

## ***AGRADECIMENTO***

À Excelentíssima Senhora Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos, pela sua dedicação e pela sua disponibilidade, bem como pelos artigos fornecidos, muito úteis na orientação e realização deste trabalho.

## **ÍNDICE GERAL:**

I.	<i>RESUMO</i> .....	3
II.	<i>ABSTRACT</i> .....	5
III.	<i>NOTA INTRODUTÓRIA</i> .....	7
IV.	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	8
V.	<i>ESTROGÉNIOS E RECEPTORES DE ESTROGÉNIOS- MECANISMO DE ACÇÃO</i> .....	12
VI.	<i>INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA NOS RECEPTORES DE ESTROGÉNIO NA FISIOLOGIA E NA PATOLOGIA GINECOLÓGICA</i> .....	17
	A. Leiomioma.....	17
	B. Endometriose.....	21
	C. Idade da menarca.....	31
	D. Idade da Menopausa .....	34
	E. Fertilidade .....	38
	F. Cancro da Mama, Cancro do Endométrio e Cancro do Ovário ....	49
VII.	<i>CONCLUSÕES</i> .....	59
VIII.	<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> .....	61
IX.	<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	62

## **I. RESUMO**

**Introdução:** Os estrogénios influenciam muitos processos fisiológicos nos mamíferos, quer ligados aos órgãos reprodutivos e glândulas mamárias, quer ao sistema cardiovascular, ao metabolismo ósseo e mesmo ao comportamento. Os receptores dos estrogénios têm um papel central na acção destas hormonas nos tecidos e órgãos-alvo. São conhecidos dois subtipos de receptores dos estrogénios: Receptor dos Estrogénios-Alfa, o mais abundante no organismo, codificado pelo gene *ESR1*, localizado no cromossoma 6; e o Receptor dos Estrogénios-Beta, codificado pelo gene *ESR2*, situado no cromossoma 14. Vários polimorfismos têm sido identificados em ambos os genes, com graus variáveis de evidência da sua importância biológica e de associação a determinadas doenças ginecológicas.

**Objectivos:** Este trabalho consiste numa revisão bibliográfica sobre o papel dos polimorfismos dos receptores dos estrogénios em diversas patologias do foro ginecológico/obstétrico, com o objectivo de melhor compreender a susceptibilidade a patologias relacionadas com a exposição estrogénica, causadoras de morbilidade, mortalidade e diminuição da qualidade de vida.

**Desenvolvimento:** A literatura publicada e revista neste trabalho, não é unânime quanto à existência de associação entre os polimorfismos avaliados e a susceptibilidade para doenças ginecológicas, como os leiomiomas uterinos, a endometriose e os cancros da mama, do endométrio e do ovário, ou a parâmetros clínicos como idade da menarca, idade da menopausa ou a resposta à estimulação ovárica em técnicas de reprodução medicamente assistida; sendo os resultados apresentados, por vezes mesmo contraditórios. Comparando artigos em que se afirma a existência de uma associação, o grau de evidência desta relação e o seu significado clínico, é também variável.

**Conclusões:** Parece haver uma associação entre variações genéticas dos receptores de estrogénios e um aumento de susceptibilidade para algumas doenças. No entanto, serão necessários mais estudos para que o papel destes polimorfismos seja clarificado. A clarificação da etiologia genética destas doenças ou da influência destes polimorfismos em parâmetros clínicos, pode tornar estes polimorfismos importantes marcadores de susceptibilidade, facilitando a identificação de indivíduos em risco e no futuro, permitir o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas.

**Palavras-Chave:** *ESR1*, *ERS2*, Endometriose, Leiomioma, Fertilização *in vitro*, Menarca, Menopausa, Polimorfismos dos genes dos receptores dos estrogénios, Receptores dos estrogénios alfa e beta.

## **II. ABSTRACT**

**Introduction:** Estrogens influence many physiological processes in mammals, including but not limited to reproduction, cardiovascular health, bone integrity and behavior. The estrogen receptor plays an important role in mediating estrogen action on target tissues. Two subtypes of estrogen receptors are known: estrogen receptor alpha, the most abundant, encoded by the *ESR1* gene on chromosome 6; and the estrogen receptor beta, encoded by the *ESR2* gene on chromosome 14. Several polymorphisms have been identified in both genes of the estrogen receptors, with variable degrees of evidence of their direct biological significance and their association with some gynecological diseases.

**Objectives:** This review describes what has been published about the role of estrogen receptor gene polymorphisms in a number of gynecological diseases, to better understand the susceptibility to different diseases related to estrogen exposure, that are responsible for morbidity, mortality and that have an impact in quality of life.

**Results:** The published patents, reviewed here, are not unanimous in finding a correlation between the polymorphisms assessed and the susceptibility to different gynecological diseases, such as leiomyoma, endometriosis and breast cancer, or to clinical parameters such as age of menarche, age of menopause and outcome of ovarian stimulation in medically assisted reproduction; being the results, sometimes, even contradictory. Comparing different articles which results support the presence of an association, the degree of evidence and its clinical significance in which one of them, was also variable.

**Conclusion:** It seems to exist an association between estrogen receptor gene genetic variances and an increased in the susceptibility to some diseases. However, further studies are

necessary to clarify the role of these polymorphisms. By elucidating the genetic etiology of these diseases and the influence of these polymorphisms in clinical parameters, these polymorphism might become makers of susceptibility, allowing the identification of individuals at risk and, in the future, enabling individualized treatment to be tailored.

**Key Words:** *ESR1*, *ERS2*, Endometriosis, Leiomyoma, *in vitro* fertilization, Menarche, Menopause, Estrogen receptor gene polymorphisms, Estrogen receptor alpha and beta.

### **III. NOTA INTRODUTÓRIA**

Este artigo de revisão consiste no trabalho final de Mestrado Integrado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Este trabalho tem como tema “Variabilidade Genética dos Receptores dos Estrogénios e Patologia Ginecológica”.

No capítulo introdutório, começamos por apresentar o tema e os objectivos do trabalho. Posteriormente, procede-se a uma descrição das acções dos estrogénios e do papel desempenhado pelos receptores dos estrogénios no mecanismo de acção destas hormonas. No capítulo seguinte descrevem-se algumas das doenças e parâmetros clínicos que têm sido correlacionados com variações genéticas nos genes dos receptores dos estrogénios, nomeadamente a presença de leiomiomas uterinos, endometriose, cancro da mama, cancro do endométrio e cancro do ovário, idade da menarca e idade da menopausa e ainda resposta à estimulação ovárica em técnicas de reprodução medicamente assistida.

A pesquisa bibliográfica foi elaborada com o auxílio da base de dados “pubmed”, inicialmente tendo como limite de busca o ano de 1999 e posteriormente alargado para o ano de 1997, pelo interesse e enriquecimento deste artigo. As palavras-chave utilizadas foram as seguintes: *ESR1*, *ERS2*, Endometriose, Leiomioma, Fertilização *in vitro*, Menarca, Menopausa, Polimorfismos dos genes dos receptores dos estrogénios e Receptor dos estrogénios alfa e beta.

#### **IV. INTRODUÇÃO**

Os receptores dos estrogénios (RE) têm um papel importante na acção destas hormonas nos órgãos-alvo. São conhecidos dois subtipos de receptores dos estrogénios: RE- alfa (RE $\alpha$ ), o mais abundante no organismo, codificado pelo gene *ESR1*, localizado no cromossoma 6q25.1; e o RE-beta (RE $\beta$ ), codificado pelo gene *ESR2*, situado no cromossoma 14q22-24 (Deroo e Korach, 2006). Diferentes polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* têm vindo a conquistar relevância clínica nos últimos anos, ao serem associados a uma grande variedade de patologias. Alguns polimorfismos mais comuns dos RE têm sido associados a maior incidência de endometriose, leiomioma e ainda a susceptibilidade a aborto espontâneo, falência ovárica prematura e menor taxa de gravidez após fecundação *in vitro*. Também parece haver, em algumas populações, associação destes polimorfismos com a idade de menarca, isto é, com o início do funcionamento integrado do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Os polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* têm também sido associados a um aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama, cancro do ovário e cancro do endométrio (Maguire *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009; Lurie *et al.*, 2009; Wedrén *et al.*, 2008).

Este trabalho consiste numa revisão bibliográfica sobre o papel dos polimorfismos dos receptores dos estrogénios em diversas patologias do foro ginecológico/obstétrico, com o objectivo de melhor compreender a susceptibilidade a patologias relacionadas com a exposição estrogénica, causadoras de morbilidade, mortalidade e diminuição da qualidade de vida. A clarificação da etiologia genética destas doenças ou da influência destes polimorfismos poderá permitir avanços importantes no diagnóstico, na identificação de indivíduos em risco e no desenvolvimento de terapêutica dirigida (Tempfer *et al.*, 2009).

Na tabela 1 encontram-se sumarizados os resultados dos vários artigos consultados.

**Tabela 1: Resumo dos artigos**

<b>Doença</b>	<b>Artigo</b>	<b>População</b>	<b>Varição genética [alelo variante segundo autor]</b>	<b>Associação</b>
<b>Leiomioma</b>	Kitawaki <i>et al.</i> , 2001	Japão	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> ) [alelo p]	Associação presente
	Villanova <i>et al.</i> , 2006	Brasil	<i>MspI</i> e <i>HaeIII</i> ( <i>ESR1</i> )	Sem associação significativa
	Hsieh <i>et al.</i> , 2007	Taiwan	<i>PvuII</i> [alelo C] e <i>XbaI</i> [alelo G] ( <i>ESR1</i> )	<i>XbaI</i> fortemente associado e <i>PvuII</i> moderadamente relacionado.
	Govindan <i>et al.</i> , 2009	Índia	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> )	Associação presente
	Zhai <i>et al.</i> , 2009	China	G1082A e Cx + 56 A→G ( <i>ESR2</i> )	Associação ausente
<b>Adenomiiose</b>	Kitawaki <i>et al.</i> , 2001	Japão	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> ) [alelo p]	Associação presente
<b>Endometriose</b>	Kitawaki <i>et al.</i> , 2001	Japão	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> ) [alelo p]	Associação presente
	El-Gindi <i>et al.</i> , 2002	Egipto	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> )	Associação apenas com severidade da doença
	Wang <i>et al.</i> , 2004	Japão	<i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> ( <i>ESR1</i> ) e <i>RsaI</i> e <i>AluI</i> [alelo A] ( <i>ESR2</i> )	Associação do polimorfismo <i>AluI</i> a estadio IV
	Renner <i>et al.</i> , 2006	Alemanha	<i>PvuII</i> [alelo C] e <i>XbaI</i> [alelo G] ( <i>ESR1</i> ) e G229A [alelo A] ( <i>ESR2</i> )	Associação entre <i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> conjuntamente e severidade da doença
	Luisi <i>et al.</i> , 2006	Itália	<i>PvuII</i> e <i>XbaI</i> ( <i>ESR1</i> ) e <i>AluI</i> ( <i>ESR2</i> )	Associação entre genótipos PP e Pp ( <i>PvuII</i> ) e recorrência
	Govindan <i>et al.</i> , 2009	Índia	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> ) [alelo C]	Associação presente

<b>Menarca mais precoce</b>	Stavrou <i>et al.</i> , 2002	Grécia	<i>PvuII</i> [alelo p] e <i>XbaI</i> [alelo x] ( <i>ESR1</i> )	Associação presente
	Stavrou <i>et al.</i> , 2006	Grécia	<i>PvuII</i> [alelo C] e <i>XbaI</i> [alelo C] ( <i>ESR1</i> ) e <i>AluI</i> [alelo G] e <i>RsaI</i> [alelo A] ( <i>ESR2</i> )	Associação de <i>AluI</i> e <i>RsaI</i> a menarca mais precoce, mais marcada quando associada a <i>PvuII</i> e <i>XbaI</i>
<b>Menopausa mais precoce</b>	Weel <i>et al.</i> , 1999	Holanda	<i>PvuII</i> ( <i>ESR1</i> )	Menopausa mais precoce nos genótipos sem polimorfismo
	Bretherick <i>et al.</i> , 2008	Canadá	(TA)n curtas (associadas a haplotipo 397T e 351A) e (TA)n longas (associadas a 397C e 351G)	(TA)n curtas associadas a menopausa mais precoce. (TA)n longas associadas a menopausa mais tardia
<b>Abortamento de repetição</b>	Alessio <i>et al.</i> , 2008	Brasil	397T→C e 351A→G ( <i>ESR1</i> ) e 1082G→A e 1730G→A ( <i>ESR2</i> )	Sem associação
	Cupisti <i>et al.</i> , 2009	Alemanha	Rs3020314 ( <i>ESR1</i> )	Sem associação
<b>Fertilização in vitro</b>	Georgiou <i>et al.</i> , 1997	Grécia	<i>PvuII</i> e <i>BstUI</i> ( <i>ESR1</i> )	Associação do <i>PvuII</i> a aumento da razão foliculos-ovócitos. <i>BstUI</i> não encontrado. Sem associação a número de foliculos ou ovócitos
	Sundarrajan <i>et al.</i> , 1999	China	<i>PvuII</i> [alelo P] e <i>BstUI</i> ( <i>ESR1</i> )	Associação negativa entre <i>PvuII</i> e o número de foliculos e de ovócitos maduros. <i>BstUI</i> não encontrado
<b>Padrão Reprodutivo</b>	Sundarrajan <i>et al.</i> , 2001	China	<i>RsaI</i> [alelo A] e <i>AluI</i> [alelo A] ( <i>ESR2</i> )	Associação dos polimorfismos a Disfunção Ovária.
	Corbo <i>et al.</i> , 2007	Itália e África equatorial	<i>PvuII</i> [alelo p] e <i>XbaI</i> [alelo x] ( <i>ESR1</i> )	Associação de pp e Pp a menor número de abortos e maior número de filhos, na população italiana e africana respectivamente
<b>Cancro da Mama</b>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2002	Portugal	C325G [alelo G] ( <i>ESR1</i> )	Alelo G associado a cancro da mama e presença de metástases ganglionares

	Siddig <i>et al.</i> , 2008	Sudão	C325G [alelo G] ( <i>ESR1</i> )	Associação com genótipo CC em mulheres pré-menopáusicas
	Hamagushi <i>et al.</i> , 2008	Japão	rs6905370, rs2077647, rs827421 ( <i>ESR1</i> )	Alelo G de rs6905370 associado a cancro da mama RE+ em mulheres pré-menopáusicas
	Maguire <i>et al.</i> , 2008	Suécia	G1082A, G1730A e Cx+56A→G ( <i>ESR2</i> )	Haplótipo G-A-G (alelo G de G1082A, alelo A de G1730A e alelo G de Cx+56A→G) associado a risco de cancro da mama esporádico
	Surekha <i>et al.</i> , 2009	Índia	A1730G [alelo G]( <i>ESR2</i> )	Associação
<b>Cancro do Endométrio</b>	Wedrén <i>et al.</i> , 2008	Suécia	rs2234670 [alelo G], rs2234693, rs9340799, rs4986934, rs4986934 ( <i>ESR1</i> )	Genótipo GG para rs9340799 associado a cancro do endométrio
	Ashton <i>et al.</i> , 2009	Austrália	rs2234693, rs9340799 ( <i>ESR1</i> ) e rs944050, rs4986938, rs1256049 e rs1255998 ( <i>ESR2</i> )	rs2234693, rs9340799 ( <i>ESR1</i> ) e dois dos polimorfismos do <i>ESR2</i> (rs944050 e rs1255998), foram associados a risco aumentado de cancro do endométrio
<b>Cancro do Ovário</b>	Lurie <i>et al.</i> , 2008	EUA	rs1271572, rs1256030, rs1256031, rs3020450 ( <i>ERS2</i> )	Associação de rs1271572 com cancro do ovário

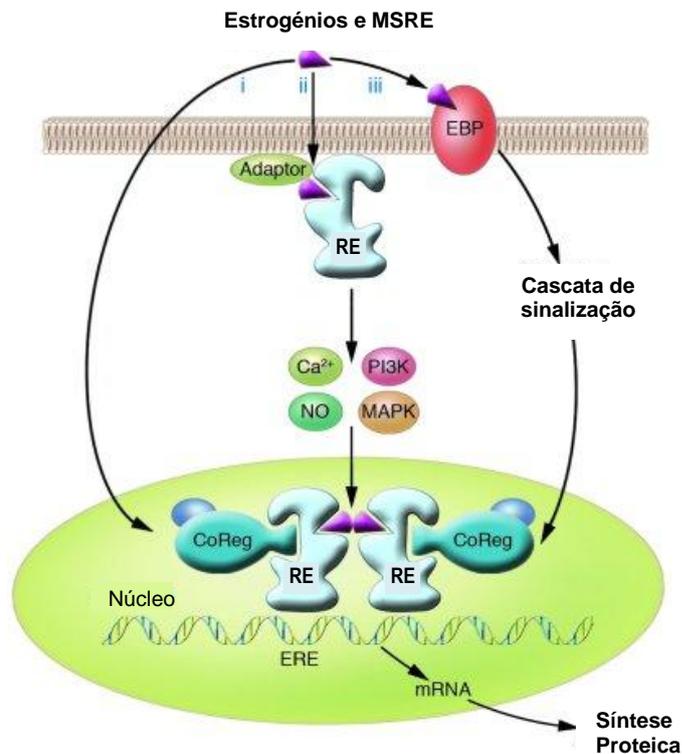
## V. ***ESTROGÉNIOS E RECEPTORES DE ESTROGÉNIOS- MECANISMOS DE ACÇÃO***

Os estrogénios influenciam muitos processos fisiológicos nos mamíferos, quer ligados aos órgãos reprodutivos e às glândulas mamárias, quer ao sistema cardiovascular, ao metabolismo ósseo e ao comportamento (Deroo e Korach, 2006). Estas hormonas são implicadas no desenvolvimento e progressão de numerosas doenças, desde vários tipos de cancro (mama, ovários, colorectal, próstata, endometrial), osteoporose, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, resistência à insulina e lúpus eritematoso sistémico, endometriose e obesidade (Deroo e Korach, 2006).

Os receptores dos estrogénios (RE) têm um papel central na acção destas hormonas nos tecidos e órgãos-alvo. São conhecidos dois subtipos de receptores dos estrogénios: RE-alfa ( $RE\alpha$ ), o mais abundante no organismo, codificado pelo gene *ESR1*, localizado no cromossoma 6q25.1; e o RE-beta ( $RE\beta$ ), codificado pelo gene *ESR2*, situado no cromossoma 14q22-24 (Siddig *et al.*, 2008; Surekha *et al.*, 2009). Foi demonstrado que os  $RE\alpha$  e  $RE\beta$  podem formar heterodímeros ou homodímeros, tornando bastante complexa a definição da sua função individual ou combinada, dentro da célula (Herynk e Fuqua, 2004). Os RE são membros da superfamília de receptores nucleares de factores de transcrição activados por ligando.

Deroo BJ e Korach KS (2006) descreveram dois mecanismos de acção dos estrogénios: um clássico ou genómico e outro não genómico (ver figura 1). No mecanismo “clássico” da acção dos estrogénios, estes difundem-se pela célula e ligam-se ao RE, que se localiza no núcleo. Este complexo estrogénio-RE liga-se directamente a sequências reguladoras chamadas “elemento de resposta ao estrogénio” (ERE) presentes nos genes-alvo, regulando a

transcrição destes genes; ou, indirectamente, através do recrutamento de proteínas co-reguladoras (como co-activadores), aumentando ou diminuindo a produção de RNA mensageiro e da proteína associada, levando à resposta fisiológica. Este mecanismo clássico ou “genómico” ocorre tipicamente no decorrer de horas. Em contraste, os estrogénios podem actuar mais rapidamente (dentro de segundos ou minutos), via mecanismos “não genómicos”, através da ligação a RE localizados na membrana plasmática ou adjacente a esta (ligação que pode requerer a presença de proteínas adaptadoras, que direccionam o RE para a membrana), ou através da ligação a outras proteínas da membrana plasmática, resultando em respostas celulares como o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  ou óxido nítrico ou a activação de cinases.



Adaptado de Deroo BJ e Korach KS (2006)

Figura 1. Modelos de acção dos estrogénios: (i) Mecanismo clássico ou genómico; (ii) Efeito do estrogénio rápido ou não genómico, com ligação ao ER na membrana plasmática ou adjacente a esta; (iii) Ligação a proteínas da membrana plasmática (EBP) (Adaptor: proteínas adaptadoras; EBP: proteínas da membrana plasmática que ligam estrogénios; ERE: “elemento de resposta ao estrogénio”; CoRegs: proteínas co-reguladoras; MSRE: Moduladores seletivos do receptor de estrogénio; RE: Receptor dos estrogénios).

Tem sido proposto pela comunidade científica, que variações genéticas nos genes envolvidos na via dos estrogénios possam causar sensibilidade variável à hormona e ser responsáveis por fenótipos dependentes dos estrogénios. Nesta perspectiva, têm sido analisadas variações genéticas nos genes dos RE e identificados vários polimorfismos, quer nos genes do RE $\alpha$  como do RE $\beta$ . De entre os polimorfismos do gene do RE, os polimorfismos do RE- $\alpha$ , nomeadamente o *PvuII* e o *XbaI*, têm sido os mais extensivamente estudados. Dos polimorfismos do gene do RE- $\beta$  conhecidos até ao momento, destacam-se duas mutações silenciosas não traduzidas, o polimorfismo *AluI* e o polimorfismo *RsaI*.

Os polimorfismos acima referidos, são polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), por resultarem da troca de apenas um nucleotídeo, que pode ser detectada ao criar ou extinguir um local de restrição de uma enzima. Assim, o polimorfismo *XbaI* representa uma troca de nucleotídeo que leva à criação de um local que é reconhecido pela enzima *XbaI* e que corta a cadeia de DNA neste local, permitindo distinguir diferentes alelos pelo seu tamanho (polimorfismos de fragmentos de restrição de DNA, RFLPs). Os RFLP's formados pela enzima de restrição, são identificados através da técnica de "Shouthern Blotting" (separação dos fragmentos por electroforese e hibridação com sondas marcadas radioactivamente) (Ver figura 2).

Em relação à definição dos polimorfismos, esta não é unânime ao longo dos diferentes artigos, com excepção do polimorfismo *RsaI* que é apresentado como sendo resultado da troca do nucleotídeo guanina por adenina na posição 1082 (1082 G $\rightarrow$ A). O polimorfismo *PvuII* é definido na grande maioria dos artigos como sendo resultado da troca do nucleotídeo timina por citosina na posição 397 (397 T $\rightarrow$ C). No entanto os autores Bretherick *et al.* (2008), definem-no como sendo o resultado da troca do nucleotídeo citosina por timina (397 C $\rightarrow$ T). Em relação ao polimorfismo *XbaI*, a grande maioria dos estudos descreve-o como uma troca do nucleotídeo adenina por guanina na posição 351

(351 A→G), mas alguns artigos consultados, nomeadamente Hsieh *et al.* (2001) e Stavrou *et al.* (2006), descrevem este SNP como sendo resultado da troca de adenina por citosina na mesma posição (351 A→C). Também o polimorfismo *AluI* é descrito na quase totalidade dos artigos consultados como sendo resultado de uma troca do nucleotídeo adenina por guanina na posição 1730, sendo considerado o alelo comum o alelo A e o alelo G o alelo variante. No entanto, no estudo desenvolvido por Wang *et al.* (2004), os autores consideram o alelo comum o alelo G por ser o mais frequente na população estudada e o alelo A como o alelo variante.

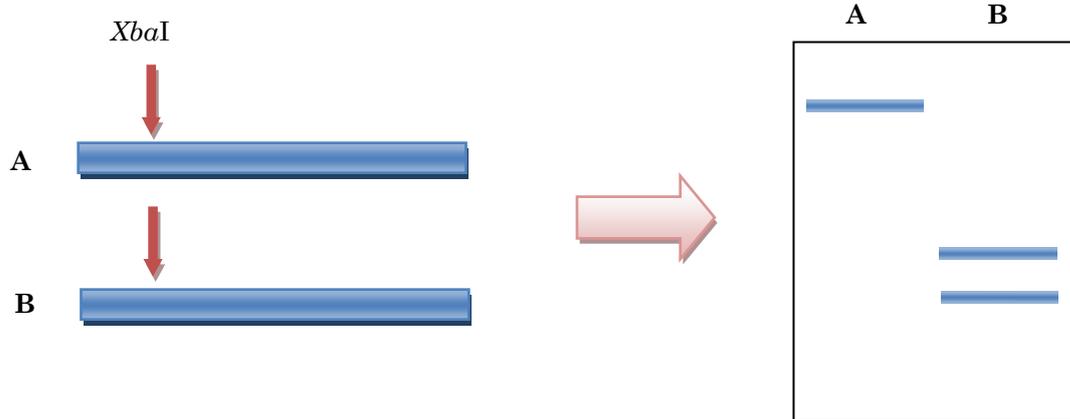


Figura 2. Identificação do polimorfismo *XbaI*. A) Ausência de sequência reconhecida pela enzima de restrição *XbaI* (Normal). B) Presença da variação genética, reconhecida pela enzima de restrição *XbaI* (Polimorfismo *XbaI*).

De modo a uniformizar a definição dos polimorfismos entre os vários artigos e deste modo facilitar a compreensão dos resultados, o alelo variante de cada polimorfismo será representado ao longo do texto com a primeira letra do nome do polimorfismo em letra maiúscula e o alelo não variante, com letra minúscula. No quadro 1 foram incluídas as nomenclaturas definidas por cada autor, quando considerado relevante.

Apesar dos polimorfismos referidos anteriormente não levarem a alteração de aminoácido na proteína do RE, é possível que estes polimorfismos estejam em desequilíbrio de ligação com outras variações de sequências reguladoras, que possam afectar a expressão e a função do gene (Stavrou *et al.*, 2006). Por outro lado, acredita-se que os polimorfismos de um único nucleotídeo, mesmo quando situados em regiões não traduzidas, possam causar alteração do RNA mensageiro e assim influenciar a expressão do gene (Stavrou *et al.*, 2006).

Neste contexto, nos últimos anos, os polimorfismos dos RE têm sido objecto de interesse crescente e vários estudos têm avaliado uma possível ligação entre estes polimorfismos e múltiplas doenças do foro ginecológico/obstétrico.

## **VI. INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA NOS RECEPTORES DOS ESTROGÉNIOS NA FISIOLOGIA E PATOLOGIA GINECOLÓGICA**

### **A. Leiomioma**

O leiomioma uterino é um dos mais frequentes tumores sólidos pélvicos encontrados em mulheres. Estima-se que uma em cada quatro mulheres desenvolverá, durante a sua vida, este tipo de tumor benigno (Villanova *et al.*, 2006). O leiomioma é uma das principais causas de histerectomia, constituindo portanto um importante problema de saúde pública. Apesar da sua elevada prevalência, a sua etiopatogenia permanece por esclarecer. Os estrogénios têm sido considerados um dos mais importantes factores de risco para o desenvolvimento de leiomiomas. A dependência dos estrogénios é claramente reconhecida pelo facto dos leiomiomas uterinos não ocorrerem antes da menarca e de frequentemente sofrerem aumento de tamanho durante a gravidez e uma involução após a menopausa, ovariectomia, ou terapêutica com agonistas de hormona libertadora de gonadotrofinas (Villanova *et al.*, 2006).

O efeito dos estrogénios no crescimento e desenvolvimento dos leiomiomas é mediado pelos RE $\alpha$  e RE $\beta$ . Foram reportados níveis elevados de RNA mensageiro do ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos tecidos do leiomioma, em comparação com o miométrio normal, pelo que níveis aumentados de RNA mensageiro de ER $\alpha$  e ER $\beta$  podem representar um factor predisponente importante para o desenvolvimento e crescimento dos leiomiomas (Villanova *et al.*, 2006).

Factores genéticos podem também contribuir para o aparecimento e crescimento dos leiomiomas. Foi sugerido que SNP nos genes dos receptores dos estrogénios poderão estar associados ao desenvolvimento de leiomiomas. Os SNPs mais frequentemente mencionados em estudos com doentes com leiomiomas são as variantes do gene *ESR1*, o *PvuII* e *XbaI*, ambos localizados no intrão 1.

Hsieh *et al.* em 2007, propuseram-se avaliar a distribuição dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* num grupo de mulheres pré-menopáusicas de Taiwan portadoras de endometriose e/ou leiomiomas uterinos. Observaram que a distribuição genotípica e a frequência de alelos dos polimorfismos do RE $\alpha$  *PvuII* e *XbaI* eram significativamente diferentes entre os grupos com ou sem leiomioma. A distribuição dos genótipos e as frequências dos alelos encontram-se descritas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2. Distribuição Genotípica do polimorfismo *XbaI***

	Endometriose (n=112 <sup>a,c</sup> )	Leiomioma (n=106 <sup>a,b</sup> )	Controlos normais (n=110 <sup>b,c</sup> )
Genótipo			
xx	30 (26.8%)	21 (19.8%)	37 (33.6%)
Xx	64 (57.1%)	56 (52.8%)	71 (64.6%)
XX	18 (16.1%)	29 (27.4%)	2 (1.8%)
	Endometriose (n=224 <sup>a,c</sup> )	Leiomioma (n=212 <sup>a,b</sup> )	Controlos normais (n=220 <sup>b,c</sup> )
Alelo			
x	124 (55.4%)	98 (46.2%)	145 (65.9%)
X	100 (44.6%)	114 (53.8%)	75 (34.1%)

Hsieh *et al.*, 2007

<sup>a</sup> Não estatisticamente diferente (endometriose versus leiomioma).

<sup>b</sup>  $P < 0.00005$  (leiomioma versus controlos).

<sup>c</sup>  $P < 0.005$  (endometriose versus controlos).

(X, alelo variante; x, alelo não variante)

**Tabela 3. Distribuição Genotípica do polimorfismo *PvuII***

	Endometriose (n=112 <sup>a,d</sup> )	Leiomioma (n=106 <sup>a,b</sup> )	Controlos normais (n=110 <sup>b,d</sup> )
Genótipo			
pp	27 (24.1%)	25 (23.6%)	60 (54.5%)
Pp	68 (60.7%)	75 (70.8%)	44 (40.0%)
PP	17 (15.2%)	6 (5.6%)	6 (5.5%)
	Endometriose (n=224 <sup>a,d</sup> )	Leiomioma (n=106 <sup>a,c</sup> )	Controlos normais (n=110 <sup>c,d</sup> )
Alelo			
p	122 (54.5%)	125 (59.0%)	164 (74.5%)
P	102 (45.5%)	87 (41.0%)	56 (25.5%)

Hsieh *et al.*, 2007

<sup>a</sup> Não estatisticamente diferente (endometriose versus leiomioma).

<sup>b</sup>  $P < 0.00005$  (distribuição genotípica de leiomioma versus controlos).

<sup>c</sup>  $P < 0.005$  (distribuição alélica de leiomioma versus controlos).

<sup>d</sup>  $P < 0.00005$  (endometriose versus controlos)

Estes autores concluíram que estes SNPs do RE $\alpha$  estão correlacionados com aumento da susceptibilidade para leiomioma, podendo predispor ao seu desenvolvimento. A variante genética RE $\alpha$  *Xba*I 351\*X foi fortemente relacionada com a ocorrência de leiomioma ( $P < 0.00005$ ), e moderadamente associada a endometriose ( $P < 0.005$ ); e a variante genética *Pvu*II foi relacionada fortemente com a susceptibilidade para endometriose ( $P < 0.00005$ ) e moderadamente relacionada com o risco de leiomioma ( $P < 0.005$ ) (Hsieh *et al.*, 2007).

A associação entre leiomioma e o polimorfismo *Pvu*II foi também encontrada numa população japonesa (Kitawaki *et al.*, 2001) e mais recentemente, numa população indiana (Govindan *et al.*, 2009).

Por seu lado, os autores Villanova *et al.* (2006) propuseram-se avaliar variantes alélicas menos comuns do *ESR1* (*Msp*I, no exão 1 e *Hae*III, no intrão 1 do gene do RE $\alpha$ ) e o seu potencial de associação com leiomiomas uterinos, numa população do sudeste do Brasil. Os autores consideraram que, por se tratar de uma população altamente heterogénea, poder-se-ia minimizar o efeito do componente genético nas frequências dos polimorfismos. Neste estudo foram seleccionadas 125 mulheres com confirmação cirúrgica e histológica de leiomioma (idade média de  $43.9 \pm 7.3$  anos) e comparadas as frequências de alelos e genótipos com 125 mulheres saudáveis (idade média de  $56.9 \pm 7.4$  anos). Este estudo não encontrou uma diferença significativa na frequência dos polimorfismos *Msp*I e *Hae*III no gene do *ESR1* entre o grupo com leiomioma e o grupo controlo (valor  $P$  não significativo), não existindo suporte estatístico que apoie a hipótese de que estes SNPs estejam associados a aumento do risco de desenvolvimento de leiomioma.

Um estudo levado a cabo por Zhai *et al.* (2009), procurou pela primeira vez uma associação entre leiomiomas e polimorfismos do *ESR2* (G1082A e Cx + 56 A $\rightarrow$ G), num

grupo de mulheres chinesas. Os resultados sugerem não existir uma associação entre estes polimorfismos e a ocorrência de leiomioma.

## ***B. Endometriose***

A endometriose é uma doença dolorosa inflamatória crónica que representa uma das mais frequentes doenças ginecológicas benignas, em mulheres pré-menopáusicas (Renner *et al.*, 2006). Apesar da sintomatologia variar, frequentemente inclui dor pélvica severa, dismenorreia severa e diminuição da fertilidade (Montgomery *et al.*, 2008). As estimativas da sua frequência variam entre 8-10% em mulheres em idade reprodutiva e 20-50% em mulheres com problemas de infertilidade, com uma prevalência estimada de endometriose moderada a severa de até 2%. Como o diagnóstico de certeza de endometriose é realizado por visualização da pélvis por laparoscopia ou laparotomia, a sua real prevalência é desconhecida (Montgomery *et al.*, 2008).

A endometriose é definida como a presença de tecido endométrio-*like* estrogénio-dependente, constituído por glândulas e estroma, fora da cavidade uterina. Os tecidos e órgãos-alvo incluem as trompas de Falópio, ovários, peritoneu, cólon, septo recto-vaginal, bexiga, útero, e mais raramente rins, pulmão, fígado, pâncreas, músculo e sistema nervoso central (Renner *et al.*, 2006).

Uma das classificações fenotípicas possíveis de endometriose é a da American Fertility Society (AFS, Associação Americana de Fertilidade), baseada no tamanho de superfície total das lesões, presença de aderências e lesões ováricas, em que o estadio I corresponde ao menor grau de lesão e o estadio IV ao grau mais severo de lesões (Montgomery *et al.*, 2008). Esta é a classificação adoptada ao longo do texto.

A endometriose é uma doença poligénica/multifactorial, que está relacionada com complexas interações entre hormonas, activação de citocinas, processos imunoinflamatórios,

factores genéticos e ambientais (Montgomery *et al.*, 2008). Três teorias têm sido propostas para a génese de endometriose, incluindo (i) menstruação retrógrada pelas trompas de Falópio até à cavidade peritoneal, (ii) metástases linfáticas e vasculares e (iii) metaplasia *in situ* tecidual (Hsieh *et al.*, 2007).

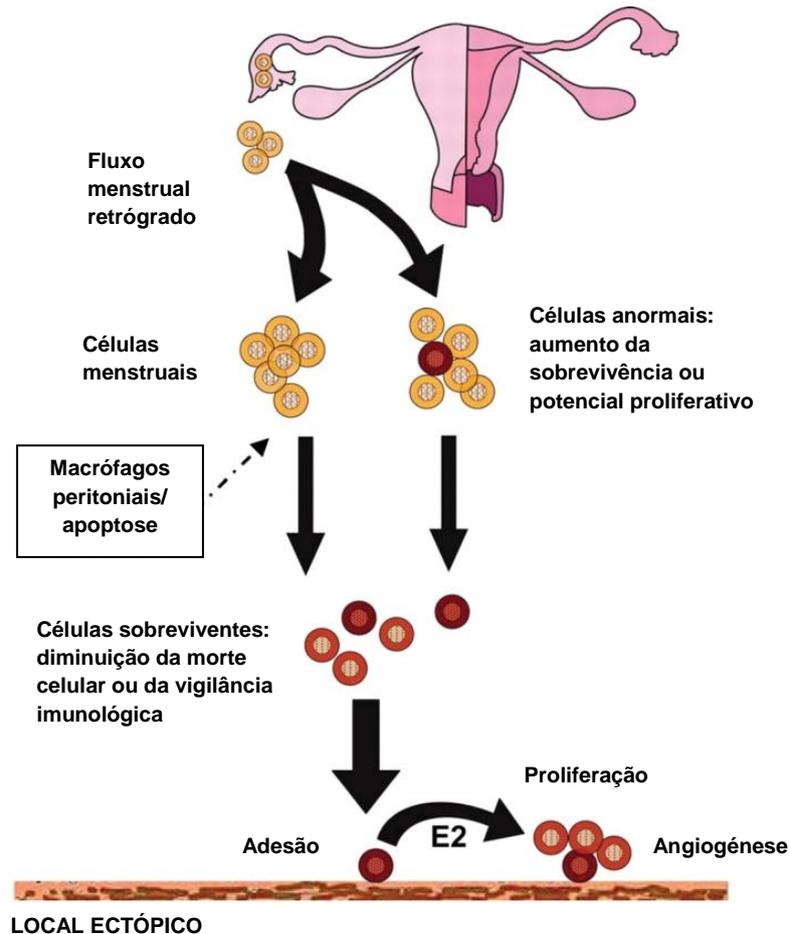


Figura 3. Representação esquemática de possíveis mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de endometriose: Fluxo menstrual retrógrado, endométrio eutópico anormal, ambiente peritoneal alterado, vigilância imunológica diminuída e aumento da capacidade angiogénica.

Figura adaptada de Montgomery *et al.*, 2008

Apesar de mais de 90% das mulheres em idade reprodutiva apresentarem pelo menos algum grau de menstruação retrógrada, permanece por esclarecer o porquê de apenas algumas

desenvolverem endometriose. Assim, factores ainda não identificados devem estar na base da susceptibilidade de algumas mulheres à aderência, invasão, crescimento e persistência das lesões. Alguns destes factores podem envolver uma resposta imunológica aberrante, predisposição genética ou alterações da cavidade peritoneal alterada ou do endométrio eutópico (Renner *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008). Possíveis explicações para a susceptibilidade de apenas algumas mulheres para endometriose estão sumarizadas na figura 3.

Uma forte incidência de endometriose em familiares de primeiro grau de pacientes com endometriose, apoia um papel genético na sua etiologia (Hsieh *et al.*, 2007). Esta desenvolve-se mais em mulheres em idade reprodutiva e regride com a menopausa ou ovariectomia, o que sugere uma actividade dependente dos estrogénios (Hsieh *et al.*, 2007). Os RE são expressos nas lesões endometriais ectópicas persistentemente, independentemente da fase menstrual.

Os factores que contribuem para a subfertilidade associada a endometriose incluem diminuição do crescimento folicular e diminuição da taxa de fecundação ovocitária e de implantação (Renner *et al.*, 2006). As mulheres com endometriose possuem ainda, segundo alguns autores, um risco aumentado de cancro do ovário e possivelmente de cancro da mama (Rennet *et al.*, 2006). Assim, a qualidade de vida das doentes com endometriose encontra-se claramente diminuída, pela dor crónica, cirurgia e terapias continuadas.

Até ao momento, a investigação molecular nesta área tem-se focado nos genes envolvidos na inflamação, metabolismo e receptores dos estrogénios, função vascular e remodelação tecidual e o seu papel na endometriose (Tempfer *et al.*, 2009). Mais especificamente, a influência dos polimorfismos nos genes dos RE tem sido investigada em grupos de mulheres europeias e asiáticas. Vários trabalhos com o objectivo de procurar uma

associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* e endometriose têm sido apresentados, com resultados contraditórios.

A adenomiose é uma patologia uterina caracterizada pela presença de glândulas e estroma endometrial no interior do miométrio. Apesar de ser uma entidade distinta do leiomioma e uma forma particular de endometriose, tem em comum o facto de se desenvolver primariamente em mulheres em idade reprodutiva e de o seu crescimento ser igualmente estrogénio-dependente (o tecido adenomiótico também expressa RE) (Kitawaki *et al.*, 2001).

No estudo desenvolvido por Renner *et al.* (2006) foram avaliadas várias características clínicas e de estilo de vida (hábitos tabágicos, alergias, outras doenças, local de residência e características do ciclo menstrual) de 98 mulheres com endometriose e 98 mulheres controlo alemãs, e estudadas as incidências dos seguintes polimorfismos genéticos do RE $\alpha$ : (1) *PvuII* e *XbaI* no intrão 1 do RE $\alpha$  e (2) cSNP (SNP numa região codificadora de proteína) G229A no exão 1 do RE $\alpha$  com a mutação *missense* (troca de aminoácido) de Gly77Ser.

Neste estudo, a classificação de gravidade de endometriose segundo a AFS resultou em 14 doentes com AFS I (menos grave), 12 com AFS II, 34 com AFS III e 38 com AFS IV (mais grave). Não foi encontrada diferença significativa entre hábitos tabágicos, local de residência (rural, cidade), idade média, idade de menarca, índice de massa corporal e uso de contraceptivos orais, entre os dois grupos. No que respeita à fertilidade, o grupo controlo teve 1.5 e 1.7 vezes mais gravidezes e nascimentos de nados vivos, respectivamente, que as doentes com endometriose. Neste estudo o grupo controlo demonstrou ter mais leiomiomas que o grupo de endometriose ( $P=0.04$ ), no entanto, o grupo da endometriose apresentou mais dismenorreia ( $P<0.001$ ) e mais alergias a medicamentos que os controlos ( $P=0.005$ ). Em 10 doentes com endometriose existia história positiva para endometriose num parente de primeiro grau, sugerindo uma tendência para predisposição genética (Renner *et al.*, 2006).

Neste estudo não se verificou uma associação entre a susceptibilidade para endometriose e os polimorfismos do gene do RE $\alpha$  *PvuII* e/ou *XbaI*. No entanto, foi verificada uma tendência para doença severa (estadio IV da classificação de endometriose pela AFS) quando ambos os polimorfismos *XbaI* e *PvuII* foram avaliados conjuntamente. O SNP exónico G229A, não foi detectado neste estudo de endometriose, pelo que Renner *et al.* (2006) concluem que este deve ser raro na população europeia e irrelevante para a etiologia de endometriose.

Um outro estudo desenvolvido por El-Gindi *et al.* (2002) encontrou igualmente uma correlação positiva entre a presença do polimorfismo *PvuII* no gene do *ESR1* e a severidade da doença, mas não com a sua susceptibilidade.

Num estudo desenvolvido numa população japonesa por Kitawaki *et al.* (2001) foi analisada a associação entre o polimorfismo *PvuII* e a ocorrência de endometriose, leiomioma e adenomiose. Para esse efeito foram seleccionadas 203 mulheres que foram classificadas em 3 grupos: (i) endometriose (n=109); (ii) adenomiose/ leiomioma (n= 67); (iii) sem doença (n= 27). O grupo da endometriose foi ainda caracterizado segundo as seguintes variáveis: pura (sem outras doenças ginecológicas) ou complicada (doentes com endometriose associada a adenomiose e/ou leiomioma), com ou sem quistos de chocolate, leve ou severa. Os estadios da endometriose foram baseados na classificação da AFS. O grupo da adenomiose/leiomioma consistia em doentes apenas com adenomiose/leiomioma, sem endometriose. O grupo de doentes livre de doença consistia em doentes com cancro cervical *in situ*, sem outra doença ginecológica, ou doentes com oclusão tubar ou aderências, mas sem endometriose, adenomiose ou leiomiomas. Como o grupo livre de doença era pequeno, foram consideradas outras 179 mulheres que fizeram exame ginecológico anual, para ser o grupo referência. Os resultados encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4. Distribuição Genotípica do polimorfismo *PvuII***

	Endometriose (n=109)	Adeniose e/ou Leiomioma (n=67)	Grupo sem doença (GSD) (n=27)	Grupo Referência (GR) (n=179)
<b>Genótipo</b>				
pp	14 (13%)	10 (15%)	12 (44%)	43 (24%)
Pp	59 (54%)	35 (52%)	12 (44%)	71 (40%)
PP	36 (33%)	22 (33%)	22 (33%)	65 (36%)
<i>P</i> vs GR <sup>a</sup>	0.0222*	0.15	0.016*	-
<i>P</i> vs GSD <sup>b</sup>	0.0005*	0.005*	-	0.016*
<b>Alelo</b>				
P	87	55	36	157
p	131	79	18	201
<i>P</i> vs GSD <sup>b</sup>	0.0004*	0.001*	-	0.002*

Kitawaki *et al.*, 2001<sup>a</sup> Valor de *P* versus grupo referência (GR).<sup>b</sup> Valor de *P* versus grupo sem doença (GSD).\* Valor *P* significante (<0.05)

(P, alelo variante; p, alelo não variante)

O estudo de Kitawaki *et al.*, (2001) demonstrou que a frequência do genótipo pp (sem o polimorfismo *PvuII*) era baixa entre os doentes com endometriose (13%) e com adeniose e/ou leiomioma (15%), mas elevada nos doentes livres de doença (44%), sugerindo que o alelo p seria protector contra endometriose, adeniose e leiomioma. No grupo de doentes com endometriose, a distribuição dos genótipos do RE $\alpha$  foi semelhante, independentemente da presença de endometriose pura ou complicada, da existência de quistos de chocolate ou de o estadio ser leve ou severo. A distribuição dos genótipos do RE $\alpha$  foi também semelhante entre os grupos de endometriose e adeniose/leiomioma. Assim, os autores concluem que estes resultados sugerem que os polimorfismos do gene do RE $\alpha$  estão associados, pelo menos em parte, com o início ou desenvolvimento de endometriose, mas não com a sua severidade.

Pelo contrário, Wang *et al.* (2004) não conseguiram demonstrar uma associação entre a presença de polimorfismos dos genes do RE $\alpha$  (*PvuII* e *XbaI*) e do RE $\beta$  (*RsaI* e *AluI*) e o

aumento de frequência de endometriose, numa população japonesa, tendo sido apenas encontrada uma relação entre o polimorfismo *AluI* do gene do RE $\beta$  e o aumento do risco de endometriose de grau IV. Neste estudo, Wang *et al.* (2004) seleccionaram um grupo de 132 mulheres com diagnóstico cirúrgico e histológico de endometriose, com a seguinte distribuição segundo a classificação da AFS: Estadio I, 3 doentes (2.3%); Estadio II, 12 mulheres (9.1%); Estadio III, 27 mulheres (20.4%) e Estadio IV 90 doentes (68.2%). Como grupo controlo foram seleccionadas 182 meninas recém-nascidas, a quem foi feita colheita de sangue do cordão, tendo sido excluídas as recém-nascidas de mães de outra naturalidade que não a japonesa e as recém-nascidas de mulheres com complicações obstétricas ou outras patologias (pré-eclâmpsia, hipertensão arterial ou diabetes).

Neste estudo os autores não encontraram diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos *AluI* e *RsaI* do gene do RE $\beta$ , e dos polimorfismos *XbaI* e *PvuII* do gene do RE $\alpha$  entre o grupo portador de endometriose e o grupo controlo. Apenas quando comparadas as frequências dos alelos dos polimorfismos utilizando apenas doentes portadoras de endometriose de estadio IV, se verificou uma diminuição significativa da frequência do alelo A do polimorfismo *AluI* entre as doentes (7.5%), comparado com o grupo controlo (14.2%) ( $P=0.03$ ). Neste estudo os autores consideraram o alelo A (variante) do polimorfismo *AluI* (1730 G $\rightarrow$ A) o alelo G, uma vez ter sido o mais frequentemente encontrado na população estudada.

Os autores Wang *et al.* (2004) justificam a diferença de resultados relativamente ao estudo de Kitawaki *et al.* (2001), igualmente com a população japonesa como cenário, referindo o facto de terem sido utilizados grupos controlo distintos e diferentes tamanhos de amostra. Kitawaki *et al.* (2001) compararam os genótipos no grupo de mulheres com endometriose (109 doentes) apenas com 27 mulheres sem doença e 179 mulheres retiradas da população geral. Wang *et al.* (2004) consideraram o grupo livre de doença no estudo de

Kitawaki *et al.* (2001) claramente pequeno, podendo este facto ter provocado desvios nos resultados e falsas associações. Por outro lado, Wang *et al.* (2004) consideraram que as frequências dos genótipos PP, Pp e pp de *PvuII* (36%, 40% e 24%, respectivamente) no grupo controlo de referência de Kitawaki *et al.* (2001), não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo que este grupo é demasiado heterogénio para servir de controlo.

Quanto à população referência, como é necessária uma cirurgia para o diagnóstico definitivo de endometriose, as mulheres pertencentes ao grupo controlo na maioria dos estudos são mulheres que foram submetidas a cirurgia para laqueação tubar ou por outra condição não relacionada com a patologia a estudar. Assim, os grupos controlo não representam necessariamente o património genético da população em geral. Ao utilizarem recém-nascidas da mesma população como grupo controlo, Wang *et al.* (2004) renunciaram à necessidade de obter um grupo controlo sem doença e preferiram utilizar um grupo controlo representativo da população em geral. Wang *et al.* (2004) consideraram ainda que há vantagens em limitar a definição de doença, em estudos clínicos, a casos mais severos, devido à elevada frequência de endometriose mínima ou leve encontrada em mulheres assintomáticas. Teorias correntes sugerem mesmo que estádios leves de endometriose constituem um processo fisiológico normal. Por esta razão, Wang *et al.* (2004) consideraram o estadio IV como um grupo mais representativo da doença excluindo erros de diagnóstico. Apesar desta definição mais restrita, os autores não encontraram uma relação entre os polimorfismos estudados e um aumento de susceptibilidade para endometriose.

As discrepâncias entre estes estudos poderão também ser devidas a diferenças populacionais, uma vez que a susceptibilidade a uma doença multifactorial é dependente da prevalência dos polimorfismos na população.

Luisi *et al.* (2006) elaboraram um estudo onde pesquisaram não só a presença de polimorfismos do gene do RE $\alpha$  (*PvuII* e *XbaI*), mas também do gene do RE $\beta$  (*AluI*), em 61 mulheres italianas com diagnóstico laparoscópico e histológico de endometriose, com o intuito de avaliar uma possível correlação entre os polimorfismos dos RE e indicadores clínicos e prognósticos de endometriose recorrente. Todas as mulheres se encontravam em idade reprodutiva (idades entre os 19 e os 49) e os seguintes parâmetros foram avaliados: sintomas (dispareunia, dismenorreia e dor pélvica), níveis séricos de CA-125, paridade, uso de terapêutica hormonal e recorrência de endometriose diagnosticada por segunda laparoscopia. Das 61 mulheres estudadas, 22 (36%) haviam tido uma ou duas gravidezes e 39 (64%) eram nulíparas. Os níveis de CA-125 eram superiores ao normal em 34 mulheres (55.7%). No entanto, não foi encontrada correlação entre a presença de sintomas de endometriose, os níveis séricos de CA-125, a paridade e a utilização ou não de terapia hormonal, e os polimorfismos dos RE. Verificou-se a recorrência de endometriose em 13 das 61 mulheres.

Quando avaliados os genótipos do grupo das mulheres com recorrência e sem recorrência, Luisi *et al.* (2006) encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *PvuII* do gene do RE $\alpha$  e a recorrência de endometriose em homozigotos para este polimorfismo (PP) ( $P=0.01$ ) e heterozigotos (Pp) ( $P=0.02$ ), não tendo sido, no entanto, encontrada qualquer associação com os polimorfismos *XbaI* e *AluI* (tabela 5).

**Tabela 5. Distribuição Genotípica do polimorfismo *PvuII***

Genótipos	Recorrência de Endometriose (n=13)	Controlos (n=48)	<i>P</i>
PP	7 (54%)	6 (13%)	0.01
Pp	6 (46%)	27 (56%)	0.02
pp	0	15 (31%)	NS

Luisi *et al.*, 2006

NS: Não significante ( $P>0.05$ )

Em 2007, Hsieh *et al* estabelecem uma associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* do gene *ESR1*, num grupo de mulheres tailandesas, e o aumento da susceptibilidade para endometriose e leiomioma, tal como descrito no capítulo anterior (tabela 3).

Um estudo recente desenvolvido por Govindan *et al.* (2009) analisou mais uma vez as frequências genóticas do polimorfismo *PvuII* e a sua associação a endometriose e leiomioma em 367 mulheres (110 casos de endometriose, 142 casos de leiomioma e 115 mulheres saudáveis). Os resultados indicam igualmente a associação do alelo P (variação alélica) com endometriose.

As discrepâncias encontradas em diferentes estudos podem ser devidas a variações étnicas entre as diferentes populações. São necessários ainda grandes estudos populacionais para reforçar ou excluir a hipótese de uma real associação entre as variações genóticas do RE e endometriose, do ponto de vista clínico e prognóstico (Luisi *et al.*, 2006).

### ***C. Idade da Menarca***

A primeira menstruação (menarca) depende da maturação e coordenação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário com o sistema reprodutor feminino e outros órgãos endócrinos, incluindo o tecido adiposo (Stavrou *et al.*, 2006). O momento da menarca é regulado por uma variedade de factores ambientais e genéticos. Estudos com famílias demonstraram uma correlação significativa entre idade da menarca de mães e filhas; e estudos com gémeas identificaram diferenças significativas na idade da menarca entre pares de gémeas monozigóticas e dizigóticas, pelo que se supõe agora que a contribuição genética possa ser mais importante na determinação da idade da menarca, que os factores ambientais. No entanto, os genes específicos envolvidos neste evento ainda não foram definidos (Stavrou *et al.*, 2006).

Os estrogénios têm um papel importante na diferenciação, maturação e função do sistema reprodutivo, através de efeitos endócrinos e parácrinos mediados pela activação dos RE (Stavrou *et al.*, 2002). A exposição estrogénica dos tecidos, mediada pelo RE, pode ser um importante factor determinante da menarca (Stavrou *et al.*, 2006).

Os estrogénios actuam através dos RE- $\alpha$  no eixo hipotálamo-hipófise-ovário para estimular a libertação de gonadotrofinas que regulam a foliculogénese e actuam através do RE- $\beta$  no ovário para estimular o desenvolvimento folicular (Bretherick *et al.*, 2008).

A associação de variações polimórficas dos genes dos RE a padrões reprodutivos e a entidades clínicas como cancro da mama, cancro do endométrio, risco cardiovascular e osteopose, sugere que estas variações podem estar relacionadas com a exposição total tecidual aos estrogénios. Estas variações alélicas podem contribuir também para a variabilidade

genética da idade da menarca, e por seu lado, a idade de menarca pode influenciar a duração total de exposição estrogénica dos tecidos, sendo que uma menarca tardia é um forte factor protector contra doenças dependentes de exposição estrogénica (Stavrou *et al.*, 2002).

Para atestar a relação entre a idade da menarca e a presença dos polimorfismos do gene do RE $\alpha$  *PvuII* e *XbaI*, Stavrou *et al.* (2002) realizaram um estudo para o qual foram seleccionadas 145 adolescentes saudáveis de uma região no noroeste da Grécia. Esta população alvo foi seleccionada por ser uma população fechada e rural há várias gerações, sendo portanto homogénea. Os autores pretendiam minimizar a influência da heterogeneidade cultural e social, uma vez que factores ambientais podem causar alguma variabilidade na idade da menarca. Neste estudo observou-se que a menarca ocorreu 6 meses mais tarde em raparigas homozigotas para o alelo não variante x do polimorfismo *XbaI*, relativamente a raparigas heterozigotas ou homozigotas para o alelo X. A diferença foi significativa quando comparado o genótipo xx aos genótipos Xx e XX ( $P=0.017$ ). Foi também demonstrada uma tendência para a menarca ocorrer mais tardiamente em raparigas com o genótipo pp do polimorfismo *PvuII*, apesar de não estatisticamente significativa.

Os mesmos autores realizaram em 2006 um estudo em que avaliaram a associação entre a idade da menarca e as frequências genotípicas de dois polimorfismos do gene do RE $\beta$  na mesma população do noroeste da Grécia (Stavrou *et al.*, 2006). Foi estudada a frequência dos polimorfismos do RE $\beta$  *AluI* e *RsaI* e foi examinada a associação entre os genótipos de RE $\beta$  isoladamente ou combinados com os genótipos de RE $\alpha$ , e a idade da menarca.

Neste estudo, a variante polimórfica *RsaI* não foi encontrada em nenhuma das raparigas examinadas, indicando que este polimorfismo pode ser raro nas populações da Grécia ou do sul da Europa. Em relação ao polimorfismo *AluI*, as raparigas portadoras do genótipo aa (homozigotas para o alelo a, não variante) apresentaram um atraso na menarca de 7 meses,

comparando com heterozigotas para este polimorfismo (alelo A), sugerindo que, para além da influência dos genótipos do RE $\alpha$  confirmada no estudo anterior, os genótipos de RE $\beta$  podem também contribuir para a variabilidade genética da idade da menarca. A ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos de RE $\alpha$  e RE $\beta$  também sugere que esta é uma comunidade fechada com um considerável afastamento genético devido à endogamia característica das pequenas comunidades (Stavrou *et al.*, 2006).

Foi igualmente testado no estudo de Stavrou *et al.* (2006) se a combinação dos genótipos de ambos os polimorfismos do RE $\alpha$  e RE $\beta$ , também influenciaria a idade da menarca. Esta hipótese foi baseada no conhecimento de que os RE $\alpha$  e RE $\beta$ , para além de formarem homodímeros, formam ainda heterodímeros funcionais, que podem interagir nos seus efeitos biológicos (Stavrou *et al.*, 2006). De facto, neste estudo, foi observado um efeito aditivo entre os polimorfismos dos RE $\alpha$  e RE $\beta$ . Em particular, o genótipo xx/pp do RE $\alpha$  (XbaI/PvuII) combinado com o genótipo aa do RE $\beta$  está associado a atraso de 11 meses na idade da menarca comparado com a combinação XX/PP,Aa. Além disso, parece haver uma tendência para uma menarca mais precoce em raparigas com um ou mais dos alelos polimórficos X/P,A no respectivo gene de tal forma que, quanto maior o número de alelos variantes, mais precocemente ocorre a menarca. Isto sugere que os genes dos RE $\alpha$  e RE $\beta$  interagem nos seus efeitos na idade da menarca e que este efeito pode ser modificado pela presença de certas combinações de genótipos de ambos os subtipos de ER (Stavrou *et al.*, 2006).

Em conclusão, ambos os estudos sugerem que a presença de polimorfismos no gene do RE $\alpha$ , isoladamente ou associada à presença de polimorfismos no gene do RE $\beta$ , contribuem para a variabilidade genética da idade de menarca, havendo uma tendência para a tornar mais precoce.

### ***D. Idade de Menopausa***

A idade de início da menopausa é um traço quantitativo que, na mulher europeia, tem como idade média os 51 anos, com um intervalo de normalidade entre os 40 e os 60 anos. A menopausa antes dos 40 anos afecta 1% das mulheres e é geralmente diagnosticada como Falência Ovária Prematura (FOP) (apesar de algumas mulheres apresentarem ainda função ovária intermitente após o diagnóstico). Uma base genética para a FOP é sugerida por: 1) vários familiares afectados em mais de uma geração; 2) a associação de FOP com anomalias do cromossoma X; 3) numerosos estudos populacionais e casos clínicos reportados, nos quais a FOP é associada ao cromossoma X e a genes autossómicos (Bretherick *et al.*, 2008). O único gene que tem sido consistentemente associado a FOP é o gene do Síndrome do X Frágil (FMR1), localizado no cromossoma Xq28.3. No entanto, apenas cerca de 14% das mulheres com FOP familiar são portadoras da premutação FMR1, sugerindo que outros genes possam estar associados a FOP (Bretherick *et al.*, 2008).

A exposição prematura a baixos níveis de estrogénios, tal como ocorre nas situações de menopausa precoce, tem grandes implicações na saúde das mulheres pós-menopáusicas. Uma menopausa precoce está associada a morbilidade mortalidade por doenças cardiovasculares, osteoporose e cancro do ovário. Assim, do ponto de vista clínico, é importante identificar factores que influenciem a idade da menopausa. Apesar de vários factores ambientais terem sido propostos como factores de risco para menopausa precoce, os factores genéticos parecem ser determinantes na idade da menopausa (Weel *et al.*, 1999).

A menopausa ocorre como resultado de depleção folicular. A idade na qual esta ocorre deve depender tanto do número de folículos existentes no ovário ao nascimento, como da taxa de depleção folicular ao longo do tempo. Variações genéticas comuns nos receptores de

hormonas e nos genes de proteínas que se ligam aos receptores, podem influenciar a dimensão da reserva folicular inicial e a taxa de recrutamento e, portanto, a probabilidade de menopausa precoce. Pensa-se que os polimorfismos dos genes do RE estarão associados a marcadores fenotípicos de envelhecimento ovárico, sugerindo um possível papel destes genes no *timing* de transição para a menopausa (Sowers *et al.*, 2006).

Bretherick *et al.* (2008) apresentou um estudo onde foram avaliadas as frequências de alelos com polimorfismos de repetição e/ou SNPs nos genes *ESR1* (repetições (TA)<sub>n</sub>), *ESR2* (repetições (CA)<sub>n</sub>) e nos genes dos receptores dos androgénios (RA) (repetições (CAG)<sub>n</sub>), dos receptores de FSH (FSHR) (3 SNPs: rs1394205, rs6165, rs6166) e da globulina de transporte das hormonas sexuais (SHBG, sex hormone-binding globulin) (repetição pentanucleotídica (TAAAA)<sub>6</sub>) numa população canadiana de mulheres com diagnóstico de FOP e um grupo de mulheres controlo. O diagnóstico de FOP nas 55 doentes seleccionadas, foi baseado na ausência de menstruação há pelo menos 3 meses e em dois valores séricos de FSH superiores a 40 mIU/mL separados por pelo menos um mês, antes dos 40 anos. Todas as mulheres com diagnóstico de FOP incluídas no estudo tinham cariótipo normal e não existia uma causa ambiental conhecida para a falência ovárica (por exemplo radiação, quimioterapia). Neste estudo foram utilizados dois grupos controlo. O grupo controlo 1 foi usado para determinar frequências alélicas na população geral. O grupo controlo 2 foi usado para determinar frequências alélicas num grupo de mulheres com gravidezes normais concebidas naturalmente após os 37 anos .

Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos alelos do *ESR2* ou dos genes do RA, FSHR e SHBG, entre doentes com FOP e os grupos controlo. Assim, variações nos genes do RA, *ESR2*, FSHR e SHBG não parecem estar associadas a FOP nesta população, sugerindo que estas variantes específicas têm pouco efeito na reserva folicular e na taxa de depleção folicular. No entanto, as repetições (TA)<sub>n</sub> na região promotora

do gene *ESRI* foram associadas a FOP. Este polimorfismo foi dividido em duas categorias: repetições (TA)<sub>n</sub> curtas (< 18 repetições) e repetições (TA)<sub>n</sub> longas (≥ 18 repetições). Neste estudo, repetições (TA)<sub>n</sub> curtas ocorreram menos frequentemente no grupo dos doentes com FOP, em relação aos grupos controlo ( $P < 0.05$ ). Pelo contrário, repetições (TA)<sub>n</sub> longas no gene *ESRI* foram associadas a risco aumentado de FOP ( $P$  não estatisticamente significativo) de um modo dominante, pois as mulheres portadoras do alelo de repetição (TA)<sub>n</sub> longo apresentaram aproximadamente 10 vezes mais risco de FOP comparadas com mulheres homocigotas para repetições curtas (TA)<sub>n</sub> do gene *ESRI*.

Foi registada uma ligação estreita entre as repetições (TA)<sub>n</sub> e dois SNPs no intrão 1, (*PvuII*) e (*XbaI*), encontrando-se as repetições longas de (TA)<sub>n</sub> no gene *ESRI* associadas ao alelo p (sem o polimorfismo *PvuII*) e ao alelo X (variante *XbaI*). Assim, Bretherick *et al.* (2008) avançaram com a ideia de que os polimorfismos *ESRI* (TA)<sub>n</sub> e SNPs no intrão 1 podem estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos no gene *ESRI* ou com genes na vizinhança, estes sim responsáveis pelo aumento do risco de FOP.

Weel *et al.* (1999) realizaram um estudo em que se propunham identificar determinantes genéticos da idade da menopausa. Para isso, investigaram a associação entre o polimorfismo *PvuII* do gene do  $RE\alpha$  e a data da menopausa natural (definida como mais de 12 meses de amenorreia) e cirúrgica (histerectomia, ovariectomia ou outra cirurgia ginecológica desconhecida) num grupo de mulheres holandesas pós-menopáusicas com idade igual ou superior a 55 anos.

Neste estudo os autores verificaram que mulheres portadoras do genótipo pp (sem a variante *PvuII*) apresentaram idade da menopausa 1.1 anos mais cedo ( $P < 0.02$ ), comparativamente a mulheres portadoras do genótipo PP (homocigotia para o polimorfismo *PvuII*). Tal como apresentado por Bretherick *et al.* (2008), também neste estudo o alelo não

variante (p) se associou a menopausa mais precoce. Assim, por cada cópia do alelo p, a menopausa ocorreu 0.5 anos mais cedo ( $P < 0.02$ ). Quando avaliada a menopausa natural isoladamente, esta também ocorreu mais cedo em portadoras do genótipo pp. Por outro lado, em relação à prevalência da menopausa cirúrgica, esta foi igualmente superior entre mulheres portadoras do genótipo pp e mínima nas mulheres homozigotas para o polimorfismo *PvuII* (PP), sendo o risco de menopausa cirúrgica 2.4 vezes superior em mulheres portadoras do genótipo pp quando comparado com o genótipo PP (1.5 a 3.8 vezes superior, com Intervalo de Confiança de 95%) (Weel *et al.*, 1999).

Este estudo demonstrou pela primeira vez que variantes comuns do gene do RE estão associadas a menopausa natural e cirúrgica. Os três genótipos não diferiram significativamente na idade da menarca, número de filhos e percentagem de mulheres com filhos. No entanto, a percentagem de mulheres com menopausa cirúrgica foi superior para o genótipo pp e inferior para os genótipos Pp e PP (resultados mais significativos para a histerectomia) (Weel *et al.*, 1999). Apesar de permanecer por esclarecer o modo como as variações do gene de RE influenciam a acção do RE e do seu ligando, o presente estudo demonstrou uma idade precoce da menopausa e uma prevalência superior de histerectomia por leiomiomas e menorragias em mulheres portadoras do alelo p.

Levanta-se assim a possibilidade de que a genotipagem do polimorfismo *PvuII* pode dar-nos informações sobre a susceptibilidade a doenças uterinas, que podem levar a menopausa precoce, o que secundariamente pode levar a outras entidades clínicas como a osteoporose e doenças cardiovasculares (Weel *et al.*, 1999).

## ***E. Fertilidade***

Nos últimos anos tem surgido na literatura a hipótese de que polimorfismos nos genes dos RE possam estar associados a diminuição da fertilidade (abortamentos de repetição, infertilidade inexplicada) e influenciar o resultado das técnicas de reprodução medicamente assistida (Altmäe *et al.*, 2007).

A fertilização *in vitro* (FIV) é o tratamento mais difundido em várias situações de infertilidade (Altmäe *et al.*, 2007). Esta técnica envolve a estimulação folicular (administração de gonadotrofinas), aspiração de folículos maduros, colheita de ovócitos, fertilização dos ovócitos *in vitro* e transferência de embriões para a cavidade uterina (Sundarrajan *et al.*,1999). O resultado desta técnica depende muito de factores que afectam o crescimento folicular, a esteroidogénese e a maturação ovocitária (Sundarrajan *et al.*,1999). Assim, a gravidez por FIV depende substancialmente do sucesso da estimulação dos ovócitos, avaliada pela quantidade e qualidade dos ovócitos recolhidos. No entanto, a resposta ovárica das pacientes submetidas a FIV varia consideravelmente e é influenciada negativamente por vários factores como o aumento da idade da mulher e a reduzida reserva ovárica (Altmäe *et al.*, 2007).

A FSH tem um papel crucial no crescimento dos folículos: estimula a proliferação de células da granulosa, aromatiza os androgénios em estrogénios, aumenta os receptores de FSH e induz os receptores de LH. Os estrogénios, por sua vez, têm um efeito regulador local no crescimento folicular, aumentando a acção de FSH, promovendo a proliferação de células da granulosa, aumentando o número de receptores dos estrogénios e FSH e protegendo os folículos em crescimento da atresia induzida pelos androgénios. Assim, os estrogénios e a FSH actuam de modo sinérgico no ovário aumentando o número de receptores de FSH nas

células da granulosa, resultando no crescimento e maturação foliculares (Sundarrajan *et al.*, 1999). A acção dos estrogénios afecta ainda a maturação dos ovócitos, sendo necessária para a maturação óptima do citoplasma do ovócito e do oolema. Assim os estrogénios têm um papel crucial na determinação da qualidade do ovócito pelo que, em folículos com concentrações baixas de estrogénios, a qualidade do ovócito pode estar afectada (Sundarrajan *et al.*, 1999).

A sinalização dos estrogénios é mediada pela ligação aos RE. No ovário, os RE $\alpha$  encontram-se maioritariamente na teca, enquanto que os RE $\beta$  podem ser encontrados nas células da granulosa de folículos em crescimento em todos os estadios de desenvolvimento (Altmäe *et al.*, 2007). A localização diferenciada dos dois subtipos de RE nas várias camadas funcionais do folículo está em concordância com a ideia de que os efeitos dos estrogénios na foliculogénese são mediados pelas acções de RE $\alpha$  e RE $\beta$  na teca e nas células granulosas, respectivamente. Os RE têm ainda um papel essencial na preparação do endométrio para a implantação do embrião, encontrando-se os RE $\alpha$  e RE $\beta$  em todos os tipos de células uterinas ao longo de todo o ciclo menstrual (Altmäe *et al.*, 2007).

Sundarrajan *et al.* (1999) desenvolveram um estudo com o objectivo de procurar uma associação entre o polimorfismo comum *PvuII* e o raro polimorfismo *BstUI* do gene do RE $\alpha$ , e a qualidade folicular e ovocitária e o número de gravidezes em mulheres chinesas de Singapura, submetidas a FIV. Para esse estudo foram seleccionadas 200 mulheres estéreis, com ovulação normal, com idades compreendidas entre os 24 e os 39 anos ( $29 \pm 3.2$  anos) e com esterilidade de pelo menos 3 anos. Apenas foram incluídas mulheres com ciclos normais e infertilidade inexplicada e sem patologias passíveis de afectar a resposta ovárica. Como grupo controlo foram ainda seleccionadas 200 mulheres, com menstruações normais, do mesmo grupo etário e com antecedentes de pelo menos uma gravidez espontânea, como controlos.

Sundarrajan *et al.* (1999) demonstraram uma associação negativa, estatisticamente significativa, entre a existência do polimorfismo *PvuII* e o número de folículos e de ovócitos maduros ( $P<0.001$ ) (tabela 6). A razão entre o número médio de folículos e o número médio de ovócitos maduros correlacionou-se de modo estatisticamente significativo com a presença de polimorfismo ( $P<0.001$ ), tendo sido mínima no grupo sem polimorfismo (indicando que este grupo tinha o maior número de ovócitos por folículo) e máxima no grupo de doentes homocigotas para o polimorfismo (PP). Estes autores encontraram também uma associação negativa entre o tamanho dos folículos e o número de alelos do polimorfismo. Quanto ao polimorfismo *BstUI*, este não foi encontrado nesta população.

**Tabela 6. Distribuição do polimorfismo *PvuII*, em mulheres submetidas a FIV**

Genótipos <i>PvuII</i>	pp (n=36)	Pp (n=96)	PP (n=68)
Nº Folículos	17.81±3.87 <sup>a,c</sup> (10-24)	18.24±4.07 <sup>b</sup> (9-25)	15.49±3.89 (8-22)
Nº Ovócitos	9.78±2.03 <sup>b,c</sup> (5-16)	7.57±1.63 <sup>b</sup> (2-15)	6.19±1.60 (2-15)
Razão Folíc/Ovóc	1.83±0.22 <sup>b,c</sup> (1.2-2.9)	2.41±0.16 <sup>b</sup> (1.3-3.3)	2.51±0.15 (1.3-3.5)
Tamanho Folic (mm)	25.9±2.5 <sup>b,d</sup> (12-33)	25.2±1.7 <sup>b</sup> (12-32)	23.8±1.3 (11-28)

Sundarrajan *et al.*, 1999

<sup>a</sup> Não significativamente diferente do grupo Pp ( $P>0.05$ )

<sup>b</sup> Significativamente diferente do grupo PP ( $P<0.001$ )

<sup>c</sup> Significativamente diferente do grupo PP ( $P=0.015$ )

<sup>d</sup> Não significativamente diferente do grupo Pp ( $P>0.05$ )

<sup>e</sup> Significativamente diferente do grupo Pp ( $P<0.001$ )

(P, alelo variante; p, alelo não variante)

Neste estudo o número de embriões e a taxa de gravidez foi marcadamente diferente ( $P<0.001$ ) entre o grupo de doentes homocigotas para o polimorfismo (PP) e sem polimorfismo *PvuII* (pp), tendo sido a taxa de gravidez mais baixa encontrada nas homocigotas para o polimorfismo e a mais alta no grupo sem polimorfismo (tabela 7). Este estudo demonstra portanto que a variabilidade no gene do RE pode ter um papel importante

nas taxas de gravidez por FIV. Os autores não encontraram diferença na frequência do polimorfismo *PvuII* entre o grupo de doentes e do grupo controlo. Isto demonstra que a mera presença do polimorfismo não leva a infertilidade, uma vez que as mulheres do grupo controlo tinham antecedentes de pelo menos uma gravidez espontânea. Este polimorfismo pode apenas alterar a resposta ovárica à estimulação, diminuindo a qualidade dos folículos ováricos e dos ovócitos (Sundarrajan *et al.*, 1999).

**Tabela 7. Distribuição do polimorfismo *PvuII*, em mulheres submetidas a FIV**

Genótipos <i>PvuII</i>	pp	Pp	PP
<b>Doentes</b>	36	96	68
<b>Nº Ovócitos</b>	9.78±2.03	7.57±1.63	6.19±1.60
<b>Nº Embriões Obtidos</b>	9.44±2.29 (2-12)	4.90±0.92 (1-6)	2.20±0.42 (1-4)
<b>Nº Embriões Transf.</b>	3.3±0.51 (1-4)	2.4±0.51 (1-3)	1.4±0.52 (1-2)
<b>Nº Gravidezes</b>	32	30	10
<b>Taxa de Gravidez (%)</b>	88.9 <sup>a,b</sup>	31.2 <sup>a</sup>	14.7

Sundarrajan *et al.*, 1999

<sup>a</sup> Significativamente diferente do grupo PP ( $P < 0.001$ )

<sup>b</sup> Significativamente diferente do grupo Pp ( $P < 0.001$ )

O estudo de Sundarrajan *et al.* (1999) demonstrou que a variabilidade genética no gene do RE pode exercer efeitos indirectos sobre a taxa de gravidez após FIV, ao afectar o desenvolvimento de folículos, ovócitos e embriões. Assim, o polimorfismo *PvuII* poderá servir como um marcador de resposta ovárica e de taxa de gravidez em pacientes submetidas a FIV.

Num estudo anterior desenvolvido por Georgiou *et al.* (1997) os mesmos polimorfismos do gene do RE $\alpha$ , *PvuII* e *BstUI*, foram analisados em doentes de origem grega submetidas a FIV, com o objectivo de tentar elucidar o papel do RE $\alpha$  na indução da ovulação e implantação

do embrião. O grupo de doentes (n=100) e o grupo controlo (n=100) foi seleccionado segundo os mesmos critérios do estudo de Sundarrajan *et al.* (1999), encontrando-se as idades dos grupos de doentes e controlo, compreendidas entre os 25 e 35 e entre os 20 e 40 anos, respectivamente. Foi encontrada uma associação entre estes polimorfismos apenas com o aumento da razão de folículos-ovócitos e não com o número de folículos ou de ovócitos individualmente. A diferença entre as razões de folículos-ovócitos foi particularmente significativa entre os genótipo pp (homozigotia para o alelo não variante) e os genótipos Pp ou PP ( $P<0.05$  e  $P<0.01$ , respectivamente), tendo sido máxima para no genótipo PP e mínima no genótipo pp (tabela 8). Em relação ao número de gravidezes como resultado de FIV, este foi menor nas mulheres portadoras de homozigotia para *PvuII* ( $P>0.05$ ), tendo registado apenas 3 das 37 gravidezes (8%), enquanto que os genótipo pp e Pp registaram ambos 46% das gravidezes. O polimorfismo parece assim afectar a resposta ovárica na FIV através da diminuição do número final de ovócitos maduros (Georgiou *et al.*, 1997).

**Tabela 8. Distribuição do polimorfismo *PvuII*, em mulheres submetidas a FIV**

Genótipos <i>PvuII</i>	Ausência de <i>PvuII</i> pp (n=33)	Hetrozigotos Pp (n=96)	Presença de <i>PvuII</i> PP (n=68)
Nº Folículos	13.20±5.04 (6-22)	13.10±6.25 (4-23)	13.50±5.80 (4-24)
Nº Ovócitos	7.8±3.2 (3-15)	6.6±3.6 (1-15)	6.7±3.9 (1-15)
Razão Folíc/Ovóc	1.78±0.53 (1.1-2.7)	2.20±0.92 <sup>a</sup> (1-3.1)	2.24±0.65 <sup>b</sup> (1.2-3.2)

Georgiou *et al.* (1997)

<sup>a</sup> Significativamente diferente do grupo pp ( $P<0.05$ )

<sup>b</sup> Significativamente diferente do grupo pp ( $P<0.01$ )

(P, alelo variante; p, alelo não variante)

Segundo Sundarrajan *et al.* (1999), os diferentes resultados encontrados entre o seu estudo e o de Georgiou *et al.* (1997) poderão ser justificados pela diferença no protocolo de estimulação e critérios para a selecção do tamanho folicular para administração de HCG e

para a aspiração de ovócitos. Diferenças na etnicidade dos grupos populacionais poderão também ter contribuído para esta variabilidade.

Sundarrajan *et al.* desenvolveram em 2001 um outro estudo, onde procuraram avaliar a presença dos polimorfismos do gene *ESR2* do ER $\beta$  *RsaI* e *AluI* em 98 mulheres chinesas de Singapura, com disfunção ovulatória e alterações menstruais, com idades compreendidas entre os 14 e os 39 anos. Todas as doentes apresentaram níveis de Progesterona inferiores a 31.8 nmol/L. Das 98 doentes, 33 apresentavam distúrbio ovulatório de causa desconhecida (idiopático), 30 possuíam Síndrome do Ovário Poliquístico (SOP), 13 apresentavam defeitos ovulatórios de causa reprodutiva (Falência Ovárica Prematura, Disgenesia Gonadal, Síndrome do Ovário Resistente, Leiomioma, Quisto endometrial do ovário) e 22 doentes apresentavam defeitos ovulatórios de causas não reprodutivas (Hipertiroidismo, Hipotiroidismo, Diabetes, Desnutrição, Exercício, Stress e Obesidade). Como controlos foram utilizadas 155 mulheres aparentemente saudáveis, de idades compreendidas entre os 18 e os 44 anos, com ciclos menstruais regulares espontâneos.

Neste estudo a frequência dos polimorfismos *RsaI* e *AluI* foi significativamente superior no grupo das doentes em relação ao grupo controlo ( $P=0.009$  e  $P=0.059$ , respectivamente). A ocorrência de homozigotia para estes polimorfismos foi também significativamente superior entre as doentes (8.2% e 11.2 % para os polimorfismo *RsaI* e *AluI*) em relação aos controlos (1.3% e 4% para os polimorfismo *RsaI* e *AluI*). A ocorrência de homozigotia para ambos os polimorfismos foi significativamente superior no grupo de doentes de disfunção ovárica de origem desconhecida, em relação aos controlos ( $P<0.001$  e  $P=0.001$  ). Cinco doentes eram homozigotas para ambos os polimorfismos e todas pertenciam ao grupo de disfunção ovárica idiopática. A frequência do polimorfismo *RsaI*, mas não do polimorfismo *AluI*, foi significativamente superior no grupo de doentes com SOP em relação aos controlos ( $P= 0.019$  e  $P>0.05$ , respectivamente).

Os níveis de Estradiol (E2), FSH, LH, Testosterona e Progesterona foram também avaliados no estudo de Sundarrajan *et al* (2001). Não se verificaram diferenças nos níveis de E2 e testosterona entre os vários genótipos. No que respeita aos níveis de LH, estes foram inferiores nas doentes com genótipo RR (homozigotia para o polimorfismo *RsaI*) e genótipo AA (homozigotia para o polimorfismo *AluI*), em relação aos doentes com genótipo rr ( $P>0.05$ ) e aa ( $P=0.05$ ). Os níveis de LH foram particularmente mais baixos nas 5 doentes homozigotas para ambos os polimorfismos, em relação às doentes sem polimorfismos ( $P=0.004$ ). Os níveis de Progesterona foram significativamente inferiores nas doentes com genótipo RR, genótipo AA e homozigotas para ambos os polimorfismos, em relação às doentes sem polimorfismos ( $P<0.002$ ). Assim, os autores sugerem que é possível que no tecido ovárico, onde hormonas e seus receptores coexistem, possa ocorrer a perda de alguma função dos RE $\beta$  em doentes homozigotas para os polimorfismos *RsaI* e/ou *AluI*. Por fim, os níveis de FSH encontraram-se igualmente diminuídos no grupo de doentes com genótipo RR, AA e homozigotia para ambos os genótipos, em relação ao grupo de doentes sem polimorfismos, mas não de modo significativamente estatístico.

Em relação aos níveis diminuídos de FSH e LH nas doentes portadoras dos polimorfismos do gene do RE $\beta$ , Sundarrajan *et al.* (2001) sugerem que a presença destes RE $\beta$  polimórficos a nível do hipotálamo poderão apresentar uma resposta menor ao retrocontrolo positivo de E2, resultando na diminuição das hormonas FSH e LH e na consequente disfunção ovárica. O estudo de Sundarrajan *et al.* (2001) postula que variações alélicas a nível dos RE $\beta$  podem estar associadas a disfunção ovárica, particularmente de causa idiopática.

Ainda em relação à influência dos polimorfismos nos genes do RE na fertilidade, dois estudos (Aléssio *et al.*, 2008 e Cupisti *et al.*, 2009) avaliaram a presença de diferentes variações destes genes em duas amostras de mulheres com antecedentes de abortamentos de repetição.

Os abortamentos de repetição, definidos como três ou mais abortos, afectam aproximadamente 1% dos casais (Cupisti *et al.*, 2009). A etiologia é múltipla e a condição responsável nem sempre identificada na prática clínica. Tem sido sugerido que causas genéticas, alterações anatómicas e factores trombofílicos podem estar associados a abortamento de repetição (Cupisti *et al.*, 2009). Nos últimos anos têm sido feitos esforços para encontrar causas genéticas de abortamento de repetição ao nível molecular (Cupisti *et al.*, 2009).

Um estudo levado a cabo por Aléssio *et al.* (2008), em dois grupos de mulheres brasileiras (caucasianas e afro-brasileiras) com história de 3 ou mais abortos consecutivos, reportou a ausência de associação entre o abortamento de repetição e polimorfismos nos genes *ESR1* (*PvuII* e *XbaI*) e *ESR2* (*RsaI* e *AluI*).

Num estudo recente realizado por Cupisti *et al.* (2009) investigou-se a presença de variações genéticas na via dos estrogénios e a sua associação com abortamento. Foram investigadas 3 variantes do gene *CYP19A1* (rs10046, rs4646 e rs700519) e uma variante do gene do receptor dos estrogénios *ESR1* (rs3020314) e do gene do receptor de progesterona *PGR* (rs1042838), num universo de 483 mulheres. Os abortamentos foram correlacionados com os genótipos, como sendo uma variável dividida em três categorias (sem abortamentos, um abortamento e mais que um abortamento) num grupo de mulheres que tinham tido pelo menos duas gravidezes (critério de inclusão). A definição de abortamento de repetição implicava portanto mais do que dois abortos. Nenhum dos dados epidemiológicos avaliados, tais como índice de massa corporal, idade da menarca ou idade da primeira gravidez, se associou com o número de abortamentos (Cupisti *et al.*, 2009).

Neste estudo não se identificou uma associação entre o polimorfismo de *ESR1* e abortamentos de repetição, tendo sido encontrada apenas uma associação positiva entre a

homozigotia para o polimorfismo de *CYP19A1* (rs10046) e a frequência de abortamentos. Quanto aos restantes genótipos, não se encontrou igualmente uma associação com abortamentos de repetição. Assim, apesar de Cupisti *et al.* (2009) terem analisado polimorfismos diferentes dos investigados por Aléssio *et al.* (2008), também não foi encontrada qualquer influência dos polimorfismos de *ESR1* na manutenção da gravidez.

Num estudo desenvolvido por Corbo *et al.* (2007) foi investigado o possível impacto dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* na fertilidade, em duas populações com padrões reprodutivos diferentes. A primeira amostra era originária de uma população saudável de homens e mulheres italianos (n= 178), nascidos antes de 1930 e vivendo numa sociedade onde a transição demográfica (aumento da esperança de vida e diminuição da fertilidade) já havia começado. A outra amostra era constituída por mulheres saudáveis provenientes de uma população pré-industrial da África equatorial, que no momento da recolha de dados não praticava contraceção, podendo ser considerada uma população com fertilidade natural.

O estudo demonstrou um aumento da eficácia reprodutiva associada aos genótipos PP (homozigotia para o polimorfismo *PvuII*) e XX (homozigotia para o polimorfismo *XbaI*) do gene *ESR1*. Na amostra de homens italianos saudáveis, os indivíduos portadores dos genótipos XX ou PP ou ambos foram associados a uma maior número de filhos, sendo esta correlação mais significativa para o genótipo XX ( $P=0.04$ ). Este resultado é consonante com as observações de Kukuvtis *et al.* (2002), que numa amostra de homens gregos inférteis, demonstrou a presença de uma frequência significativamente inferior dos genótipos XX entre indivíduos com azoospermia ou oligospermia severa idiopática.

Na amostra de mulheres italianas Corbo *et al.* (2007) observaram uma tendência para a associação do genótipo PP do gene *ESR1* a um número menor de abortos, em relação aos genótipos Pp e pp ( $P=0.04$ ) e não a um maior número de filhos, enquanto na amostra de

mulheres da África Equatorial, o genótipo PP se associou com um maior número de filhos ( $P=0.02$ ) (tabela 9). A observação de resultados comparáveis em populações com padrões reprodutores diferentes como as populações italiana e da África Equatorial (número de filhos 3.7 versus 7.6; idade no primeiro nascimento 22.4 versus 18.2 anos), sugere que o efeito do genótipo do gene *ESR1* na fertilidade é independente do contexto ambiental (Corbo *et al.*, 2007).

**Tabela 9. Distribuição dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI*, em dois grupos populacionais**

ESR1	Mulheres italianas			Mulheres África Equatorial			
	Nº	Filhos	Gravidezes	Abortos	Nº	Filhos	Gravidezes
<b>pp</b>	22	3.6±1.6	4.5±1.9	0.86±1.0	7	5.4±4.8	5.7±5.1
<b>Pp</b>	47	3.8±2.6	4.8±3.2	0.87±1.1	32	7.1±3.3	8.0±3.9
<b>PP</b>	23	3.4±2.4	3.8±1.7	0.35±0.6	18	9.4±3.1	10.4±3.6
<b>xx</b>	20	3.8±1.7	3.8±1.7	0.75±0.8	2	7.6±0.9	8.3±0.9
<b>Xx</b>	48	3.8±1.7	3.6±2.3	0.83±1.1	28	6.6±3.8	7.5±4.5
<b>XX</b>	24	3.9±2.7	3.9±2.7	0.54±0.7	27	8.7±3.4	9.5±3.6

Corbo *et al.*, 2007

(P e X, presença de variante; p e x, sem variante)

Corbo *et al.* (2007) sugerem que os efeitos fenotípicos do genótipo de *ESR1* variam de acordo com o ambiente reprodutivo: em mulheres provenientes de populações com fertilidade natural, o genótipo *ESR1* influencia a fertilidade de modo visível apenas perante uma eficácia reprodutiva elevada. Em famílias onde a contracepção é uma realidade, o efeito fenotípico manifesta-se no número de abortos de repetição. Em sociedades modernas, os efeitos dos polimorfismos do gene *ESR1* podem manifestar-se como resultado de técnicas como a FIV (Georgiou *et al.*, 1997; Sundarajan *et al.*, 1999). Assim no contexto de comportamentos reprodutivos modernos (adiamento e diminuição da fertilidade), os fenótipos associados aos

genótipos XX e PP, tendem a ser mais aparentes porque, em vez de influenciarem o número de filhos, parecem estar associados à presença ou não de descendência (Corbo *et al.*, 2007).

## ***F. Cancro da mama, Cancro do ovário e Cancro do endométrio***

O cancro da mama é o cancro que mais mulheres afecta a nível mundial e representa a segunda causa de morte entre as mulheres, logo após o cancro do pulmão (Siddig *et al.*, 2008). É uma doença multifactorial que envolve na sua etiopatogenia factores genéticos e ambientais (Maguire *et al.*, 2008). Vários factores de risco estabelecidos como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade tardia na primeira gravidez, e obesidade pós-menopáusica, incluem situações em que a glândula mamária é sujeita a uma exposição prolongada ou excessiva aos estrogénios (Fernández *et al.*, 2006). Os estrogénios influenciam a proliferação, a diferenciação e a fisiologia do tecido mamário e a exposição estrogénica é um factor central no desenvolvimento e progressão do cancro da mama. Os efeitos dos estrogénios no epitélio mamário são mediados primariamente pelos RE.

Desde a descoberta, no início da década de 90, dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (cujas mutações são responsáveis por cerca de 5% de todos os casos de cancro da mama), os esforços para descobrir outros genes responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a cancro da mama, não têm sido bem sucedidos. A falha na identificação de novos genes de elevada penetrância aponta para a existência de genes de penetrância baixa ou moderada, que combinados poderão alterar a susceptibilidade para cancro da mama (Maguire *et al.*, 2009). Este modelo poligénico de susceptibilidade para cancro da mama tem sido testado em vários estudos com SNPs em genes candidatos. Entre os genes de baixa penetrância candidatos a agentes etiológicos do cancro da mama, os genes dos RE (*ESR1* e *ESR2*) tornaram-se fortes concorrentes (Siddig *et al.*, 2008). Têm sido identificados vários SNPs no gene *ESR1* e estes associados a aumento ou diminuição do risco de cancro e outras doenças. Os SNPs mais bem

caracterizados do *ESR1* são o *PvuII* e o *XbaI*, identificados pelas enzimas de restrição com o mesmo nome (Siddig *et al.*, 2008).

Os RE formam tanto homodímeros como heterodímeros, e diferentes isoformas de *ESR2* têm sido sugeridas como tendo um papel regulador na actividade do *ESR1*. Variações no gene *ESR1* do RE $\alpha$  que alterem a função ou expressão destas proteínas, poderão potencialmente afectar o risco de desenvolvimento de cancro da mama, as características do tumor e a sobrevivência desta doença (Einarsdóttir *et al.*, 2008). No entanto, apenas uma baixa percentagem de células epiteliais (7-10%) da mama normal expressam RE $\alpha$ , enquanto uma percentagem relativamente superior expressa RE $\beta$ , que é inversamente relacionada com proliferação celular, indicando um papel protector na tumorigénese. Também foi demonstrado que o gene *ESR2* se encontra subexpresso na carcinogénese mamária (Einarsdóttir *et al.*, 2008). Murphy *et al.* (2003) reportou que mais de 50% dos cancros da mama previamente classificados de RE-negativo, expressam RE $\beta$ . Estudos imunohistoquímicos sugerem que RE $\beta$  tende a ser expresso em cancros da mama- RE $\alpha$  positivos e que há células que coexpressam RE $\alpha$  e RE $\beta$  no cancros da mama. Dados sobre a análise proteica de RE $\beta$ , têm sugerido que a sua expressão é um marcador prognóstico favorável no cancro da mama. Apesar do papel do RE $\beta$  permanecer por esclarecer surge a hipótese de que o aumento da expressão do RE $\beta$  poderá estar associada a probabilidade de boa resposta à terapia hormonal (Herynk e Fuqua, 2004).

Apesar de alguns estudos terem demonstrado uma associação significativa entre os polimorfismos do RE e o risco de cancro da mama, não foi possível demonstrar esta associação em muitos outros estudos.

Siddig *et al.* (2008), procuraram uma associação entre o SNP C325G, presente no exão 4 do *ESR1* e a susceptibilidade para cancro da mama, em indivíduos sudaneses. O Sudão é um

país em que o cancro da mama é particularmente prevalente, sendo o tumor mais comum, representando 34% de todos os doentes com cancro. O SNP estudado por estes autores, é causado pela substituição sinónima de um nucleotídeo, ou seja, sem alteração de aminoácido. Para este estudo foram seleccionados 100 doentes com cancro da mama primário (98 mulheres e 2 homens) e 90 controlos (84 mulheres e 6 homens).

Siddig *et al.* (2008) encontraram uma frequência superior do genótipo CC (homozigotia para a ausência de polimorfismo) em pacientes com cancro da mama, em comparação com o grupo controlo, mas não de um modo estatisticamente significativo. No entanto, quando distribuídos os genótipo por dois grupos etários ( $\leq 50$  anos e  $> 50$  anos), foi encontrada uma associação significativa entre o genótipo CC (56.3% e 68.4%, respectivamente) e risco de cancro da mama em mulheres com menos de 50 anos ( $P=0.03$ ). A prevalência significativamente superior ( $P=0.03$ ) do alelo G (alelo variante) no grupo controlo (18.2%), foi observada em relação ao grupo de doentes (12.7%), sugerindo que o alelo C é um alelo de susceptibilidade, enquanto o alelo G parece conferir protecção. Este resultado está em concordância com um outro estudo levado a cabo por uma equipa asiática (Hsiao *et al.*, 2004), em que o alelo G foi encontrado com menor frequência entre os pacientes com cancro da mama (52.1%), em relação aos controlos (58,2%), apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa.

Um artigo publicado em 2002 por Vasconcelos *et al.*, avaliou igualmente a presença do SNP C325G, num grupo de 70 mulheres com cancro da mama primário e 69 controlos (homens e mulheres), de nacionalidade portuguesa. Neste estudo o alelo G (alelo variante) foi encontrado em 42.8% das doentes, tendo sido encontrado em apenas 24.6% dos controlos (tabela 10). Deste modo, e ao contrário do encontrado por Siddig *et al.* (2008), Vasconcelos *et al.* (2002) concluíram que este polimorfismo pode estar associado com um aumento do risco

de desenvolvimento de cancro da mama ( $P=0.029$ ). Neste estudo, foi feita ainda uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo C325G e a ausência de metástases ganglionares ( $P=0.038$ ) (tabela 11).

**Tabela 10. Distribuição genotípica do polimorfismo C325G**

C325G	Nº Pacientes (%) (n= 70)	Nº de Controlos, homens e mulheres (%) (n=69)
Alelo G	30 (42.8)	17 (24.6)
Alelo C	40 (57.2)	52 (76.4)

Vasconcelos *et al.*, 2002

**Tabela 11. Distribuição genotípica do polimorfismo C325G e metástases ganglionares**

Metástases Ganglionares	C325G	
	Alelo G (n=30)	Alelo C (n=40)
Ausência	18	14
Presença	12	26

Vasconcelos *et al.*, 2002

O polimorfismo C325G não altera a proteína codificada. Assim, o modo como este polimorfismo afecta a função do RE ainda está por esclarecer. Foi reportado que este polimorfismo pode alterar indirectamente a função desta proteína ao alterar a semi-vida do RNA mensageiro ou a tradução da proteína, afectando o nível de RE $\alpha$  (Siddig *et al.*, 2008). Um outro estudo indica que SNPs silenciosos podem afectar a função proteica ao forçar a célula a ler um codão de DNA diferente do habitual e por isso alterar o ritmo de enrolamento da proteína e a sua conformação, alterando a função desta proteína (Siddig *et al.*, 2008). Por ser um polimorfismo silencioso, este pode ser apenas um epifenómeno que poderá ser usado como marcador de susceptibilidade ou protecção para cancro da mama, em oposição a ser uma alteração genética com papel integral no desenvolvimento de cancro da mama.

Um outro estudo desenvolvido por Hamaguchi *et al.* (2008), teve como objectivo procurar uma relação entre a presença de polimorfismos do *ESR1* (rs6905370, rs2077647 e rs827421) e a probabilidade de cancro da mama positivo para o receptor dos estrogénios (RE+). O estudo utilizou 453 mulheres japonesas tratadas cirurgicamente por cancro da mama primário. Foram analisados os 3 SNPs em pacientes com cancro da mama RE+ (312 doentes) e RE-negativo (141 doentes). Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos. No entanto, o alelo variante G do polimorfismo rs6905370 foi associado a aumento da probabilidade de o cancro da mama ser RE+ em mulheres pré-menopáusicas japonesas (<50 anos) (Hamaguchi *et al.*,2008).

Os polimorfismos do gene *ESR2* também têm sido objecto de vários estudos com doentes com cancro da mama. Maguire *et al.* (2008) avaliaram a correlação entre polimorfismos no *ESR2* e o risco de cancro da mama. Para isso investigaram três SNPs comuns do gene *ESR2* (G1082A, G1730A e Cx+56A→G). Os autores seleccionaram 723 casos de cancro da mama, dos quais 323 eram esporádicos e os restantes com componente familiar. Dos 400 casos com componente hereditário, 212 eram de alto risco (pelo menos 3 familiares de primeiro grau afectados ou 2 familiares de primeiro grau e 1 de segundo grau) e 188 de baixo risco (dois casos de cancro da mama entre familiares de primeiro ou segundo grau). Os resultados deste estudo não demonstraram qualquer associação estatisticamente significativa entre os vários SNPs isoladamente e o risco de cancro de mama, mas a análise dos haplotipos formados pelos 3 SNPs sugere a associação do haplotipo G-A-G (alelo G do SNP G1082A, alelo A do SNP G1730A e alelo G do polimorfismo Cx+56A→G) a aumento do risco de cancro da mama esporádico.

O estudo recente desenvolvido por Surekha *et al.* (2009), avaliou a potencial importância funcional do polimorfismo *AluI* no gene *ESR2*, no cancro da mama. Para isso foram seleccionadas 250 mulheres com cancro da mama e 250 mulheres sem história familiar

ou pessoal de cancro da mama ou de outro cancro (grupo controlo). O diagnóstico de cancro da mama foi feito através do exame objectivo, mamografia, aspiração por agulha fina e biópsia.

A frequência do genótipo AA (homozigotia para o alelo variante) foi significativamente superior no grupo de doentes (8.47%) em relação ao grupo controlo (3.6%) ( $P < 0.05$ ), sugerindo que o genótipo AA confere um maior risco no desenvolvimento de cancro da mama. A frequência do genótipo AA foi superior entre mulheres com cancro da mama antes da menopausa (12.2%) em relação a mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama (4.3%), indicando, segundo os autores, que este genótipo poderá predispor a início mais precoce de cancro da mama. Uma tendência para frequências superiores do genótipo AA entre mulheres com história familiar de cancro da mama em comparação com doentes sem esse antecedente familiar, foi encontrada, mas não estatisticamente significativa. A frequência do genótipo AA do polimorfismo *AluI* também se revelou superior em doentes com cancro da mama RE+ e em doentes com presença de metastização ganglionar, mas sem significância estatística.

Assim, Surekha *et al.* (2009) verificou uma associação entre o polimorfismo *AluI* e o risco de desenvolvimento de cancro da mama. Os autores sugerem que a presença de polimorfismo no RE $\beta$  poderá resultar na perda ou diminuição da sua função supressora tumoral, levando a uma predisposição pessoal e hereditária ao desenvolvimento de cancro da mama.

A incidência de cancro do endométrio declinou na década de 1980 mas tem aumentado desde o início da década de 1990 a uma taxa de aproximadamente 0.6% ao ano (Ashton *et al.*, 2009). Actualmente este é o cancro ginecológico mais comum no mundo industrializado. Os

factores de risco potenciais para o desenvolvimento de cancro do endométrio são o índice de massa corporal elevado, tensão arterial elevada, diabetes e nuliparidade. Cada um destes factores pode contribuir significativamente para o aumento do risco da doença de 5 a 10 vezes, em relação a mulheres sem esses factores de risco (Ashton *et al.*, 2009).

No entanto, a base molecular do cancro do endométrio está ainda mal definida. Dadas as múltiplas influências ambientais associadas ao metabolismo dos estrogénios, uma relação provável existirá entre a exposição excessiva ou prolongada a estrogénios e o aumento da susceptibilidade para este cancro. Os estrogénios, quer endógenos quer exógenos, são potentes mitogénios no endométrio e constituem um carcinogénio importante neste tecido. Por seu lado, os efeitos dos estrogénios são mediados pela ligação ao RE, sendo o RE $\alpha$  o principal subtipo expresso no endométrio (Ashton *et al.*, 2009).

Um pequeno número de estudos demonstrou que polimorfismos dos genes do RE, podem alterar o risco de desenvolvimento de cancro do endométrio. Um estudo conduzido na Suécia por Weiderpass *et al.* (2000) demonstrou uma tendência para uma diminuição do risco de cancro do endométrio em indivíduos portadores das variantes do *ESR1* rs9340799 e rs2234693, mas os resultados não foram estatisticamente significativos. No entanto, num estudo japonês levado a cabo por Sasaki *et al.* (2003), onde se investigou o polimorfismo rs2234693, a associação a cancro do endométrio não foi confirmada. Em relação aos polimorfismos do gene *ESR2*, num estudo elaborado nos Estados Unidos da América por Setiawan *et al.* (2004), não foi encontrada associação entre os polimorfismos estudados (rs1256049 e rs12711572) e o risco de cancro do endométrio.

Num estudo desenvolvido por Wedrén *et al.* (2008) investigou-se a possibilidade de variações do *ESR1* estarem associadas a risco de cancro do endométrio. Para isso foram

analisados cinco polimorfismos (rs2234670, rs2234693, rs9340799, rs4986934, rs4986934 e rs1801132) em 702 mulheres suecas com cancro do endométrio e 1563 mulheres controlo.

Este estudo demonstrou uma associação entre a presença dos polimorfismos rs2234670, rs2234693 e rs9340799 e diminuição do risco de cancro do endométrio. A associação mais forte verificou-se em relação ao polimorfismo rs9340799, onde os indivíduos homozigotos para o alelo variante apresentaram quase metade do risco de desenvolver cancro do endométrio, em relação a homozigotos para o alelo comum. A associação entre rs9340799 e diminuição do risco de cancro do endométrio não foi modificada quando analisados apenas indivíduos sujeitos a exposição estrogénica (terapia de substituição hormonal ou elevado índice de massa corporal). Em relação aos restantes polimorfismos não ficou provada uma associação a risco de cancro do endométrio.

Recentemente, um estudo desenvolvido por Ashton *et al.* (2009) procurou uma associação entre dois polimorfismos do gene *ESR1* (rs2234693 e rs9340799) e quatro polimorfismos dos genes *ESR2* (rs944050, rs4986938, rs1256049 e rs1255998) e susceptibilidade para cancro do endométrio. Foram utilizadas 191 mulheres australianas com cancro do endométrio histologicamente confirmado e 291 mulheres australianas controlo.

Neste estudo ambos os polimorfismos do *ESR1* e dois dos polimorfismos do *ESR2* (rs944050 e rs1255998), foram associados a risco aumentado de cancro do endométrio. Avaliando ambas as variações do gene *ESR1*, o haplotipo com ambas as variações revelou um aumento do risco para cancro do endométrio ( $P < 0.05$ , OR=1.55, IC de 95%). Um haplotipo do gene *ESR2* constituído pela variante alélica de rs1255998 e variante comum para rs944050, rs4986938 e rs1256049, também foi associado a aumento do risco de cancro do endométrio ( $P < 0.05$ , OR=1.6, IC de 95%). Quando avaliados todos os polimorfismos em conjunto, foi demonstrado que pacientes portadoras do haplotipo combinado de alelos

variantes para ambas os polimorfismos do *ESR1*, alelo variante para rs1255998 e alelos comuns de rs944050, rs4986938 e rs1256049, do gene *ESR2*, apresentavam risco aumentado de cancro do endométrio ( $P < 0.05$ , OR=3.4, IC de 95%). Assim, foi demonstrado que a combinação de polimorfismos para rs2234693 e rs9340799 do gene *ESR1* e rs1255998 do gene *ESR2*, está associada a risco aumentado de cancro do endométrio.

Os polimorfismos do gene do RE parecem ser importantes marcadores na identificação de mulheres com risco de cancro do endométrio. Se estudos posteriores assim o confirmarem, as mulheres com este risco poderão ser identificadas e beneficiar de medidas profiláticas de vigilância.

Os resultados divergentes entre os estudos de Ashton *et al.* (2009), Sasaki *et al.* (2003) e Setiawan *et al.* (2004), em relação aos polimorfismos do *ESR1*, serão provavelmente justificados pelas diferenças populacionais.

O cancro do ovário é a principal causa de morte por cancro ginecológico e a quarta causa de morte por cancro em mulheres, principalmente devido às suas manifestações clínicas tardias e ausência de métodos eficazes de diagnóstico precoce. A maioria das mulheres que desenvolve este cancro não é portadora da mutação genética de alta penetrância nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Assim, a descoberta de mutações genéticas comuns de baixa penetrância poderá ser útil na detecção de mulheres com alto risco de desenvolvimento de cancro do ovário, permitindo uma abordagem individual de rastreio mais eficaz (Lurie *et al.*, 2008).

Tal como no cancro da mama e no cancro do endométrio, existe evidência do papel dos estrogénios endógenos e exógenos na carcinogénese do ovário, sendo os seus efeitos mediados pelos RE. Ambos os subtipos de RE estão presentes nas células epiteliais na superfície do ovário, mas o RE $\beta$  é predominante no ovário normal. Os estrogénios induzem

proliferação celular e têm um efeito anti-apoptótico na presença do RE $\alpha$ , enquanto o RE $\beta$  medeia apoptose induzida pelos estrogénios. Estudos recentes sugerem que o RE $\beta$  possa actuar como supressor tumoral nas células cancerígenas do ovário. Vários investigadores reportaram a perda de expressão de RE $\beta$  ou a diminuição do ratio RE $\alpha$ /RE $\beta$  nas células do cancro ovárico epitelial, comparado com o tecido normal. A perda da expressão do RE $\beta$  poderá constituir um passo crucial na carcinogénese do ovário.

Lurie *et al.* (2008) avaliaram a associação entre polimorfismos do *ESR2* (rs1271572, rs1256030, rs1256031 e rs3020450) e o risco de cancro do ovário, em 313 mulheres com cancro ovárico epitelial e 574 controlos, nos Estados Unidos da América. Neste estudo foi demonstrada a associação entre os alelos variantes dos polimorfismos rs1271572 e rs1256030, bem como o haplotipo incluindo os alelos variantes de rs1271572, rs1256030 e rs1256031 (em forte desequilíbrio de ligação) e o aumento de risco de cancro epitelial do ovário. A associação entre rs1271572, e em menor grau rs1256030, com o risco de cancro do ovário, foi superior entre mulheres que nunca utilizaram contracepção oral. Em contraste, a associação entre rs1271572 e risco de cancro do ovário parece ser mais forte entre utilizadoras de terapia hormonal de substituição, apesar desta associação não ser estatisticamente significativa.

## VII. CONCLUSÕES

A associação entre variações genéticas nos receptores dos estrogénios e doença tem sido reconhecida há mais de uma década. Avanços tecnológicos em biologia molecular vieram dar ênfase ao estudo de polimorfismos moleculares e à sua influência na susceptibilidade e apresentação clínica de doenças (Tempfer *et al.*, 2009). Tem sido proposto que variações genéticas nos genes envolvidos na via dos estrogénios possam causar sensibilidade variável à hormona e ser responsáveis por fenótipos dependentes dos estrogénios. Nesta perspectiva, têm sido analisadas variações genéticas nos genes dos RE, e foram identificados vários polimorfismos, quer nos genes do RE $\alpha$  como do RE $\beta$ , com graus variáveis de evidência da sua significância biológica directa e da sua relação com a presença de doença.

A literatura publicada e revista neste trabalho, não é unânime quanto à existência de associação entre polimorfismos e doenças ginecológicas, como leiomioma e endometriose, ou a parâmetros clínicos como idade da menarca, idade da menopausa ou resposta a estimulação ovárica em técnicas de reprodução medicamente assistida, sendo os resultados apresentados, por vezes, contraditórios. Comparando artigos em que se afirma a existência de uma associação, o grau de evidência desta relação e o seu significado clínico, é igualmente variável.

Uma justificação para esta falta de resultados consistentes poderá passar pela diferente distribuição dos vários polimorfismos em diferentes populações e raças, uma vez que a variação étnica tem um papel na regulação genética dos estrogénios e na própria actividade do RE (Hsieh *et al.*, 2007). Ainda, os alelos mutantes destes dois SNPs podem estar a servir como marcadores de uma alteração funcional num gene próximo (Hsieh *et al.*, 2007).

Torna-se claro que, apesar da inegável aparente associação existente entre variações genéticas dos receptores de estrogénios e características clínicas de mulheres saudáveis ou portadoras de doença ginecológica, mais estudos serão necessários para clarificar esta associação.

A clarificação da etiologia genética destas doenças ou da influência destes polimorfismos em parâmetros clínicos, pode tornar estes polimorfismos importantes como marcadores de susceptibilidade, permitindo a identificação de indivíduos em risco e no futuro, permitir o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas (Tempfer *et al.*, 2009).

## **VIII. LISTA DE ABREVIATURAS**

AFS: American Fertility Society (Sociedade Americana de Fertilidade).

E2: Estradiol

FIV: Fertilização *in vitro*.

FMR1: gene de Fragile X Mental Retardation 1.

FOP: Falência Ovária Prematura.

FSH: Follicle Stimulating Hormone (Hormona Folículo Estimulante).

FSHR: Receptor da Hormona Folículo Estimulante.

LH: Luteinizing Hormone (Hormona Luteinizante).

RA: Receptor de Androgénios

RE-: Cancro da mama negativo para receptor de estrogénio.

RE: Receptor dos estrogénios.

RE+: Cancro da mama positivo para receptor de estrogénio.

RE- $\alpha$ : Receptor dos estrogénios alfa.

RE- $\beta$ : Receptor dos estrogénios beta.

RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de fragmentos de Restrição de DNA).

SHGB: Sex Hormone-binding Globulin (Globulina de transporte das hormonas sexuais).

SOP: Síndrome do Ovário Poliquístico.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de um único nucleotídeo).

## **IX. BIBLIOGRAFIA**

**Aléssio** AM, Siqueira LH, Couto de Carvalho EC, Barini R, Mansur Ade P, Hoehr NF, Annichino-Bizzacchi JM (2008). Estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms are not risk factors for recurrent miscarriage in a Brazilian population. *Clin Appl Thromb Hemost*; 14(2): 180-185.

**Altmae** S, Haller K, Peters M, Hovatta O, Stavreus-Evers A, Karro H, Metspalu A, Salumets A (2007). Allelic estrogen receptor 1 (ESR1) gene variants predict the outcome of ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod*; 13: 521-526.

**Ashton** KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, Gilbert M, Hamann U, Scott RJ (2009). Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. *BJOG*; 116(8): 1053-61.

**Bretherick** KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP (2008). Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*; 89(2): 318-24.

**Cai** Q, Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng JR, Gao YT, Zheng W (2003). Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*; 12: 853-859.

**Corbo** RM, Ulizzi L, Piombo L, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Scacchi R (2007). Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns. *Mol Hum Reprod*; 13(8): 537-40.

**Cupisti S**, Fasching PA, Ekici AB, Strissel PL, Loehberg CR, Strick R, Engel J, Dittrich R, Beckmann MW, Goecke TW (2008). Polymorphisms in estrogen metabolism and estrogen pathway genes and the risk of miscarriage. *Arch Gynecol Obstet.*; 280(3): 395-400.

**Deroo BJ**, Korach KS (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*; 116:561-570.

**Einarsdóttir K**, Darabi H, Li Y, Low YL, Li YQ, Bonnard C, Sjölander A, Czene K, Wedrén S, Liu ET, Hall P, Humphreys K, Liu J (2008). ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival. *Breast Cancer Res*, 10(1): R15.

**El-Gindi E**, El-Adawy AR, Faris M, El-Moghazy D, El-Hamshary M (2002). Genetic polymorphism in endometriosis among infertile Egyptian women. *Middle East Fert Soc J*; 7: 44-47.

**Fernández LP**, Milne RL, Barroso E, Cuadros M, Arias JI, Ruibal A, Benítez J, Ribas G (2006). Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer*, 119(2): 467-71.

**Galan JJ**, Buch B, Cruz N, Segura A, Moron FJ, Bassas L, Martinez-Pineiro L, Real LM, Ruiz A (2005). Multilocus analyses of estrogen-related genes reveal involvement of the ESR1 gene in male infertility and the polygenic nature of the pathology. *Fertil Steril.*; 84(4): 910-8.

**Georgiou I**, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis IE, Lolis DE (1997). Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*; 12: 1430-1433.

**Govindan S**, Shaik NA, Vedicherla B, Kodati V, Rao KP, Hasan Q (2009). Estrogen receptor-alpha gene (T/C) Pvu II polymorphism in endometriosis and uterine fibroids. *Dis Markers*; 26(4): 149-54.

**Hamaguchi M**, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Fujii Y, Yamashita H (2008). Possible difference in frequencies of genetic polymorphisms of estrogen receptor alpha, estrogen metabolism and P53 genes between estrogen receptor-positive and -negative breast cancers. *Jpn J Clin Oncol*, 38(11): 734-42.

**Herynk MH**, Fuqua SA (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*; 25: 869-898.

**Hsiao WC**, Young KC, Lin SL, Lin PW (2004). Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res*, R180-6.

**Hsieh YY**, Wang YK, Chang CC, Lin CS (2007). Estrogen receptor  $\alpha$ -351 XbaI\*G and -397 PvuII\*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomioma. *Mol Hum Reprod*; 13: 117-122.

**Kitawaki J**, Obayashi H, Ishihara H, Koshiha H, Kusuki I, Kado N, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Honjo H (2001). Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod* ; 16: 51-55.

**Kukuvitis A**, Georgiou I, Bouba I, Tsirka A, Giannouli CH, Yapijakis C, Tarlatzis B, Bontis J, Lolis D, Sofikitis N, Papadimas J (2002). Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *Int J Androl*; 25: 149-152.

**Luisi S**, Galleri L, Marini F, Ambrosini G, Brandi ML, Petraglia F. Estrogen receptor gene polymorphisms are associated with recurrence of endometriosis (2006). *Fertil Steril.*; 85(3): 764-6.

**Lurie G**, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT (2009). Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control*; 20(1): 47-55.

**Maguire P**, Margolin S, Skoglund J, Sun XF, Gustafsson JA, Børresen-Dale AL, Lindblom A (2005). Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in familial and sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 94(2): 145-52.

**Montgomery GW**, Nyholt DR, Zhao ZZ, Treloar SA, Painter JN, Missmer SA, Kennedy SH, Zondervan KT (2008). The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update*; 14(5): 447-57.

**Murphy L**, Cherlet T, Lewis A, Banu Y, Watson P (2003). New insights into estrogen receptor function in human breast cancer. *Ann Med*, 35(8):614-31.

**Renner SP**, Strick R, Oppelt P, Fasching PA, Engel S, Baumann R, Beckmann MW, Strissel PL (2006). Evaluation of clinical parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for patients with endometriosis. *Reproduction* ; 131: 153-161.

**Sasaki M**, Tanaka Y, Kaneuchi M, Sakuragi N, Dahiya R (2002). Polymorphisms of estrogen receptor alpha gene in endometrial cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 297: 558-64.

**Setiawan VW**, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter D, De Vivo I (2004). Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms and endometrial cancer (United States). *Cancer Causes Control*, 15: 627-33.

**Siddig A**, Mohamed AO, Awad S, Hassan AH, Zilahi E, Al-Haj M, Bernsen R, Adem A (2008). Estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphism and breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1138: 95-107.

**Sowers MR**, Jannausch ML, McConnell DS, Kardia SR, Randolph JF Jr (2006). Menstrual cycle markers of ovarian aging and sex steroid hormone genotypes. *Am J Med*; 119: S31-S43.

**Stavrou I**, Zois C, Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Tsatsoulis A (2006). Combined estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod*; 21 (2), 554-557.

**Stavrou I**, Zois C, Ioannidis JPA and Tsatsoulis A (2002). Association of polymorphisms of the estrogen receptor  $\alpha$  gene with the age of menarche. *Hum Reprod*; 17: 1101-1105.

**Sundarrajan C**, Liao W, Roy AC, Ng SC (1999). Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod*; 5: 797-802.

**Sundarrajan C**, Liao WX, Roy AC, Ng SC (2001). Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab*; 86:135-139.

**Surekha D**, Sailaja K, Rao DN, Raghunadharao D, Vishnupriya S (2009). Oestrogen receptor beta (ERbeta) polymorphism and its influence on breast cancer risk. *J Genet*, 88(2): 261-6.

**Syrrou M**, Georgiou I, Patsalis PC, Bouba I, Adonakis G, Pagoulatos GN (1999). Fragile X premutations and (TA)<sub>n</sub> estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction. *Am J Med Genet*; 84(3): 306-8.

**Tempfer CB**, Simoni M, Destenaves B, Fauser BC (2009). Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update*; 15(1): 97-118.

**Vasconcelos A**, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, Azevedo C, Lopes CS (2002). Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J*,8(4): 226-9.

**Villanova FE**, Andrade PM, Otsuka AY, Gomes MT, Leal ES, Castro RA, Girão MJ, Nishimura E, Baracat EC, Silva ID (2006). Estrogen receptor alpha polymorphism and susceptibility to uterine leiomyoma. *Steroids.*; 71(11-12): 960-5.

**Wang Z**, Yoshida S, Negoro K, Kennedy S, Barlow D, Maruo T (2004). Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene but not estrogen receptor alpha gene affect the risk of developing endometriosis in a Japanese population. *Fertil Steril.*; 81(6): 1650-6.

**Wedrén S**, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvänen AC, Kindmark A, Landegren U, Fermér ML, Stiger F, Persson I, Baron JA, Weiderpass E (2008). Estrogen receptor alpha gene polymorphism and endometrial cancer risk--a case-control study. *BMC Cancer*; 8: 322.

**Weel AE**, Uitterlinden AG, Westendorp IC, Burger H, Schuit SC, Hofman A, Helmerhorst TJ, van Leeuwen JP, Pols HA (1999). Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**: 3146-3150.

**Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedren S, Kindmark A, Baron J (2000).** Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis*, 21: 623-7.

**Zhai XD, Ye Y, Yang Y, Wang Z, Mo YN (2009).** No Association between Estrogen Receptor Beta (ESR2) Polymorphisms and Uterine Leiomyoma. *DNA cell Biol.* [Epub ahead of print].