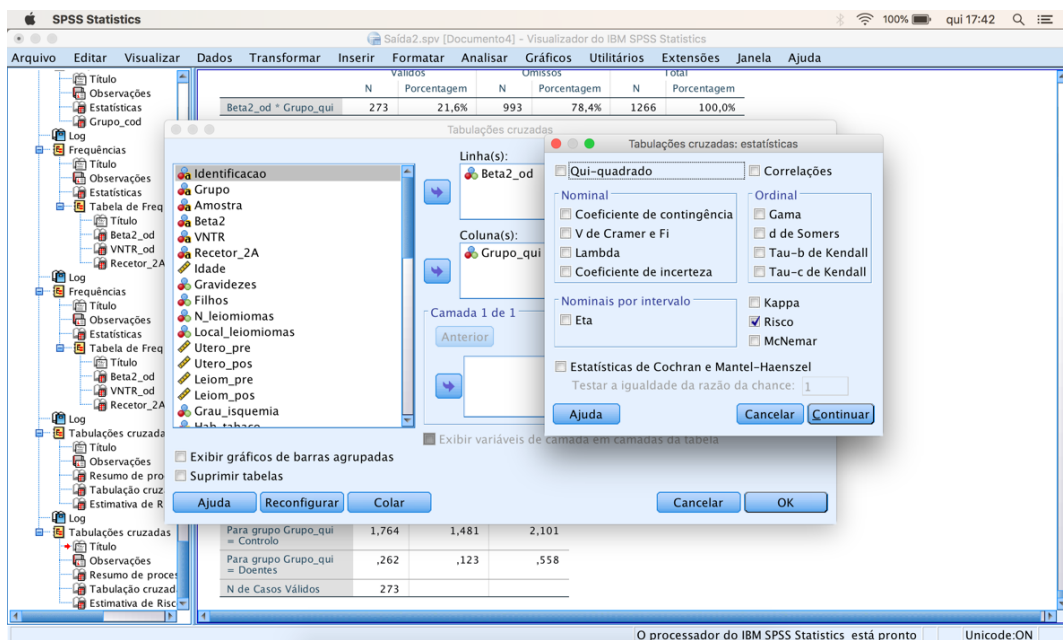


Figura 3.1 - IBM® SPSS. Software utilizado na análise estatística.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das populações em estudo

Para uma melhor compreensão da amostra em estudo, procedeu-se a uma análise de estatística descritiva da variável idade. Esta análise foi feita tanto para as populações com patologia como para a população controlo. Apenas o grupo patológico com carcinoma do colo do útero apresentou uma distribuição normal da idade ($p = 0,077$).

4.1.1 População de mulheres com leiomiomas

Na população de mulheres com leiomiomas, estudou-se uma amostra populacional constituída por 136 mulheres, que realizaram a embolização das artérias uterinas. Esta população de mulheres, com idades compreendidas entre os 24 e os 73 anos, tem uma mediana de 40 anos.

4.1.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero

Na população de mulheres com carcinoma do colo do útero, estudou-se uma amostra populacional constituída por 135 mulheres com carcinoma do colo do útero. Esta população de mulheres, com idades compreendidas entre os 19 e os 77 anos, tem uma mediana de 42 anos.

4.1.3 População de grupo controlo

Relativamente à caracterização da população controlo, constituída por 777 mulheres que não apresentavam qualquer uma das patologias em estudo, as idades são compreendidas entre os 19 e 89 anos, com uma mediana de 56 anos.

4.2 Análise do polimorfismo 5-HTTVNTR do gene do transportador da serotonina

4.2.1 População de mulheres com leiomiomas

Para este polimorfismo do gene SLC6A4, obtivemos com sucesso, o genótipo de 115 mulheres com patologia e de 496 mulheres da população controlo.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos três genótipos possíveis na população controlo: 12/12 homozigótico sem mutação, caracterizado por uma banda com 299pb; 12/10 heterozigótico caracterizado por duas bandas com 299 e 265pb e 10/10 homozigótico com mutação, caracterizado por 265pb.

Para averiguar se a população controlo se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controlo não se encontra em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 4,142$; $p = 0,041$).

De seguida foi feita a distribuição das frequências genóticas da população de mulheres com leiomiomas e da população controlo (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 - Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com leiomiomas e população controlo

Genótipos	Leiomiomas N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
12/12	54 (47,0%)	220 (44,4%)	0,797
12/10	47 (40,9%)	205 (41,3%)	
10/10	14 (12,2%)	71 (14,3%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 0,453$; $p = 0,797$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*), associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos genótipos.

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.2 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com leiomiomas e população controlo

Alelos	Leiomiomas N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
12	155 (67,4%)	645 (65%)	0,495
10	75 (32,6%)	347 (35%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 0,464$; $p = 0,495$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos) verificando-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos alelos.

4.2.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero

Para este polimorfismo do gene SLC6A4, obtivemos com sucesso, o genótipo de 39 mulheres com patologia e de 496 mulheres da população controlo.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos três genótipos possíveis na população controlo: 12/12 homozigótico sem mutação, caracterizado por uma banda com 299pb; 12/10 heterozigótico caracterizado por duas bandas com 299 e 265pb; 10/10 homozigótico com mutação, caracterizado por 265pb.

Para averiguar se a população controlo se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controlo, não se encontra em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 4,142$; $p = 0,041$).

De seguida foi feita a distribuição das frequências genótípicas da população de mulheres com carcinoma do colo do útero e da população controlo (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 - Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Genótipos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
12/12	10 (25,6%)	220 (44,4%)	0,003
12/10	27 (69,2%)	205 (41,3%)	
10/10	2 (5,1%)	71 (14,3%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 11,672$; $p = 0,003$).

De seguida, calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se que o genótipo 12/12 teve um fator protetor associado (OR = 0,433, IC (95%) = [0,2063 – 0,9070], $p = 0,027$; e o genótipo 12/10 por sua vez, teve um efeito de risco associado (OR = 3,194), IC (95%) = [1,5811 – 6,4517]; $p < 0,001$).

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.4 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 5HTTVNTR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle

Alelos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
12	47 (60,3%)	645 (65%)	0,396
10	31 (39,7%)	347 (35%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 0,718$; $p = 0,396$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos) verificando-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos alelos.

4.3 Análise do polimorfismo T102C do gene do recetor 2A da serotonina

4.3.1 População de mulheres com leiomiomas

Para este polimorfismo do gene HTR2A, obtivemos com sucesso, o genótipo de 124 mulheres com patologia e 201 de mulheres da população controle.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos os três genótipos possíveis em ambas as populações: TT homozigótico sem mutação, caracterizado por uma banda de 344pb; CT heterozigótico caracterizado por três bandas com 344, 217 e 127pb e CC homozigótico com mutação, caracterizado por duas bandas com 217 e 127pb.

Para averiguar se a população controle se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controle não se encontra em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 6,186$; $p = 0,012$).

De seguida foi feita a distribuição das frequências genotípicas da população de mulheres com leiomiomas e da população controle, bem como os *Odds Ratio* (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.5 - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C na população de mulheres com leiomiomas e população controle

Genótipos	Leiomiomas N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
TT	28 (22,6%)	56 (27,9%)	0,436
CT	73 (58,9%)	116 (57,7%)	
CC	23 (18,5%)	29 (14,4%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças significativas na sua distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 1,659$; $p = 0,436$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*), associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos genótipos.

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.6 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo T102C na população de mulheres com leiomiomas e população controlo

Alelos	Leiomiomas N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
T	129 (52%)	228 (56,7%)	0,242
C	119 (48%)	174 (43,3%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 1,369$; $p = 0,242$)

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos) verificando-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos alelos.

4.3.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero

Para este polimorfismo do gene HTR2A, obtivemos com sucesso, o genótipo de 41 mulheres com patologia e de 201 mulheres da população controlo.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos os três genótipos possíveis em ambas as populações: TT homozigótico sem mutação, caracterizado por uma banda de 344pb; CT heterozigótico caracterizado por três bandas com 344, 217 e 127pb e CC homozigótico com mutação, caracterizado por duas bandas com 217 e 127pb.

Para averiguar se a população controlo se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controlo não se encontra em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 6,186$; $p = 0,012$).

De seguida foram comparadas as distribuições das frequências genotípicas da população de mulheres com carcinoma do colo do útero e da população controlo (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7 - Distribuição genotípica do polimorfismo T102C na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle

Genótipos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
TT	7 (17,1%)	56 (27,9%)	0,272
CT	29 (70,7%)	116 (57,7%)	
CC	5 (12,2%)	29 (14,4%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças significativas na distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 2,607$, $p = 0,272$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*), associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos genótipos.

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.8 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo T102C na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle

Alelos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
T	43 (52,4%)	228 (56,7%)	0,477
C	39 (47,6%)	174 (43,3%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que não existem diferenças significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 0,506$; $p = 0,477$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos) verificando-se não existirem valores de risco associados a nenhum dos alelos.

4.4 Análise do polimorfismo Arg16Gly do gene do recetor β_2 -adrenérgico

4.4.1 População de mulheres com leiomiomas

Para este polimorfismo do gene ADRB2, obtivemos com sucesso, o genótipo de 91 mulheres com patologia e de 151 mulheres da população controlo.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos os três genótipos possíveis em ambas as populações: GG homocigótico sem mutação, caracterizado por uma banda de 291pb; AG heterocigótico caracterizado por duas bandas com 308 e 291pb e AA homocigótico com mutação, caracterizado por uma banda com 308pb.

Para averiguar se a população controlo se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controlo encontra-se em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 0,006$; $p = 0,936$).

De seguida foi feita a distribuição das frequências genotípica da população de mulheres com leiomiomas e da população controlo, bem como os *Odds Ratios* (**Tabela 4.9**).

Tabela 4.9 - Distribuição genotípica do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com leiomiomas e população controlo

Genótipos	Leiomiomas N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
AA	39 (42,9%)	37 (24,5%)	<0,001
AG	48 (52,7%)	75 (49,7%)	
GG	4 (4,4%)	39 (25,8%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que existem diferenças significativas na sua distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 20,875$; $p < 0,001$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*), associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se que o genótipo AA teve um efeito de risco associado (OR = 2,311), IC (95%) = [1,324 – 4,032]; $p = 0,003$; e o genótipo GG por sua vez, teve um efeito protetor associado (OR = 0,132), IC (95%) = [0,045 – 0,383]; $p < 0,001$.

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.10 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com leiomiomas e população controle

Alelos	Leiomiomas N (%)	Controle N (%)	Valor de p*
Arg	126 (69,2%)	149 (49,3%)	<0,001
Gly	56 (30,8%)	153 (50,7%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que existem diferenças significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 18,317$; $p < 0,001$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos), a fim de se medir a força de associação de cada alelo com a doença. Verificou-se que o alelo Arg teve um efeito de risco associado (OR = 2,310), IC (95%) = [1,568 – 3,403]; $p < 0,001$; e o alelo Gly por sua vez, teve um efeito protetor associado (OR = 0,433), IC (95%) = [0,293 – 0,637]; $p < 0,001$.

4.4.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero

Para este polimorfismo do gene ADRB2, obtivemos com sucesso, o genótipo de 31 mulheres com patologia e de 151 mulheres da população controle.

Na identificação deste polimorfismo, encontramos os três genótipos possíveis em ambas as populações: GG homozigótico sem mutação, caracterizado por uma banda de 291pb; AG heterozigótico caracterizado por duas bandas com 308 e 291pb e AA homozigótico com mutação, caracterizado por uma banda com 308pb.

Para averiguar se a população controle se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controle encontra-se em equilíbrio de HWE ($\chi^2 = 0,006$; $p = 0,936$).

De seguida foi feita a distribuição das frequências genotípica da população de mulheres com carcinoma do colo do útero e da população controle, bem como os *Odds Ratios* (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 - Distribuição genotípica do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle

Genótipos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controle N (%)	Valor de p*
AA	19 (61,3%)	37 (24,5%)	<0,001
AG	10 (32,3%)	75 (49,7%)	
GG	2 (6,5%)	39 (25,8%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que existem diferenças significativas na sua distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 17,268$; $p < 0,001$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*), associado à presença de cada genótipo (um genótipo versus os outros dois), a fim de medir a força de associação de cada genótipo com a doença. Verificou-se que o genótipo AA teve um fator de risco associado (OR = 4,878), IC (95%) = [2,165 – 10,991], $p < 0,001$; e o genótipo GG por sua vez, teve um efeito protetor associado (OR = 0,198), IC (95%) = [0,045 – 0,868], $p = 0,032$.

De seguida, procedeu-se à análise das frequências alélicas, estando descritas na seguinte tabela.

Tabela 4.12 - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo Arg16Gly na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Alelos	Carcinoma do colo do útero N (%)	Controlo N (%)	Valor de p*
Arg	48 (77,4%)	149 (49,3%)	<0,001
Gly	14 (22,6%)	153 (50,7%)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que existem diferenças significativas na distribuição alélica entre as duas populações ($\chi^2 = 16,3366$; $p < 0,001$).

De seguida calculou-se o fator de risco (*Odds Ratio*) associado à presença de cada alelo (homozigóticos e heterozigóticos), a fim de se medir a força de associação de cada alelo com a doença. Verificou-se que o alelo Arg teve um fator de risco associado (OR = 3,521), IC (95%) = [1,862 – 6,654], $p < 0,001$; e o alelo Gly por sua vez, teve um fator protetor associado (OR = 0,284), IC (95%) = [0,150 – 0,536], $p < 0,001$.

4.5 Análise de relações epistáticas

Para cada patologia foram realizados estudos de associação com todas as combinações possíveis de genótipos entre dois genes. Os genes no estudo foram: SLC6A4, HTR2A e ADBR2.

Em todas as análises realizadas, os genótipos foram analisados separadamente ou agrupados (homozigóticos mais heterozigóticos) de modo a testar o efeito da presença/ausência de um alelo. Quando se obteve uma associação significativa, testou-se o risco, através do *Odds Ratio* (OR). Só serão apresentados os resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Os diferentes genótipos dos genes SLC6A4, HTR2A e ADBR2 encontram-se descritos na seguinte tabela.

Tabela 4.13 - Genótipos em estudo nas relações epistáticas

SLC6A4	HTR2A	ADBR2
12/12	TT	AA
12/10	CT	AG
10/10	CC	GG

4.5.1 Análise das relações epistáticas nos leiomiomas

Das combinações realizadas com os três genes, foram obtidos alguns resultados significativos.

Entre eles, está a associação entre os genótipos AA – 12/12 dos genes ADBR2 e SLC6A4 respetivamente, verificando-se uma associação entre os leiomiomas e a presença conjunta destes dois genótipos (**Tabela 4.14**).

Tabela 4.14 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA -12/12 dos genes ADBR2 e SLC6A4 e leiomiomas

Combinações	Controlo N (%)	Leiomiomas N (%)	Valor de p*
AA – 10/12 AA – 10/10 GG – 12/12 GG – 12/10 GG – 10/10 AG – 12/12 AG – 12/10 AG – 12/12	127 (92,7%)	70 (83,3%)	0,030
AA – 12/12	10 (7,3%)	14 (16,7%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (2,540) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica AA – 12/12 confere um risco duas vezes superior (OR = 2,540; IC (95%) = [1,072 – 6,017]).

De seguida obtivemos um segundo resultado significativo nos leiomiomas, com a combinação dos genótipos GG – 12/12, dos genes ADBR2 e SLC6A4 respetivamente (**Tabela 4.15**).

Tabela 4.15 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - 12/12 dos genes ARB2 e SLC6A4 e leiomiomas

Combinações	Controlo N (%)	Leiomiomas N (%)	Valor de p*
AA - 12/12 AA - 12/10 AA - 10/10 GG - 12/10 GG - 10/10 AG - 12/12 AG - 12/10 AG - 10/10	123 (89,8%)	82 (97,6%)	0,029
GG - 12/12	14 (10,2%)	2 (2,4%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (0,214) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica GG - 12/12 confere proteção (OR = 0,214; IC (95%) = [0,047 - 0,968]).

De seguida procedeu-se à análise dos genótipos dos genes ADBR2A e HTR2A. E obteve-se resultados significativos, entre eles a combinação dos genótipos AA - TT (**Tabela 4.16**).

Tabela 4.16 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - TT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas

Combinações	Controlo N (%)	Leiomiomas N (%)	Valor de p*
AA - CT AA - CC GG - TT GG - CT GG - CC AG - TT AG - CT AG - CC	104 (97,2%)	79 (86,8%)	0,006
AA - TT	3 (2,8%)	12 (13,2%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (5,266) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica AA - TT confere um risco cinco vezes superior (OR = 5,266; IC (95%) = [1,437 - 19,293]).

De seguida, obtivemos um segundo resultado significativo na combinação dos genótipos GG - TT dos genes ADBR2 e HTR2A (**Tabela 4.17**).

Tabela 4.17 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - TT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas

Combinações	Controlo N (%)	Leiomiomas N (%)	Valor de p*
AA - TT AA - CT AA - CC GG - CT GG - CC AG - TT AG - CT AG - CC	97 (90,7%)	90 (98,9%)	0,012
GG - TT	10 (9,3%)	1 (1,1%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (0,108) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica GG – TT confere proteção (OR = 0,108; IC (95%) = [0,014 – 0,859]).

Obtivemos ainda um terceiro resultado significativo na combinação dos genótipos GG – CT dos genes ADBR2 e HTR2A (**Tabela 4.18**).

Tabela 4.18 - Associação epistática entre a combinação genotípica GG - CT dos genes ADBR2 e HTR2A e leiomiomas

Combinações	Controlo N (%)	Leiomiomas N (%)	Valor de p*
AA – TT AA – CT AA – CC GG – TT GG – CC AG – TT AG – CT AG – CC	91 (85,0%)	88 (96,7%)	0,006
GG – CT	16 (15,0%)	3 (3,3%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (0,194) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica GG – CT confere proteção (OR = 0,194; IC (95%) = [0,055 – 0,689]).

De seguida procedeu-se ao estudo das relações epistáticas no carcinoma do colo do útero.

4.5.2 Análise das relações epistáticas no carcinoma do colo do útero

Para a análise das relações epistáticas no carcinoma do colo do útero, combinaram-se os diferentes genótipos dos genes SLC6A4, HTR2A e ADBR2, descritos na **Tabela 4.7**.

De início realizou-se a análise dos genótipos dos genes ADBR2A e SLC6A4. E obteve-se resultados significativos, entre eles na combinação dos genótipos AA – 12/10 (**Tabela 4.19**).

Tabela 4.19 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - 12/10 dos genes ADRB2 e SLC6A4 e carcinoma do colo do útero

Combinações	Controlo N (%)	Carcinoma do colo do útero N (%)	Valor de p*
AA – 12/12 AA – 10/10 GG – 12/12 GG – 12/10 GG – 10/10 AG – 12/12 AG – 12/10 AG – 10/10	124 (90,5%)	14 (73,7%)	0,031
AA – 12/10	13 (72,2%)	5 (27,8%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (3,407) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica AA – 12/10 confere um risco três vezes superior (OR = 3,407; IC (95%) = [1,057 – 10,977]).

De seguida procedeu-se à análise dos genótipos dos genes ADBR2A e HTR2A, e obtivemos um resultado significativo na combinação dos genótipos AA – CT dos genes ADBR2 e HTR2A, respetivamente (**Tabela 4.20**).

Tabela 4.20 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - CT dos genes ADRB2 e HTR2A e carcinoma do colo do útero

Combinações	Controlo N (%)	Carcinoma do colo do útero N (%)	Valor de p*
AA – TT AA – CC GG – TT GG – CT GG – CC AG – TT AG – CT AG – CC	87 (81,3%)	5 (45,5%)	0,006
AA – CT	20 (18,7%)	6 (54,5%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (5,220) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica AA – CT confere um risco cinco vezes superior (OR = 5,220; IC (95%) = [1,448 – 18,821]).

De seguida, obtivemos um segundo resultado significativo na combinação dos genótipos AA – CC dos genes ADBR2 e HTR2A, respetivamente (**Tabela 4.21**).

Tabela 4.21 - Associação epistática entre a combinação genotípica AA - CC dos genes ADRB2 e HTR2A e carcinoma do colo do útero

Combinações	Controlo N (%)	Carcinoma do colo do útero N (%)	Valor de p*
AA – TT AA – CT GG – TT GG – CT GG – CC AG – TT AG – CT AG – CC	104 (97,2%)	9 (81,8%)	0,016
AA – CC	3 (2,8%)	2 (18,2%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (7,704) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica AA – CC confere um risco sete vezes superior (OR = 7,704; IC (95%) = [1,136 – 52,254]).

De seguida procedeu-se à análise dos genótipos dos genes SLC6A4 e HTR2A e obtivemos um resultado significativo na combinação dos genótipos 10/10 – CC (**Tabela 4.22**).

Tabela 4.22 - Associação epistática entre a combinação genotípica 10/10 - CC dos genes SLC6A4 e HTR2A e carcinoma do colo do útero

Combinações	Controlo N (%)	HPV N (%)	Valor de p*
12/12 – TT 12/12 – CT 12/12– CC 10/12 – TT 10/12 – CT 10/12 – CC 10/10 – TT AG – CT	184 (97,4%)	6 (75,0%)	0,001
10/10 – CC	5 (2,6%)	2 (25,0%)	

*Qui-quadrado de Pearson

Através do teste de *Odds Ratio* (12,267) conseguimos verificar que a presença da combinação genotípica 10/10 – CC confere um risco doze vezes superior (OR = 12, 267; (IC (95%) = [1,967 – 76,495]).

5. DISCUSSÃO

5.2 Discussão da análise dos polimorfismos na população de mulheres com leiomiomas e carcinoma do colo do útero

Para a realização deste estudo foram estudados dois tipos de tumores, benignos e malignos. Os leiomiomas representam o tumor benigno mais comum entre as mulheres, sendo uma das patologias mais frequentes no útero. A presença de leiomiomas uterinos afeta negativamente a qualidade de vida de uma mulher, bem como a sua fertilidade⁴. Devido à sua etiologia ainda desconhecida, sintomatologia e risco de reincidência, os leiomiomas uterinos necessitam de mais investigações a fim de se desenvolverem novas terapêuticas. A população estudada de mulheres com leiomiomas, provém de mulheres que se sujeitaram à técnica de embolização dos leiomiomas uterinos, sendo assim possível ter uma abordagem genética dos polimorfismos no desenvolvimento de leiomiomas. Por sua vez, o carcinoma do colo do útero, sendo um tumor maligno e um dos mais comuns entre as mulheres, representa um problema de saúde pública considerável. A sua complexidade de fatores e cofatores envolvidos, fazem com que os estudos dos mecanismos genéticos se tornem cada vez mais importantes no conhecimento desta patologia maligna.

São vários os fatores denominados de carcinogênicos, capazes de influenciar o desenvolvimento de tumores, tanto benignos como malignos. Estudos realizados nos últimos anos, forneceram evidências de ligações entre o stresse e o desenvolvimento de tumores, e estudos mais recentes identificaram vias de sinalização específicas em células cancerígenas que afetam a progressão tumoral e consequentes metástases, sendo que o sistema nervoso simpático-suprarrenal quando ativado também têm impacto funcional no microambiente tumoral e as catecolaminas estimulam a migração e invasão celular, levando ao aumento do crescimento e progressão tumoral². Neste sentido, o esclarecimento dessas vias é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens a fim de bloquear os efeitos da biologia do stresse sobre o crescimento celular. Para isso, tentou-se avaliar a existência de associação entre polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de ação de neurotransmissores e a existência de tumores benignos e malignos, nomeadamente leiomiomas e carcinoma do colo do útero.

Deste modo, foi assim levantada a hipótese de que variações na funcionalidade do recetor β_2 -adrenérgico conferidas pelo polimorfismo Arg16Gly, podem ter influência na progressão de tumores ginecológicos, tais como leiomiomas e carcinoma do colo do útero

No trabalho aqui apresentado, a média de idades da população de mulheres com leiomiomas situou-se nos 40 anos, o que corresponde ao reportado em vários estudos, sendo os leiomiomas mais comuns em idade reprodutiva, em média aos 40 anos de vida de uma mulher^{9 38}.

Os nossos resultados mostraram-se muito interessantes para o polimorfismo Arg16Gly, onde se observaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica entre a população de doentes com leiomiomas e a população controlo ($p < 0,001$), o que revela associação entre os polimorfismos do gene ADBR2 e os leiomiomas. Associado a essas diferenças, obteve-se o OR dos genótipos. Os resultados mostraram que as mulheres que apresentaram o genótipo homozigótico AA tiveram um risco duas vezes superior de desenvolver leiomiomas (OR = 2,311; (IC (95%) = [1,324 – 4,032]; $p = 0,003$), por sua vez, as mulheres que apresentaram o genótipo homozigótico GG tiveram um efeito protetor para os leiomiomas (OR = 0,132; (IC (95%) = [0,045 – 0,384]; $p < 0,001$).

Relativamente à distribuição alélica do mesmo polimorfismo, também se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), em que o alelo Arg mostrou um risco duas vezes superior de desenvolver leiomiomas (OR = 2,310; IC (95%) = [1,569 – 3,403], $p < 0,001$) e o alelo Gly mostrou ter efeito protetor para os leiomiomas (OR = 0,433; IC (95%) = [0,294 – 0,638], $p < 0,001$). O intervalo de confiança e o valor de p de ambos os resultados (genótipos e alelos), reforçam estatisticamente esta análise.

Para o mesmo polimorfismo Arg16Gly no carcinoma do colo do útero, também detetámos diferenças significativas na distribuição genotípica entre as populações ($p < 0,001$), o que revela associação entre o polimorfismo do gene ADBR2 e o carcinoma do colo do útero. Associado a essas diferenças, obteve-se o OR dos genótipos. Os resultados mostraram que as mulheres que apresentaram o genótipo homozigótico AA tiveram um risco acrescido de quatro vezes de desenvolver carcinoma do colo do útero (OR = 4,878), IC (95%) = [2,165 – 10,99], $p < 0,001$ e as mulheres que apresentaram o genótipo homozigótico GG tiveram um efeito protetor associado (OR = 0,198), IC (95%) = [0,045 – 0,869], $p = 0,032$. Relativamente à distribuição alélica do mesmo polimorfismo, também se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), em que o alelo Arg mostrou ter um risco três vezes superior de desenvolver carcinoma do colo do útero (OR = 3,521), IC (95%) = [1,863 – 6,655], $p < 0,001$ e o alelo Gly mostrou-se protetor para o carcinoma do colo do útero (OR = 0,284; IC 95% = [0,150 – 0,537], $p < 0,001$). O intervalo de confiança e o valor de p de ambos os resultados (genótipos e alelos), reforçam estatisticamente esta análise.

No trabalho aqui apresentado, para este polimorfismo nas duas populações em estudo, os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura, confirmando-se assim a existência de variações na funcionalidade do recetor β 2-adrenérgico, conferidas pelo polimorfismo Arg16Gly e o seu efeito na progressão de tumores ². Confirmou-se que intervenções no sentido de inibir as vias de sinalização β 2-adrenérgicas, reduzem a progressão e desenvolvimento de tumores ^{2 65 72 120}. Tal facto é explicado devido à molécula noradrenalina, que sendo um neurotransmissor, ativa adrenoceptores no corpo, incluindo os recetores β 2-adrenérgicos, que por sua vez são acoplados às proteínas G e iniciam processos de sinalização dentro das células que contém esses recetores ⁶⁹, sendo que estas moléculas induzem a migração de células tumorais ¹¹⁵, as vias adrenérgicas ao serem bloqueadas são impedidas de transmitir a passagem da mensagem para o interior das células e as suas respostas, ou seja, impedem o recetor β 2 de exercer a sua função. Dado isto, a variante com maior capacidade de down-regulation, ou seja, menor densidade de recetores (menor capacidade de ligação às catecolaminas), protege contra a progressão de tumores, sendo essa variante a Gly, que segundo estudos *in vitro* demonstraram que a presença deste alelo leva a um aumento na capacidade de down-regulation ⁷⁹. Por consequente, a presença deste alelo condiciona as respostas fisiológicas ao stresse, com implicações colaterais no desenvolvimento tumoral e vias necessárias à carcinogénese. Os resultados confirmam que de facto, o alelo Arg é um alelo de risco e o alelo Gly protetor para tumores, pois este último não está a ter a sua função devido ao impedimento da passagem de mensagem para o interior da célula e a sua resposta vai afetar a sua correta função, originando menos stresse e menos progressão dos tumores pela inibição das vias de sinalização beta adrenérgicas ^{2 65 72}.

Através do estudo deste polimorfismo, comprovou-se que alelo Arg e Gly têm um efeito de risco e proteção respetivamente, em ambos os grupos patológicos estudados. Os resultados obtidos vão de encontro ao esperado, confirmando o efeito destes alelos nas vias beta adrenérgicas e o seu subsequente efeito no crescimento tumoral ^{2 72 113 120}. Comprovou-se igualmente que o polimorfismo Arg16Gly têm um papel relevante no desenvolvimento e progressão de tumores benignos e malignos, nomeadamente leiomiomas e carcinoma do colo do útero.

Em relação ao polimorfismo 5HTTVNR do gene SLC6A4, e à sua possível associação com os leiomiomas, como já referido no capítulo 1.7.1.1, este é responsável por variações na quantidade de serotonina existente na fenda sináptica, devido às alterações nas taxas de recaptação, sendo que a serotonina tem influência na ativação do sistema nervoso simpático (SNS) podendo inibi-lo ^{74 121}. A serotonina na fenda sináptica regula as catecolaminas e ao inibir a sua produção há inibição da libertação das catecolaminas, por outro lado, quando há uma diminuição da serotonina, dá-se o efeito contrário, o SNS fica ativado e por consequente há uma maior produção de catecolaminas, originando assim mais catecolaminas ativas e causando um aumento do stresse ^{73 74 75}. Além do seu papel como neurotransmissor, a serotonina demonstra também ter um papel regulador no sistema nervoso central (SNC) ¹²¹, o que por sua vez pode ter influência nos mecanismos de ação de neurotransmissores e a existência de tumores ².

Os nossos resultados mostraram-se pouco conclusivos para o polimorfismo 5HTTVNR na população com leiomiomas, onde se observou não existirem diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ($p = 0,797$) e alélica ($p = 0,495$), mostrando não existir associação entre os polimorfismos do gene SLC6A4 e a existência de leiomiomas. Já para o mesmo polimorfismo 5HTTVNR na população com carcinoma do colo do útero, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ($p = 0,003$), o que revela associação entre o polimorfismo 5-HTTVNTR e o carcinoma do colo do útero. Associado a essas diferenças, obteve-se os OR dos genótipos, e neste sentido os resultados mostraram que as mulheres que apresentaram o genótipo 12/10 tiveram um risco três vezes superior de desenvolver carcinoma do colo do útero (OR = 3,194; IC (95%) = [1,581 – 6,452], $p < 0,001$) e as mulheres que tiveram o genótipo homocigótico 12/12 tiveram um efeito protetor associado (OR = 0,433; IC (95%) = [0,206 – 0,907]; $p = 0,027$).

Sendo o transportador da serotonina (5-HTT) a proteína responsável por remover a serotonina extracelular de volta ao neurónio sináptico, segundo a literatura, esperava-se que a o alelo de 10 repetições tivesse um efeito protetor por permitir uma maior quantidade de serotonina na fenda sináptica e consequentemente um abrandamento no SNS, inibindo assim a libertação de catecolaminas e originando menos stresse. Por sua vez, o alelo de 12 repetições está associado a uma maior taxa de recaptação de serotonina circulante, havendo uma menor disponibilidade de transportador de serotonina, originando menos serotonina na fenda sináptica e consequentemente aumentando a atividade do SNS, provocando um aumento de catecolaminas ativas, causando assim mais stresse e estimulando assim a migração e invasão celular, levando ao crescimento e progressão tumoral ^{2 83 88}. Pela lógica, o esperado seria o genótipo 12/12 conferir risco por ter uma maior disponibilidade do 5-HTT, no entanto o resultado apontou para o oposto, conferindo proteção. Através do estudo deste polimorfismo, os resultados obtidos para o carcinoma no colo do útero confirmam a existência de resultados contraditórios obtidos em estudos anteriormente realizados com este polimorfismo, sendo que ainda existe bastante divergência quanto a este assunto.

Ainda sobre a serotonina, em 1995 descobriu-se que a interleucina-1 β (IL-1 β) é um potente regulador da expressão genética do 5-HTT ¹²², e a sua produção é feita através do miométrio humano e está aumentada em mulheres que se encontram em fase reprodutiva, ou seja antes da entrada na menopausa ¹²³. Os valores de IL-1 β não foram avaliados neste estudo, assim em estudos futuros valeria a pena ver se existem variações dos níveis de IL-1 β e averiguar os seus efeitos sobre o 5-HTT, pois os níveis de IL-1 β em mulheres pré-menopáusicas são superiores, o que por si só vai aumentar a expressão do transportador da serotonina.

Neste estudo também não tivemos controlo sobre a obesidade e não foram avaliados os índices de massa corporal (IMC) dos vários grupos em estudo, por falta de parâmetros clínicos.

Os valores do IMC poderiam também explicar os resultados não serem os esperados, pois não controlámos pela obesidade e esta tem influência devido à leptina inibir a síntese de serotonina^{124 125}.

Por fim, para o polimorfismo T102C, referido no capítulo 1.7.1.2, pretendemos analisar o papel do recetor 2A da serotonina, para que tivéssemos uma relação em termos do metabolismo da mesma. O alelo T tem sido associado a um maior número de recetores no SNC e indivíduos com o genótipo homozigótico C têm expressões menores do gene, tendo sido sugerido que a variante C resulta numa baixa atividade promotora afetando a transcrição do gene^{101 106}, resultando em indivíduos com a mutação a apresentarem menos expressão e conseqüentemente mais stresse e mais risco para tumores. A influência não foi muito relevante no estudo isolado de genótipos/alelos, pois não encontramos diferenças na distribuição dos recetores 2A. Para a análise deste polimorfismo em mulheres com leiomiomas, não detetámos diferenças significativas na distribuição genotípica entre as populações e relativamente à distribuição alélica, também não houve associação entre ambos. Para o mesmo polimorfismo no carcinoma do colo do útero, também não detetamos diferenças significativas na distribuição genotípica e relativamente à distribuição alélica, também não se observaram diferenças significativas na sua distribuição. No decorrer deste trabalho, não se encontraram resultados significativos para o polimorfismo T102C no estudo genótipo/fenótipo que associem este polimorfismo ao desenvolvimento de leiomiomas ou carcinoma do colo do útero. No entanto, resultados relevantes foram obtidos na análise epistática e vão ser discutidos mais à frente (**Capítulo 5.2**).

5.2 Discussão dos resultados de relações epistáticas nos leiomiomas e carcinoma do colo do útero

A epistasia desempenha um papel importante na suscetibilidade a doenças humanas, devido ao genes epistáticos terem influência em diversas doenças, podendo afetá-las de forma positiva ou negativa¹²⁶. Devido a esta influência, as doenças podem ter diversas ações dependendo da etnia e do indivíduo portador de doença. A epistasia é provavelmente o principal mecanismo que explica a variabilidade fenotípica interindividual de doenças genéticas. A crescente capacidade de definir genes epistáticos na doença pode fazer com que sejam criadas novas estratégias terapêuticas estando de acordo com os riscos envolvidos¹²⁷. Nesta análise pretendeu-se procurar relações epistáticas entre genes de forma a concluir se uma combinação específica de alelos de diferentes locus poderão estar associados a determinado fenótipo bioquímico e/ou clínico.

Conforme os resultados obtidos na análise epistática realizada, foi observado no caso dos leiomiomas que os genótipos GG – 12/12 dos genes ADRB2 e SLC6A4 respetivamente, com um OR = 0,214, deu-se um efeito protetor para leiomiomas com estes dois genótipos associados. No entanto o resultado não era o esperado, visto que o alelo 12 está relacionado com um maior risco. Este pode ser um caso de epistasia em que a interação entre dois genes de locus diferentes modificam as condições celulares e/ou fisiológicas previstas para o contributo de cada gene isoladamente, condicionando assim o fenótipo¹²⁷. Confirma-se assim a influência da epistasia entre genes e a existência de uma relação epistática antagonista em que o alelo G melhora o contributo do alelo 12 do gene SLC6A4.

De seguida obtivemos um resultado significativo para o genótipo AA do gene ADRB2 associado ao genótipo 12/12 do gene do transportador da serotonina, estando esta associação duas vezes mais associada a leiomiomas (OR = 2,540), sendo que o alelo A é um alelo de risco e o alelo 12 está relacionado com um maior risco de depressão e stresse, obtivemos também um valor esperado, com risco aumentado do genótipo AA isolado (OR = 2,311) na presença do genótipo homozigótico 12/12 também de risco esperado. Verifica-se que a combinação AA – 12/12 está associada ao risco de leiomiomas. Concluindo-se que apesar do genótipo de SLC6A4 isoladamente não estar associado à patologia, quando combinado com o genótipo homozigótico AA dá-nos uma associação significativa ($p = 0,030$). Este é um exemplo de como o contexto genómico tem influência no fenótipo¹²⁷.

De seguida, obtivemos um resultado significativo para o genótipo AA – TT dos genes ADRB2 e HTR2A respetivamente, com um OR = 5,266. Curiosamente, o genótipo AA do gene ADRB2, aumenta muito o risco quando em combinação com o alelo T. O que não seria esperado, visto que o alelo T está descrito como protetor. Isto apenas ocorreu nos leiomiomas, não se verificando no carcinoma do colo do útero. Demonstrando assim a importância da interação entre genes no fenótipo e a importância do contexto patológico. O efeito dos polimorfismos é específico da interação dos genes, genótipos e da patologia em estudo¹²⁷.

De seguida, obtivemos um resultado significativo para o genótipo GG – TT, dos genes ADRB2 e HTR2A respetivamente, com um OR = 0,108. Através deste resultado podemos verificar que existe uma associação entre esta combinação e a ausência de leiomiomas, atribuindo-se assim um fator protetor. Tal resultado era o esperado, pois ambos os genótipos são protetores para os tumores.

De seguida, para o mesmo homozigótico GG, obtivemos um resultado significativo para o genótipo GG em associação com o heterozigótico CT do gene HTR2A, com um OR = 0,194. Através deste resultado podemos verificar que existe uma associação entre esta combinação e a ausência de leiomiomas, atribuindo-se assim um fator protetor a esta combinação.

O genótipo GG (ao contrário do AA) mostrou-se protetor no caso dos leiomiomas em situações de epistasia com outros alelos protetores (alelo T do HTR2, incluindo TT e TC).

De seguida, procedeu-se à análise de relações epistáticas no carcinoma de colo do útero, sendo que o primeiro resultado significativo que se obteve foi para os genótipos AA – 12/10, dos genes ADBR2 e SLC6A4 respetivamente, com um OR = 3,407. Este resultado indica um risco três vezes superior de carcinoma do colo do útero. Tal resultado deve-se ao facto do alelo A ser a variante com maior capacidade de ligação às catecolaminas, logo aumenta risco de stresse e tumores. Já em relação ao alelo 12, este sendo a variante de risco devido a uma maior recaptura de serotonina e originando por sua vez menos serotonina circulante, o que resulta num travão menor do SNS e maior libertação de catecolaminas, este resultado de risco era o esperado desta associação. Este resultado indica um risco três vezes superior de carcinoma do colo do útero, comparativamente à população controlo, sendo um resultado esperado, confirmando assim o risco do alelo A e do alelo 12. O genótipo isolado 12/10 (OR = 3,194) em associação com o genótipo AA (OR = 4,878) aumenta o risco no carcinoma do colo do útero.

De seguida obtivemos resultados significativos para o genótipo homocigótico AA do gene ADBR2. Primeiro em associação com o genótipo CT do gene ADBR2, verificámos que o alelo A do gene ADBR2 aumenta muito o risco na presença do alelo C do gene HTR2A no carcinoma do colo do útero (OR = 5,220), com um risco cinco vezes superior. De seguida, em homocigotia na presença da combinação com o genótipo CC o risco torna-se ainda maior (OR = 7,704). Estes resultados indicam que de facto o alelo C é um alelo de risco elevado. É importante mencionar que o alelo A isolado tem um risco menor (OR = 3,521) do que em epistasia, pelo menos no carcinoma do colo do útero.

Por último, seguiu-se a associação epistática entre os genótipos 10/10 – CC dos genes SLC6A4 e HTR2A respetivamente, com um OR = 12,267, Sendo este o resultado de risco mais elevado neste estudo. Se o genótipo AA fosse muito mau, a associação dos genótipo AA – 10/10 deveria ter dado um risco muito alto e não deu. Podemos afirmar que o risco não está só dependente da associação de genótipos, mas também do contexto genómico em que estão inseridos ¹²⁷.

6. CONCLUSÕES

Um dos principais objetivos deste trabalho era caracterizar as frequências de três polimorfismos genéticos, dois relacionados com a serotonina: o 5HTTVNTR e 5HTR2A, e um relacionado com o recetor β_2 -adrenérgico: o Arg16Gly, todos num grupo de indivíduos com tumores ginecológicos e num grupo controlo a fim de determinar a relevância destes polimorfismos para a suscetibilidade de tumores através de vias neurotransmissoras, sendo estas biomoléculas libertadas nas sinapses dos neurónios com a função de transmitir ou alterar a transmissão da informação, e assim essenciais ao sistema nervoso.

Através deste estudo podemos verificar que as vias de sinalização dos recetores β_2 -adrenérgicos conferidas pelo polimorfismo Arg16Gly, afetam diretamente as células cancerígenas, através das catecolaminas, onde vão estimular a migração e invasão celular, levando ao crescimento e progressão do tumor. Através deste estudo conclui-se que o polimorfismo Arg16Gly têm de facto um papel relevante no desenvolvimento e progressão de tumores benignos e malignos, nomeadamente leiomiomas e carcinoma do colo do útero, confirmando a existência de associação entre um polimorfismo de um gene que codifica proteínas envolvidas em mecanismos de ação de neurotransmissores e a existência de tumores.

Apesar de muita informação disponível, o polimorfismo Arg16Gly ainda tem muito a ser explorado até se concluir algo que tenha um impacto terapêutico e principalmente preventivo na medicina atual. Os betabloqueadores podem representar uma categoria nova e relativamente segura de medicamentos para a prevenção e possível tratamento de cancro, ao mesmo tempo que esclarecem as bases fisiopatológicas de alguns tipos de tumores, no entanto ainda se espera que novos estudos contribuam de maneira efetiva a fim de ser demonstrado não somente uma relação de associação, mas principalmente uma relação de causa-efeito entre os polimorfismos dos recetores adrenérgicos e a sua repercussão funcional.

No estudo do polimorfismo 5HTTVNTR, apesar de muitos estudos anteriormente realizados, este ainda se mostra algo controverso. Mais estudos serão necessários para aferir a possível relação entre este polimorfismo e as implicações no microambiente tumoral.

Para o polimorfismo T102C, analisámos o papel do recetor 2A da serotonina, para que tivéssemos uma relação em termos do metabolismo da serotonina. A influência no nosso estudo de genótipos isolados não foi muito relevante, mas em relação aos estudos de epistasia já se mostrou coerente, mostrando assim a importância de estudos epistáticos. É importante salientar que usamos os genótipos como marcadores indiretos da alteração da função, sendo que a nossa ideia é entendermos o mecanismo que nos leva à doença.

Neste estudo pretendeu-se também procurar relações epistáticas entre genes de forma a concluir se uma combinação específica de alelos de diferentes locus poderão estar associados a determinado fenótipo bioquímico e/ou clínico. Nem todos os resultados significativos seguiram o mesmo padrão. Concluímos que existe uma influência da epistasia entre genes.

A epistasia é um instrumento importante quando se tentam encontrar fatores genéticos que expliquem a variabilidade fenotípica interindividual em determinadas patologias, fazendo assim, com que seja possível desenvolver novas terapias tendo em conta os riscos implicados. Desta forma os estudos de epistasia são essenciais e não devem ser ignorados.

Os resultados apontaram para um papel proeminente do stresse no crescimento e desenvolvimento de tumores benignos e malignos, sendo que o sistema nervoso simpático e a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, têm de facto impactos funcionais e biológicos no microambiente tumoral.

Apesar das referências bibliográficas serem vastas nestes polimorfismos, a maioria não está relacionada diretamente com leiomiomas ou carcinoma do colo do útero. Em Portugal, estudos sobre tumores com estes polimorfismos são muito poucos. Sendo o cancro uma doença de enorme relevância, seria essencial desenvolver mais estudos nesta área.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Radić, S., Stanojević, Z. & Đindić, B. The pathogenesis of neoplasia. *Arch. Oncol.* 12, 35–37 (2004).
2. Moreno-Smith, M., Lutgendorf, S. K. & Sood, A. K. Impact of stress on cancer metastasis. *Futur. Oncol.* 6, 1863–1881 (2011).
3. Conceição, J. C. *Ginecologia Fundamental*. (Atheneu, 2016).
4. Rod R., S., Trent D., S. & Tate, P. *Anatomia e Fisiologia*, 6^a ed. (Lusociência, 2003).
5. Blake, R. E. Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *J. Natl. Med. Assoc.* 99, 1170–1184 (2007).
6. Khan, A. T., Shehmar, M. & Gupta, J. K. Uterine fibroids: current perspectives. *Int. J. Womens. Health* 6, 95–114 (2014).
7. Pisco, J. et al. Embolização das artérias uterinas nos fibromiomas em 500 doentes. *Patient Care* 83–90 (2008).
8. Rice, K. E., Secrist, J. R., Woodrow, E. L., Hallock, L. L. & Neal, J. L. Etiology, Diagnosis, and Management of Uterine Leiomyomas. *J. Midwifery Women's Heal.* 241–248 (2012).
9. Pisco, J., Duarte, M., Bilhim, T. & Tinto, H. R. Embolização de fibromiomas uterinos em 882 pacientes (único centro). *Salut. Sci. – Rev. Ciências da Saúde da ESSCVP* 2, 1–21 (2010).
10. Pisco, J. Embolização das artérias uterinas: Terapêutica alternativa eficaz para os fibromiomas. *Patient Care* 101–105 (2005).
11. Fields, K. R. & Neinstein, L. S. Uterine Myomas in Adolescents: Case Reports and a Review of the Literature. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 9, 195–198 (1996).
12. Cramer, S. F. & Patel, A. The frequency of Uterine Leiomyomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 94, 435–438 (1990).
13. Rein, M. S., Barbieri, R. L. & Friedman, A. J. Progesterone: A critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172, 14–18 (1995).
14. Laughlin, S. K., Baird, D. D., Savitz, D. A., Herring, A. H. & Hartmann, K. E. Prevalence of Uterine Leiomyomas in the First Trimester of Pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 113, 630–635 (2009).
15. Wallach, E. E. & Vlahos, N. F. Uterine Myomas: An Overview of Development, Clinical Features, and Management. *Am. Coll. Obstet. Gynecol.* 104, 393–406 (2004).
16. Castelão, C. D. Papel dos mecanismos envolvendo esteróides sexuais (E1 e E2), sua variação genética e biomarcadores circulantes na etiopatogenia de tumores ginecológicos (leiomiomas e cancro do colo do útero). (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013).
17. Morton, C. C. Many Tumors and Many Genes. *Am. J. Pathol.* 153, 1015–1020 (1998).
18. Marshall, L. M. et al. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil. Steril.* 70, 432–9 (1998).
19. Vikhlyaeva, E. M., Khodzhaeva, Z. S. & Fantschenko, N. D. Familial predisposition to uterine leiomyomas. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 51, 127–131 (1995).

20. Marshall, L. M. et al. Variation in the Incidence of Uterine Leiomyoma Among Premenopausal Women by Age and Race. *Obstet. Gynecol.* 90, 967–973 (1997).
21. Ross, R. K. et al. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *Br. Med. J.* 293, 359–62 (1986).
22. Parazzini, F. et al. Reproductive factors and risk of uterine fibroids. *Epidemiology* 7, 440–442 (1996).
23. Baird, D. D. & Dunson, D. B. Why is parity protective for uterine fibroids? *Epidemiology* 14, 247–250 (2003).
24. Pires, P. Papel do Óxido Nítrico Sintase e sua regulação nos tumores ginecológicos (Fibromiomas e carcinomas do colo do útero). (Universidade de Lisboa, 2017).
25. Wise, L. A. et al. Risk of uterine leiomyomata in relation to tobacco, alcohol and caffeine consumption in the Black Women’s Health Study. *Hum. Reprod.* 19, 1746–1754 (2004).
26. Laughlin, S. K., Schroeder, J. C. & Baird, D. D. New directions in the epidemiology of uterine fibroids. *Semin. Reprod. Med.* 28, 204–217 (2010).
27. Parker, W. H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil. Steril.* 87, 725–736 (2007).
28. Wise, L. A., Se, L., Palmer, J. R. & Rosenberg, L. Depressive Symptoms and Risk of Uterine Leiomyomata. *Am J Obs. Gynecol* 212, 617–1 (2016).
29. Baird, D. & Wise, L. A. Childhood abuse and fibroids. *Epidemiology* 22, 15–17 (2011).
30. Nielsen, N. R. et al. Self-reported stress and risk of endometrial cancer: A prospective cohort study. *Psychosom. Med.* 69, 383–389 (2007).
31. Wise, L. A. et al. Depressive symptoms and risk of uterine leiomyomata. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212, 617.e1-617.e10 (2014).
32. Corleta, H. von E., Chaves, E. B. M., Krause, M. S. & Capp, E. Tratamento atual dos miomas. *Rev. Ginecol. e Obstet.* 29, 324–328 (2007).
33. Benson, C. B., Chow, J. S., Chang-Lee, W., Hill, J. A. & Doubilet, P. M. Outcome of pregnancies in women with uterine leiomyomas identified by sonography in the first trimester. *J. Clin. Ultrasound* 29, 261–264 (2001).
34. Vilos, G. A. et al. The Management of Uterine Leiomyomas. *J. Obstet. Gynaecol. Canada* 37, 157–178 (2015).
35. Englund, K. et al. Sex Steroid Receptors in Human Myometrium and Fibroids: Changes during the Menstrual Cycle and Gonadotropin-Releasing Hormone Treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 4092–4096 (1998).
36. Parker, W. H. Uterine myomas: management. *Fertil. Steril.* 88, 255–271 (2007).
37. Gupta, S. & Manyonda, I. Hysterectomy for benign gynaecological disease. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 16, 147–153 (2006).
38. Pisco, J. et al. Embolização das artérias uterinas nos fibromiomas. Resultados a curto e médio prazo. *Intervencionismo* 7, 27–31 (2007).

39. Ravina, J. H. et al. Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 346, 671–672 (1995).
40. Faria, J., Godinho, C. & Rodrigues, M. Uterine fibroids – a review. *Acta Obs. Ginecol Port* 2, 131–142 (2008).
41. Hurts, B., Matthews, M. & Marshburn, P. Laparoscopic myomectomy for symptomatic uterine myomas. *J. Med. Soc. Toho Univ.* 83, 218–222 (2005).
42. Gupta, J., Sinha, A., Lumsden, M. & Hickey, M. Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Cochrane Libr.* 56 (2012).
43. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature* 10, 550–560 (2010).
44. Castellsagué, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 4–7 (2008).
45. Schiffman, M. & Kjaer, S. K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 20852, 14–9 (2003).
46. Organização Mundial da Saúde. Controle integral do câncer do colo do útero - Guia de práticas essenciais. (Organização Mundial da Saúde, 2016).
47. D'Souza, G. et al. Case-control study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 356, 1944–1956 (2007).
48. Castellsagué, X., Bosch, F. X. & Muñoz, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 89, 191–199 (2002).
49. Chung, S., Franceschi, S. & Lambert, P. F. Estrogen and ER α : Culprits in Cervical Cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 21, 504–511 (2010).
50. Hutter, J. N. & Decker, C. F. Human papillomavirus infection. *Disease-a-Month* 62, 294–300 (2016).
51. Ferlay, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917 (2010).
52. Franco, E. L., Duarte-Franco, E. & Ferenczy, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can. Med. Assoc.* 164, 1017–1025 (2001).
53. States, M., Strategic, W. H. O., Group, A., Grade, T. & Sage, T. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper. *World Heal. Organ.* 92, 241–268 (2017).
54. WHO. Sexually transmitted infections 2016-2021. *World Heal. Organ.* 1–61 (2016). doi:10.1055/s-2007-970201.
55. Sanjosé, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV in women with normal cytology. *Lancet Infect Dis* 7, 453–459 (2007).
56. Bicho, M. C. Contribuição para O Estudo de Biomarcadores e Co-factores no Cancro do Colo do Útero. (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, 2011).
57. Leto, M. das G. P., Porro, A. M., dos Santos Júnior, G. F. & Tomimori, J. Infecção pelo papilomavírus humano: Etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol* 86, 306–317 (2011).

58. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24, 1–10 (2006).
59. Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2, 342–350 (2002).
60. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890–907 (2007).
61. Gomes Peixoto, C. Artigo de Revisão: Papel do HPV e Cofatores no Cancro do Colo do Útero. (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2016).
62. Medeiros, R. & Ramada, D. Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. *Vaccine* 29, 153–160 (2010).
63. Mais vacinas gratuitas e HPV alargado aos rapazes. *Jornal de Notícias* (2018).
64. McCorry, L. S. Physiology of the Autonomic Nervous System. *Am. J. Pharm. Educ.* 71, 1–11 (2007).
65. Barron, T. I., Connolly, R. M., Sharp, L., Bennett, K. & Visvanathan, K. Beta blockers and breast cancer mortality: A population-based study. *J. Clin. Oncol.* 29, 2635–2644 (2011).
66. Cole, S. W., Nagaraja, A. S., Lutgendorf, S. K., Green, P. A. & Sood, A. K. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 15, 563–572 (2015).
67. Masur, K., Niggemann, B., Zanker, K. S. & Entschladen, F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells Is Inhibited by β -Blockers. *Cancer Res.* 61, 2866–2869 (2001).
68. Lang, K. et al. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int. J. Cancer* 112, 231–238 (2004).
69. Fitzgerald, P. J. Beta blockers, norepinephrine, and cancer: An epidemiological viewpoint. *Clin. Epidemiol.* 4, 151–156 (2012).
70. Thaker, P. H. et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* 12, 939–44 (2006).
71. Liu, H. et al. Activation of adrenergic receptor β 2 promotes tumor progression and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 41, 147–154 (2018).
72. Tang, J., Li, Z., Lu, L. & Cho, C. H. β -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* 23, 533–542 (2013).
73. Karsenty, G. & Oury, F. Biology Without Walls: The Novel Endocrinology of Bone. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 87–105 (2012).
74. Kawai, M. & Rosen, C. J. Minireview: A skeleton in serotonin's closet? *Endocrinology* 151, 4103–4108 (2010).
75. Schwetz, V., Pieber, T. & Obermayer-Pietsch, B. The endocrine role of the skeleton: Background and clinical evidence. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 959–967 (2012).

76. Nussbaum, R. L., Willard, H. F. & McInnes, R. R. Thompson & Thompson - Genética Médica. (Elsevier, 2008).
77. Fernando, R. Manual de Genética Médica. (Imprensa da Universidade de Coimbra, 2007).
78. Say, Y.-H. The association of insertions/deletions (INDELs) and variable number tandem repeats (VNTRs) with obesity and its related traits and complications. *J. Physiol. Anthropol.* 36, 25 (2017).
79. Atala, M. M. & Consolim-colombo, F. M. Influência dos polimorfismos dos genes dos recetores β -adrenérgicos na regulação cardiovascular e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Hipertens* 14, 258–264 (2007).
80. Drago, A. & Serretti, A. Focus on HTR2C: A possible suggestion for genetic studies of complex disorders. *Am. J. Med. Genet.* 150, 601–637 (2009).
81. Ducy, P. & Karsenty, G. The two faces of serotonin in bone biology. *J. Cell Biol.* 191, 7–13 (2010).
82. Warden, S. J., Robling, A. G., Haney, E. M., Turner, C. H. & Bliziotes, M. M. The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of the skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5). *Bone* 46, 4–12 (2010).
83. Bah, J. et al. Serotonin transporter gene polymorphisms: Effect on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 162, 221–229 (2008).
84. Ueno, S. Genetic polymorphisms of serotonin and dopamine transporters in mental disorders. *J. Med. Investig.* 50, 25–31 (2003).
85. Kuzelova, H., Ptacek, R. & Macek, M. The serotonin transporter gene (5-HTT) variant and psychiatric disorders. *Neuroendocrinol. Lett.* 31, 4–10 (2010).
86. Serretti, A., Calati, R., Mandelli, L. & Ronchi, D. De. Serotonin Transporter Gene Variants and Behavior : A Comprehensive Review. *Curr. Drug Targets* 7, 1659–1669 (2006).
87. Niesler, B. et al. 5-HTTLPR and STin2 polymorphisms in the serotonin transporter gene and irritable bowel syndrome: Effect of bowel habit and sex. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 856–861 (2010).
88. Hranilovic, D. et al. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: Relationship between allelic variants and gene expression. *Biol. Psychiatry* 55, 1090–1094 (2004).
89. Baca-Garcia, E. et al. Association between obsessive-compulsive disorder and a variable number of tandem repeats polymorphism in intron 2 of the serotonin transporter gene. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 31, 416–420 (2007).
90. Evans, J. et al. Association of short alleles of a VNTR of the serotonin transporter gene with anxiety symptoms in patients presenting after deliberate self harm. *Neuropharmacology* 36, 439–443 (1997).
91. Schürks, M., Rist, P. M. & Kurth, T. STin2 VNTR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: Pooled and meta-analyses. *J. Headache Pain* 11, 317–326 (2010).
92. Pizzo De Castro, M. R. et al. STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders. *J. Affect. Disord.* 172, 347–354 (2015).

93. Perez-Cornago, A., Mansego, M. L., Zulet, M. A. & Martinez, J. A. DNA hypermethylation of the serotonin receptor type-2A Gene is associated with a worse response to a weight loss intervention in subjects with metabolic syndrome. *Nutrients* 6, 2387–2403 (2014).
94. González-Castro, T. B. et al. Association of the 5HTR2A gene with suicidal behavior: CASE-control study and updated meta-analysis. *BMC Psychiatry* 13, 1–10 (2013).
95. Carhart-Harris, R. L. & Nutt, D. J. Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *J. Psychopharmacol.* 31, 1091–1120 (2017).
96. Boothman, L. J., Allers, K. A., Rasmussen, K. & Sharp, T. Evidence that central 5-HT 2a and 5-HT 2B/C receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat. *Br. J. Pharmacol.* 139, 998–1004 (2003).
97. Vazquez-Borsetti, P., Cortes, R. & Artigas, F. Pyramidal Neurons in Rat Prefrontal Cortex Projecting to Ventral Tegmental Area and Dorsal Raphe Nucleus Express 5-HT2A Receptors. *Cereb. Cortex* 19, 1678–1686 (2009).
98. Harvey, J. A. Role of the Serotonin 5-HT2A Receptor in Learning. *Learn. Mem.* 10, 355–362 (2003).
99. Rosmond, R., Bouchard, C. & Bjorntorp, P. 5-HT2A receptor gene promoter polymorphism in relation to abdominal obesity and cortisol. *Obes Res* 10, 585–589 (2002).
100. Correa, H. et al. Association study of T102C 5-HT2A polymorphism in schizophrenic patients: diagnosis, psychopathology, and suicidal behavior. 97–101 (2007).
101. Sujitha, S. P. et al. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) 2A receptor gene polymorphism is associated with schizophrenia. *Indian J Med Res* 140, 736–743 (2014).
102. Veenstra-VanderWeele, J. et al. Transmission disequilibrium studies of the serotonin 5-HT2A receptor gene (HTR2A) in autism. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* 114, 277–283 (2002).
103. Myers, R. L., Airey, D. C., Manier, D. H., Shelton, R. C. & Sanders-Bush, E. Polymorphisms in the Regulatory Region of the Human Serotonin 5-HT2A Receptor Gene (HTR2A) Influence Gene Expression. *Biol. Psychiatry* 61, 167–173 (2007).
104. Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. & Sugimoto, H. Multifunction of Myricetin on Ab: Neuroprotection Via a Conformational Change of Ab and Reduction of Ab Via the Interference of Secretases. *J. Neurosci. Res.* 83, 362–373 (2006).
105. Yildiz, S. H. et al. Association of schizophrenia with T102C (rs6313) and 1438 A/G (rs6311) polymorphisms of HTR2A gene. *Acta Neuropsychiatr.* 25, 342–348 (2013).
106. Jakubczyk, A., Jacek, Ł., Sadowska, J., Brower, K. J. & Wojnar, M. The CC genotype in HTR2A T102C polymorphism is associated with behavioral impulsivity in alcohol-dependent patients. *J Psychiatr Res.* 46, 44–49 (2012).
107. Poleskaya, O. O. & Sokolov, B. P. Differential expression of the ‘C’ and ‘T’ alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J. Neurosci. Res.* 67, 812–822 (2002).
108. Pereira, S. B., Gava, I. A., Giro, C. & Mesquita, E. T. Adrenergic Receptor Polymorphisms in Heart Failure: what can Genetics Explain? *Arq. Bras. Cardiol.* 94, 841–849 (2010).

109. Sivamani, R. K., Lam, S. T. & Isseroff, R. R. Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. *Dermatol. Clin.* 25, 643–653 (2007).
110. Genetic Home Reference - National Library of Medicine - ADRB2 gene. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ADRB2>. (Acedido a 31 Agosto 2018)
111. Small, K. M., McGraw, D. W. & Liggett, S. B. Pharmacology and Physiology of Human Adrenergic Receptor Polymorphisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 381–411 (2003).
112. Bortolotto, L. a. & Consolim-Colombo, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. *Rev Bras Hipertens* 16, 215–220 (2009).
113. Cole, S. W. & Sood, A. K. Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 1201–1206 (2012).
114. Suh, D. H., Lee, K. H., Kim, K., Kang, S. & Kim, J. W. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2014. *J. Gynecol. Oncol.* 26, 156–167 (2015).
115. Powe, D. G. et al. Beta-Blocker Drug Therapy Reduces Secondary Cancer Formation in Breast Cancer and Improves Cancer Specific Survival Abstract : *Oncotarget* 1, 628–638 (2010).
116. Calderón, D. Migração e invasão do câncer de boca via ativação de receptor beta 2 adrenérgico por mediador do estresse. (Universidade de São Paulo, 2015).
117. Taylor, M. R. G. & Bristow, M. R. The emerging pharmacogenomics of the beta-adrenergic receptors. *Congest. Heart Fail.* 10, 281–288 (2004).
118. Brodde, O. E. β -1 and β -2 adrenoceptor polymorphisms: Functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol. Ther.* 117, 1–29 (2008).
119. Szumilas, M. Explaining Odds Ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, 19, 227–229 (2010).
120. Gong, L. et al. Propranolol selectively inhibits cervical cancer cell growth by suppressing the cGMP/PKG pathway. *Biomed. Pharmacother.* 111, 1243–1248 (2019).
121. Fan, J. B. & Sklar, P. Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 10, 928–938 (2005).
122. Ramamoorthy, S. et al. Regulation of the human serotonin transporter by Interleukin-1 β . *Biochem. Biophys. Commun.* 216, 560–567 (1995).
123. Kekuda, R., Leibach, F. H., Furesz, T. C., Smith, C. H. & Ganapathy, V. Polarized distribution of interleukin-1 receptors and their role in regulation of serotonin transporter in placenta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1032–41 (2000).
124. Bliziotis, M. Update in serotonin and bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 4124–4132 (2010).
125. Oury, F. & Karsenty, G. Towards a serotonin-dependent leptin roadmap in the brain. *Trends Endocrinol Metab.* 22, 1–11 (2011).
126. Moore, J. H. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum. Hered.* 56, 73–82 (2003).
127. Nagel, R. L. Epistasis and the genetics of human diseases. *Comptes Rendus - Biol.* 328, 606–615 (2005).

8. ANEXOS

Anexo I – Consentimento Informado

Consentimento Informado e Livre para Testes de Susceptibilidade

A análise de biomarcadores entre eles os genéticos (genoma) que estão envolvidos nas doenças em geral podem ser estudadas e identificadas com o objectivo de determinar as causas genéticas/susceptibilidade em indivíduos com o diagnóstico clínico de, assim como na prevenção de doenças associadas e contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos biofisiopatológicos nas pessoas afectadas ou em risco/ susceptibilidade.

Fui informado(a) de forma adequada e inteligível sobre os mecanismos biológicos da doença, o seu modo de transmissão, o impacto na família, a evolução da sua história natural, a existência de terapêuticas ou intervenções médicas/ cirúrgicas possíveis, assim como a ausência das mesmas.

Decido livremente efectuar ou não efectuar (riscar o que não interessa) o estudo de biomarcadores referido, anteriormente.

Para este estudo é necessária a colheita de amostra de sangue, cerca de 2 a 5 ml no total. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para o estudo de biomarcadores (genéticos e outros) da doença acima referida

Autorizo a colheita de sangue para estudo de:

- Susceptibilidade ()
- Investigação ()

Autorizo/não autorizo (riscar o que não interessa) que o meu nome e informação clínica façam /não façam (riscar o que não interessa) parte do registo informático anonimizado do Laboratório de Genética que a amostra de sangue possa/não possa (riscar o que não interessa) ser utilizada para investigação desta doença, de forma anonimizada.

Assinatura do consultado/a doente/ CI/familiar

Nome completo

.....

Serviço/Hospital/Unidade de Saúde

Nº do Processo Local data Dia /Mês/Ano /..... /.....

Nome do Médico

Assinatura

Nº Cédula Profissional / Vinheta

Anexo II – Tampões para PCR e eletroforese em gel de agarose e enzimas de restrição utilizadas

Tampões para PCR e eletroforese em gel de agarose

- Tampão de PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012622_PCR_Master_2X_K0171_UG.pdf

- Tampão TBE 10X (Grisp)

<http://www.grisp.pt/docs/gb12-tbe-buffer-10x-product-info.pdf>

- Corante Midori Green Advance (Nippon Genetics)

<https://www.nippongenetics.eu/en/product/midori-green-advance/>

- Marcador de peso Molecular 100bp Plus DNA Ladder (Thermofisher)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0321>

Enzimas de Restrição

- Enzima NcoI

<https://www.nzytech.com/products-services/speedy/mb100/>

- Enzima HpaII

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0541>

Anexo III – Géis de agarose com perfil eletroforético

A – Perfil eletroforético do polimorfismo 5-HTTVNTR do gene do transportador da serotonina

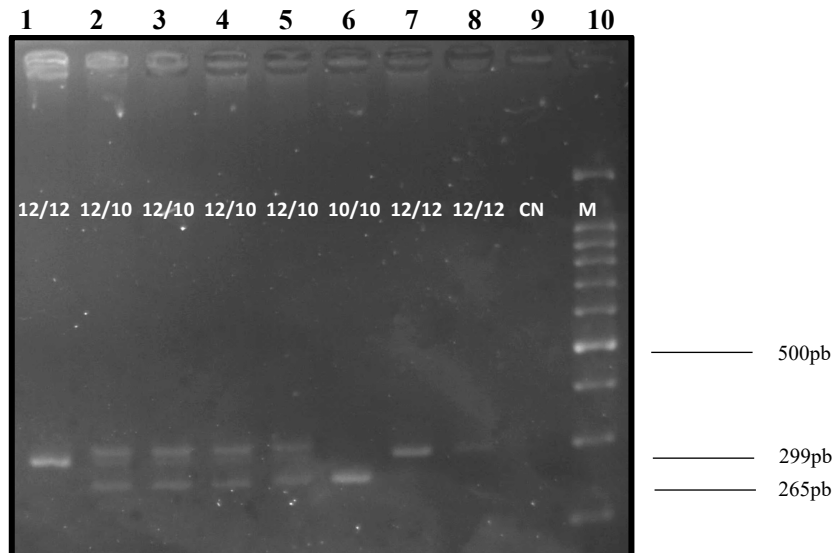


Figura 9.1 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genómica contendo o polimorfismo 5HTTVNTR do gene SLC6A4. Canais 1 a 8: Produto de amplificação de indivíduos em estudo. Canal 9: Controlo negativo. Canal 10: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen 100 bp DNA Ladder). Legenda: 12/12: homocigótico normal (299pb); 12/10: heterocigótico (299 + 265pb); 10/10: homocigótico mutado (265pb). Na figura está indicado o tamanho dos fragmentos (pb).

B – Perfil eletroforético do polimorfismo 5-HTR_{2A} do gene do recetor 2A da serotonina

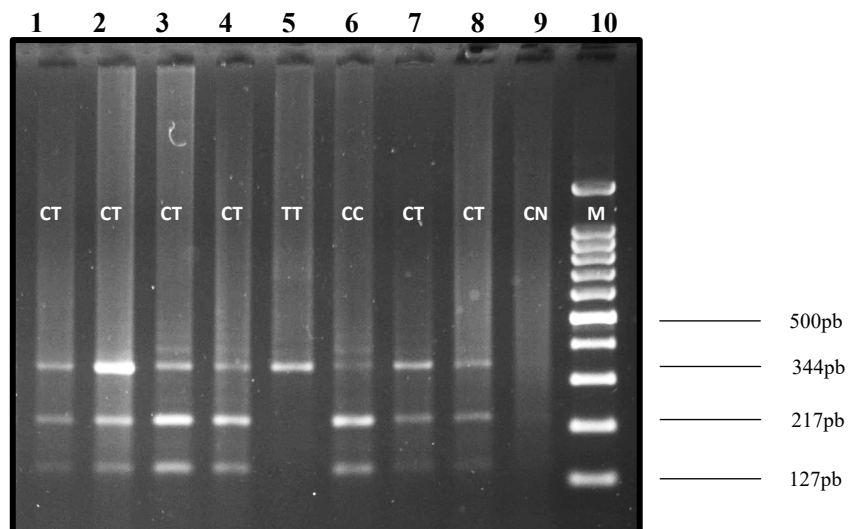


Figura 9.2 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma restrição da região genómica contendo o polimorfismo 5-HTR_{2A} do gene 5HTR2A. Canais 1 a 8: Produto de amplificação de indivíduos em estudo. Canal 9: Controlo negativo. Canal 10: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen 100 bp DNA Ladder) Legenda: TT: homocigótico normal (344pb); CT: heterocigótico (344 + 217 + 127pb); CC: homocigótico mutado (217 + 127pb); (C – citosina; T – timina). Na figura está indicado o tamanho do fragmento dos fragmentos (pb).

C – Perfil eletroforético do polimorfismo Arg16Gly do gene ADRB₂ do recetor adrenérgico β₂

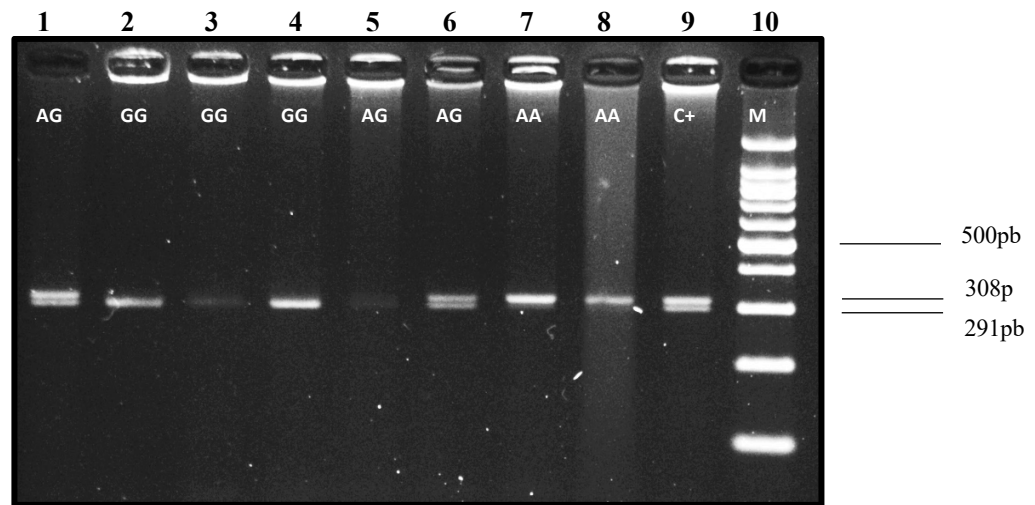


Figura 9.3 - Imagem de um gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma restrição da região genómica contendo o polimorfismo Arg16Gly do gene ADRB₂. Canais 1 a 8: Produto de amplificação de indivíduos em estudo. Canal 9: Controlo positivo. Canal 10: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen 100 bp DNA Ladder). Legenda: A/A: homozigótico normal; A/G: heterozigótico; G/G: homozigótico mutado; (A – arginina; G – glicina). Na figura está indicado o tamanho dos fragmentos (pb).