

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DÉBORA CZARNABAY

**EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ADAMTS-1 EM TECIDOS DE
LEIOMIOMA UTERINO E MIOMÉTRIO**

Porto Alegre
MAIO/2014

DÉBORA CZARNABAY

**EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ADAMTS-1 EM TECIDOS DE
LEIOMIOMA UTERINO E MIOMÉTRIO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Orientador: Prof^a. Dra Ilma Simoni
Brum da Silva
Co-orientadora: Me. Gabriela Sant'Anna

Porto Alegre

MAIO/2014

Dedico à minha mãe querida, ao meu pai Jorge Czarnabay (in memoriam) e à minha avó Beliza Camargo Leib (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre meu caminho.

À minha família, por acreditar em mim independente do que aconteça.

Aos meus amigos, por me apoiarem sempre e por entenderem todas as minhas faltas.

À minha orientadora, Prof^a Ilma Simoni Brum, por seus ensinamentos, paciência e confiança ao longo das atividades.

À minha co-orientadora, Gabriela dos Santos Sant'Anna, por seu apoio, força, companhia e ensinamentos tanto nos momentos de adversidade quanto nos de sucesso.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, sempre me apoiando e me dando força para continuar.

À Amanda e Thais, por estarem ao meu lado e entenderem cada momento de sentimentos tão contraditórios.

RESUMO

Os leiomiomas uterinos são tumores benignos, ricos em matriz extracelular, derivados de miócitos e originados de uma única célula de músculo liso. Os miomas são dependentes de hormônios esteróides sexuais; raramente aparecem antes da menarca e geralmente sofrem involução após a menopausa, intensificando a relação do hormônio com o crescimento do tumor. A família ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteinases com motivos trombospondina) é um grupo de proteinases formadas por seis domínios, identificadas em mamíferos e invertebrados. Estudos demonstram que ADAMTS-1 parece ter um importante papel na tumorigênese e na ligação com o receptor de progesterona, dessa maneira o objetivo desse trabalho é verificar a expressão gênica do ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e miométrio de 15 pacientes submetidas à cirurgia de histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Resultados:** Os resultados apresentaram distribuição não paramétrica. Os valores expressos em mediana (percentil 25-75) nos tecidos de miométrio foram 0,9399 (0,4775-1,8738) e nos tecidos de leiomioma foram 0,6934 (0,4041-1,3071). O erro padrão encontrado foi de 0,39608. **Conclusão:** os dados encontrados não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o tecido de leiomioma uterino e miométrio. Embora não tenhamos observado diferenças significativas na amostra estudada, a expressão gênica alterada do ADAMTS-1 tem sido descrita em diferentes tipos de tumores, evidenciando a necessidade de futuras pesquisas.

Palavras-chave: *Leiomioma uterino; Progesterona; ADAMTS-1.*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 4 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 6 |
| 1.INTRODUÇÃO | 7 |
| 1.1 LEIOMIOMA | 7 |
| 1.1.1 Epidemiologia | 7 |
| 1.1.2 Fisiopatologia | 8 |
| 1.1.3 Classificação dos leiomiomas uterinos | 11 |
| 1.1.4 Diagnóstico | 14 |
| 1.1.5 Progesterona e Estrogênio no crescimento do Leiomioma | 15 |
| 1.2 FAMÍLIA ADAMTS | 16 |
| 1.3 ADAMTS-1 | 20 |
| 2. OBJETIVO | 24 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO | 25 |
| 4.CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| ANEXOS | 43 |
| Anexo I | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADAM – *A Disintegrin And Metalloproteinase*
- ADAMTS – *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*
- CDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ECM – Matriz extracelular
- EGF - Fator de crescimento epidérmico
- ER α - Receptor de Estrogênio alfa
- EUA – Estados Unidos da América
- GH – Hormônio do crescimento
- GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
- IGF-I - Fator de crescimento insulínico
- Ki67 – Proteína marcadora de proliferação celular (**Kiel**, Alemanha – 67)
- mRNA – RNA mensageiro
- PCR – Reação em cadeia de polimerase
- PR – Receptor de Progesterona
- PRL - Prolactina
- RNA – ácido ribonucleico
- TGF- β - Fator de crescimento transformante β
- TSR - motivo trombospondina-1
- USA – United States of America
- β -FGF – Fator de crescimento básico do fibroblasto

1 .INTRODUÇÃO

1.1 LEIOMIOMA

Epidemiologia

Os leiomiomas uterinos são os tumores pélvicos sólidos mais comuns no trato genital feminino. O termo *fibroma* foi introduzido por Karl Von Rokitansky em 1860 e em seguida modificado por Vichow para *leiomioma* devido a sua derivação da musculatura lisa. Comumente chamados de mioma uterino, são observados em 70% das mulheres, apresentando sintomas em apenas 30% das mulheres acima de 30 anos (VITIELLO D, MCCARTHY S, 2006). Diversos estudos realizados nos EUA têm sugerido que 70% a 80% das mulheres entre 40 e 50 anos apresentam leiomioma uterino, entretanto mais da metade não é diagnosticado, pois em alguns casos, a doença é assintomática. (BOCLIN K.L.S., FAERSTEIN E, 2013). Nesse estudo foram destacadas maiores frequências do leiomioma uterino em mulheres negras, menarca precoce, idade entre 40 e 50 anos, índice de massa corporal, peso e índice de gordura elevados. Mulheres que são expostas a fatores associados ao aumento de hormônios ovarianos, como estrogênio e progesterona, também são incluídas na população de risco (BOCLIN K.L.S, FAERSTEIN E, 2013; ANDRADE A.M.; FRANCISCO O, 2010). Foram realizadas nos EUA mais de um milhão de histerectomias entre os anos de 2001 a 2005, sendo esta a opção primária de tratamento para leiomiomas sintomáticos (ISHIKAWA et al, 2010).

Contraditoriamente aos estudos realizados nos EUA, as pesquisas realizadas em países do continente europeu demonstraram uma frequência

muito menor de leiomioma uterino nas mulheres. Na Itália, foram diagnosticados leiomiomas uterinos em 21,4% das participantes da pesquisa entre 30 e 60 anos (n=341) (MARINO et al, 2004). Já na Alemanha, somente 10,7% dos leiomiomas foram detectados em estudo (n=10.241) com mulheres com idade inferior a 65 anos (HEINEMANN Ket al, 2003).

Estudos realizados no Brasil ainda não fornecem dados suficientes para o cálculo de prevalência e do real número de casos de mioma uterino entre as mulheres. Há a necessidade de um maior investimento em pesquisa na área, proporcionando tratamentos mais adequados.

Fisiopatologia

Os leiomiomas são tumores benignos, ricos em matriz extracelular, derivados de miócitos e originados de uma única célula de músculo liso. Existem duas fases bem distintas de desenvolvimento do tumor: fase de transformação e fase de proliferação. Na fase de transformação ocorre a mudança de uma célula normal para uma célula anormal. Já na fase de proliferação, ocorre o crescimento dessas células anormais. Os miomas são dependentes de hormônios esteróides sexuais, raramente aparecem antes da menarca e geralmente sofrem involução após a menopausa, intensificando a relação do hormônio com o crescimento do tumor. Assim como o estrogênio, a progesterona e o Hormônio do Crescimento (GH) parecem também atuar no crescimento e manutenção do leiomioma (SILVA et al, 2005; GRIFFITHS A, D'ANGELO A, AMSO N, 2003).

A primeira fase no desenvolvimento de um leiomioma é a ocorrência de mutação de um miócito. Uma vez produzida essa mutação, a fase seguinte é de crescimento do miócito a partir de fatores de crescimento, angiogênese e fatores hormonais (GILA MR, PARRA JF, PAREDES AG, 2011).

Os principais fatores que influenciam seu crescimento são:

- Hormônios esteroides ovarianos – o estrogênio e a progesterona têm papel importante no crescimento dos leiomiomas. Esse crescimento só ocorre na fase reprodutiva e torna-se diminuído no estado hipoestrogênico tal como na menopausa ou durante tratamento com agonistas do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). Durante a fase lútea do ciclo ovariano, ocorre um aumento da produção de fatores de crescimento e de seus receptores devido ao aumento da atividade mitótica dos miomas, diferentemente do que ocorre na fase folicular, onde estão em repouso (GILA MR, PARRA JF, PAREDES AG, 2011).
- Fatores de crescimento – para que ocorra crescimento do leiomioma há necessidade da associação de fatores de crescimento com hormônios. Os principais fatores de crescimento associados à proliferação celular são: EGF (Fator de crescimento epidérmico), IGF-I (Fator de crescimento insulínico tipo I), PRL (Prolactina), β -FGF (Fator de crescimento básico do fibroblasto), TGF- β (Fator de crescimento transformante β). O papel completo desses fatores de crescimento ainda está sendo estudado (SOZEN e ARICI , 2006).

- Fatores genéticos – foram identificadas alterações citogenéticas heterogêneas em 40% dos casos de leiomiomas uterinos. Essas alterações podem ser translacionais, deleções ou inversões (LIGON, 2001).
- Vascularização do leiomioma: devido a vascularização alterada no leiomioma, os miomas de tamanho pequeno têm uma densa rede de vasos. Essa densa rede cresce e penetra no tecido fibroso, porém não consegue alcançar a mesma densidade vascular do miométrio. Um estudo realizado sugere que o mecanismo se dá através de diferentes concentrações de fatores angiogênicos promotores e inibidores que estão presentes (Figura 1) (GILA MR, PARRA JF, PAREDES AG, 2011).

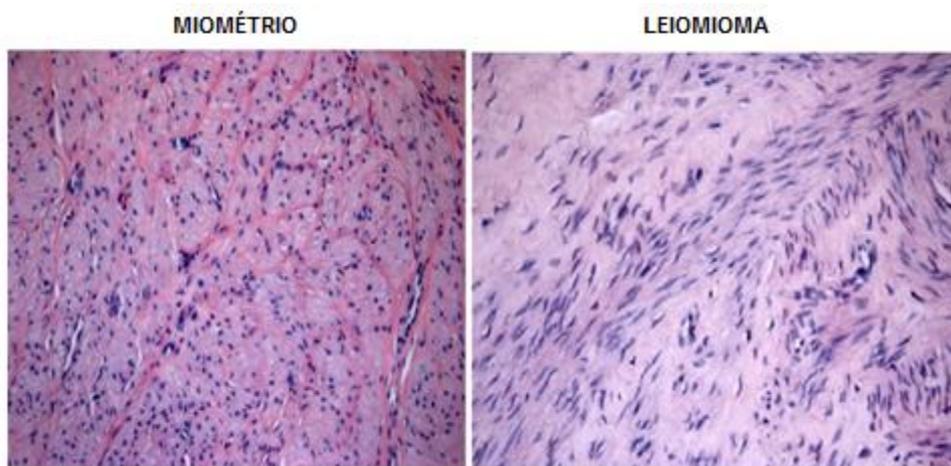


Figura 1: Miométrio (à esquerda) e Leiomioma (à direita). O miométrio apresenta feixes organizados de células musculares lisas com uma abundante vasculatura específica. O leiomioma é composto por células musculares desorganizadas (em arranjo estoriforme) e padrões em espiral com abundante colágeno extracelular, densidade vascular reduzida em comparação com miométrio. (Adaptado para o português: KIM JJ, KURITA T, 2013)

Classificação dos Leiomiomas uterinos

Os leiomiomas são classificados em subgrupos de acordo com a sua posição e relação com as camadas uterinas como intramural submucoso ou subseroso.

Intramural

Os miomas intramurais são os mais comumente encontrados e a maioria se origina intersticialmente, dentro da parede do miométrio (Figura 2). São bem demarcados devido a compressão do miométrio e posterior criação de uma pseudocápsula. A classificação dos leiomiomas pode ser alterada para subseroso ou submucoso, se ocorrer o crescimento da massa tumoral em direção a outra camada uterina (KATZ et al, 2007; SCHMALL, 2000).

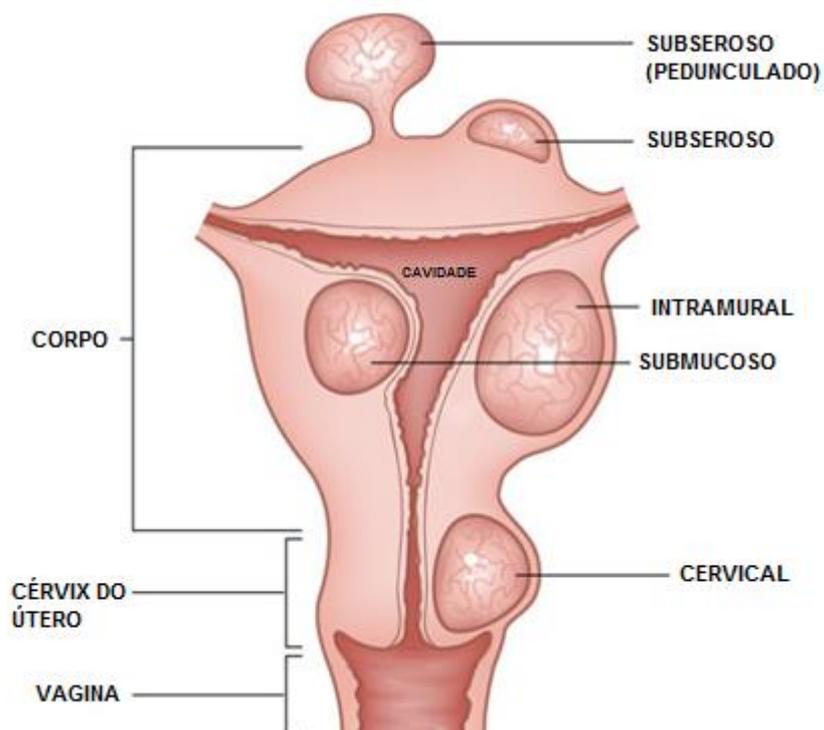


Figura 2: Representação da classificação dos miomas. Intramural, Submucoso e Subseroso. (Adaptado para o português: UNC Medical Illustration and Photography)

Submucoso

A classificação do mioma submucoso se dá devido a sua proximidade com o endométrio. Seu diagnóstico é raramente efetuado durante o exame manual. São clinicamente mais incômodos, causando sintomas como menorragia e infertilidade devido a sua projeção e distorção do endométrio. Os submucosos podem ocasionalmente se tornar pedunculados ou prolapsar em direção ao canal cervical ou vaginal (WILDE et al, 2009). Um mioma submucoso pedunculado pode ocasionar risco pela possibilidade de torção, infecção ou necrose pelo suprimento sanguíneo insuficiente. A extensão do

mioma para a cavidade uterina pode ser classificada segundo sua profundidade de protusão (MCLUCAS, 2008)

A Sociedade Europeia de Histerectomia (ou conforme classificação de Wamsteker) classifica o mioma submucoso em três subtipos: T0, T1, T2 (MCLUCAS, 2007).

T 0 - são massas submucosas pedunculadas localizadas inteiramente dentro da cavidade uterina.

T1 - miomas sésseis com menos de 50% da massa no miométrio, ou mais de 50% na cavidade uterina.

T II - os miomas tem mais do que 50% da massa dentro do miométrio (Figura 3)

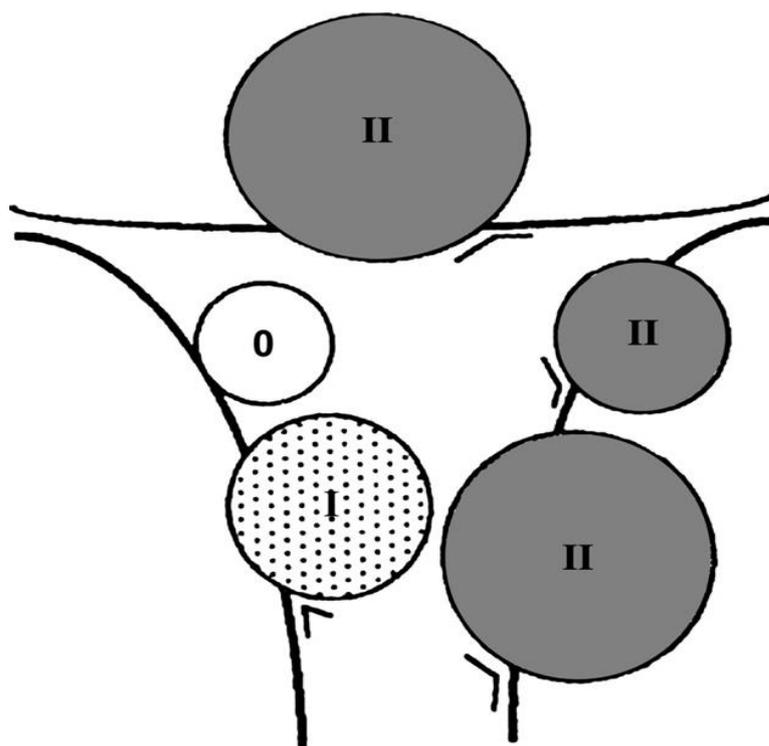


Figura 3: Classificação do mioma submucoso. Tipo 0; Tipo I; Tipo II. (Adaptado: MCLUCAS, 2008)

Subseroso

Miomas subserosos estão localizados logo abaixo do peritônio, cobrindo o corpo uterino. Podem se tornar pedunculados, crescendo para o interior da cavidade peritoneal, fazendo pressão sobre a bexiga ou intestino com risco de torção e necrose (KATZ et al, 2007).

Alguns miomas subserosos que formam uma extensão para a cavidade peritoneal podem ser descritos como parasitários ou como ligamentosos. A miomatose chamada parasitária supera o suprimento sanguíneo do útero, necessitando recrutar um suprimento vascular de outro órgão do omento. Já os miomas ligamentosos estendem-se lateralmente a partir do útero e podem ser confundidos com massas anexas (KHO e NEZHAT, 2009).

Diagnóstico

O diagnóstico se baseia em um conjunto de critérios que incluem a história da paciente, antecedentes e intercorrências, exame físico e ginecológico. Os sintomas do leiomioma podem mimetizar inúmeras patologias pélvicas, dessa maneira os métodos de diagnóstico imagenológicos são de extrema importância (FEBRASGO, 2004).

Inicialmente, a avaliação do possível mioma ocorre através da ecografia pélvica. Utiliza-se o exame de histerossonografia para complementar a ecografia quando o mioma é submucoso, permitindo a diferenciação do endométrio delineando a cavidade uterina e as camadas do

miométrio. Também é utilizada a ecografia com *doppler*, permitindo avaliar a vascularização do mioma (FEBRASGO, 2004). Já a Ressonância Nuclear Magnética Pélvica faz uma avaliação detalhada dos nódulos do leiomioma no útero, permitindo o planejamento cirúrgico e a visualização de malformações uterinas associadas ao mioma (BAZOT et al, 2002).

Exames laboratoriais complementares também podem auxiliar no diagnóstico tais como: hemograma completo, coagulograma e exames bioquímicos na urina (FEBRASGO, 2004).

Progesterona e Estrogênio no crescimento do leiomioma

O desenvolvimento do leiomioma uterino é altamente dependente dos hormônios esteróides ovarianos. O estrogênio, considerado um fator mitogênico primário, promove o crescimento de células fibróides, já a progesterona tem ambos os papéis, tanto inibição do crescimento quanto estimulação, dependendo das condições da célula. Estudo realizado por Ishikawa sugere que a progesterona e o Receptor de Progesterona (PR) parecem ter um papel tão importante quanto o estrogênio no crescimento e desenvolvimento do tumor, embora evidências experimentais obtidas de cultura celular *in vitro* e modelos animais enfatizem a maior importância somente do estrogênio (ISHIKAWA et al, 2010).

Durante a fase secretora/lútea do ciclo ovariano, na qual a progesterona é dominante, alguns marcadores de proliferação celular como o Ki67 e antígenos nucleares de proliferação celular estão aumentados. Além disso, o fator de crescimento epidermal também se encontra

aumentado no leiomioma somente na fase lútea, o que sugere uma dependência da progesterona (KIM e KURITA, 2013). Sendo assim, a progesterona, e não o estrogênio teria um papel mitogênico importante para o crescimento do tumor, visto que os índices de proliferação dos miomas aumentam extremamente quando a progesterona é combinada com estrogênio, diferentemente do que ocorre com o estrogênio isolado (LAMMINEN S, 1992).

As células do tecido de leiomioma uterino são incorporadas nas camadas de Matriz Extracelular (ECM), indicando a existência de influências nas funções celulares. Durante a proliferação celular do leiomioma em resposta ao estrogênio combinado com progesterona, ocorre uma co-expressão de Ki67 (Marcador de Proliferação Celular Ki67) juntamente com Receptor de Estrogênio alfa ($ER\alpha$) e Receptor de Progesterona (PR), crescimento do tumor via acumulação de ECM, sugerindo que tanto o estradiol quanto a progesterona podem estimular diretamente a proliferação das células fibróides. Portanto, os leiomiomas podem aumentar seu tamanho, sob o controle da progesterona com papel permissivo do estrogênio, através da acumulação de ECM, proliferação e hipertrofia celular (KIM e KURITA, 2013).

1.2 Família ADAMTS

A modificação proteolítica de algumas proteínas de superfície celular e matrizes extracelulares é um importante passo para a ocorrência de um conjunto de processos biológicos, patológicos, embriogênese, metástase do

câncer e processo de cicatrização Uma família de proteínas desintegrina e metaloproteinase (ADAM) aparece como elemento fundamental para esses processos (SHINDO T *et al*, 2000).

Existe mais de 20 proteínas identificadas como membros da família ADAM. São caracterizadas por serem proteinases transmembrânicas de estrutura modular, exibindo domínios catalíticos, desintegrina, rico em cisteínas, Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de crescimento transmembrânico e citoplasmático. Dentre essas proteínas, a fertilina-alfa e fertilina-beta foram as primeiras descritas (ADAM 1 e 2, respectivamente), as quais estão envolvidas na fertilização do óvulo pelo espermatozóide e fusão de suas membranas. A ADAM 3 também está envolvida no processo de fertilização, estando presente na superfície da membrana dos espermatozoides, assim como as ADAMs 5 e 7 (SHINDO T *et al*, 2000; APTE SS, 2009).

As ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteinases com motivos Trombospondina) são um grupo de proteinases formadas por seis domínios, identificadas em mamíferos e invertebrados. A comparação do conjunto humano das ADAMTS com os invertebrados sugere que pelo menos cinco subtipos de ADAMTS surgiram no início da evolução deuterostomia. Essas proteinases estão intimamente relacionadas com a família ADAM, entretanto, ao contrário das ADAM que são proteínas transmembrânicas, as ADAMTS são proteínas de secreção e algumas se ligam à matriz extracelular (SEALS DF, 2003; APTE SS, 2009).

Organização estrutural

A organização da estrutura das ADAMTS se dá a partir de um domínio metaloprotease, homólogo à região metaloprotease das ADAM, que é ligado a um domínio não-enzimático com uma estrutura altamente conservada e que contém pelo menos um motivo trombospondina-1 (TSP), característico das proteínas de matriz extracelular. Após a secreção das ADAMTS, os motivos trombospondina são importantes mediadores da sua ligação aos componentes da matriz extracelular como, por exemplo, a heparina e sulfato de heparano (PORTER et al, 2005; JONES e RILEY, 2005).

As ADAMTS são formadas por módulos, domínios e motivos (Figura 4) que se distribuem da seguinte maneira a partir do N-terminal para o C-terminal (JONES e RILEY, 2005):

- Pró-domínio: formado por 220 a 300 aminoácidos, contém 1 a 3 resíduos de cisteína e pelo menos um motivo de consenso de clivagem da furina. Os precursores inativos das ADAMTS (zimogênios) são clivados intracelularmente, ocorrendo no ponto de clivagem da furina mais próximo do C-terminal.
- Domínio catalítico: contém a sequência de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH e o zinco catalítico é coordenado pelos três resíduos de histidina. Esse domínio possui um alto grau de homologia entre os diferentes tipos de ADAMTS.
- Domínio semelhante a desintegrina: formado por 60 a 90 aminoácidos

- TS (Trombospondina) repetido (TSR): o TSR central é bastante similar em todas as ADAMTS e é formado por 48 a 54 aminoácidos.
- Domínio rico em cisteína: contém 10 resíduos de cisteína e encontra-se bem conservado entre as ADAMTS.
- O espaço: é o domínio com menos homologia. Formado por domínio de tamanho variável, pode ser dividido em metade N-terminal em que aminoácidos hidrofóbicos se mantêm conservados e metade C-terminal, onde seu tamanho é variável.
- Um ou mais TSRs C-terminal: sua sequência é extremamente variável e podem conter um motivo BBXB, o qual liga a heparina ou um motivo CVSTCG, ligando o receptor de superfície celular CD36.
- Módulos C-terminal: foram encontrados a jusante dos TSR de algumas ADAMTS quatro tipos de módulos C-terminal. Nos ADAMTS 2, 3, 10, 14, 17 e 19 foi encontrado um domínio PLAC (Protease e Lacunina), no ADAMTS 13 um domínio CUB (Complemento C1r/C1s) e nos ADAMTS 9 e 20 foram encontrados um módulo no seu ortólogo GON-1, composto por 10 cisteínas (JONES e RILEY, 2005).

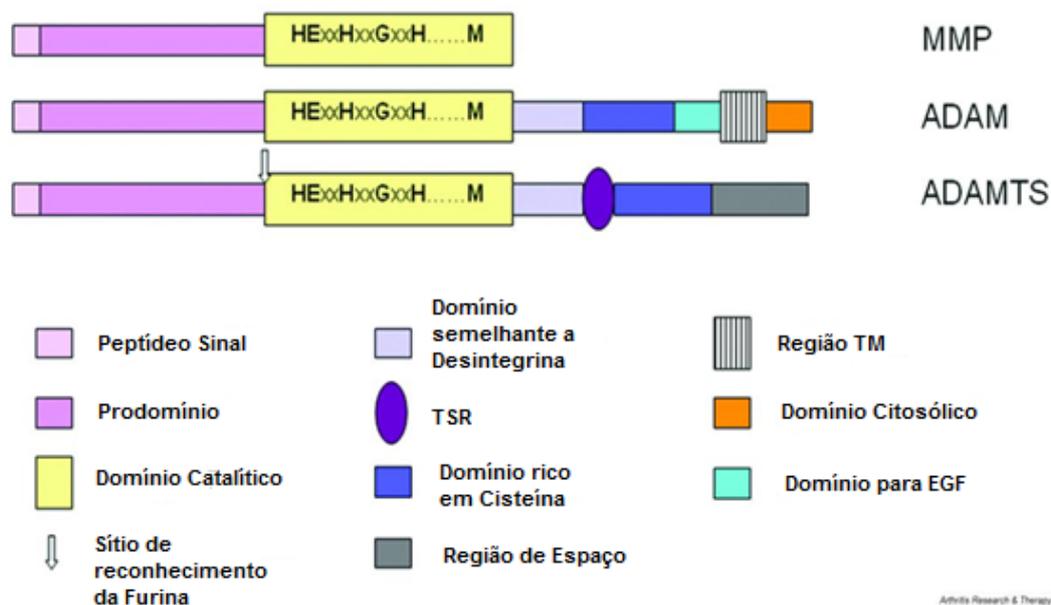


Figura 4: Representação da estrutura dos ADAMTS. (Adaptado para o português: JONES GC, 2005)

1.3 ADAMTS-1

Considerando uma típica ADAM que são as proteinases transmembrânicas e possuem domínios transmembrânicos na região C-terminal, as ADAMTS-1 não contêm esse domínio, pois possuem três tipos de motivos trombospondina I no seu C-terminal. Inicialmente, a ADAMTS-1 foi descrita como um mediador da inflamação, porém descobriu-se que atua na organogênese, formação de vasos sanguíneos e linfáticos, foliculogênese ovariana e ovulação. Nesses eventos fisiológicos, ocorre uma remodelação da matriz extracelular (ECM) através da degradação proteolítica de substratos-chave como a condroitina sulfatada, proteoglicanos e colágeno (APTE SS, 2009). Juntamente com as ADAMTS 4 e 5, a ADAMTS-1 é responsável pela degradação do *agrecano*, um dos maiores proteoglicanos de cartilagem e possivelmente associado com algumas formas de artrite

(TORTORELA et al, 2001). A ADAMTS-1 também tem papel importante na inibição da angiogênese através do seqüestro de estímulos proangiogênicos, fator de crescimento epitelial vascular (VEGF), impedindo sua ligação ao receptor. Seu papel durante a transformação tumorigênica tem demonstrado grande importância, assim como na desregulação da remodelação da matriz extracelular e da densidade vascular (TAN I et al, 2013).

A desregulação da ADAMTS-1 está ligada ao câncer de pulmão, próstata, mama e colorretal (RICCIARDELLI C et al, 2011; GUSTAVSSON H et al, 2008; CHOI JE et al, 2008; LIND GE et al, 2006), que são considerados os tipos mais comuns de neoplasias. Entretanto, a sua expressão gênica atua de forma contraditória, tanto aumentando como diminuindo a regulação, visto que possui atividade pró e antitumoral em comparação com tecidos saudáveis (TAN I et al, 2013).

Síntese e interações da ADAMTS-1

A chave das distinções da estrutura de cada ADAMTS parece estar no C-terminal. No ADAMTS-1, esta região consiste de três motivos de trombospondina 1 (tsp1) separados por um domínio de cisteína e uma região de espaço. A síntese da ADAMTS-1 começa como um pró-zimógeno que sofre uma glicosilação N-ligada seguida de tradução proteica. Sua excreção para a matriz extracelular requer a excisão dos pró-domínios por furinas endopeptidases. A região C-terminal da protease madura liga-se diretamente na matriz extracelular e se associa a outras proteínas (fibulina-1, TGF- β , proteoglicanos sulfatados) (TAN I et al, 2013). Além disso, a ADAMTS-1

catalisa a decomposição do colágeno tipo I, proteoglicanos estromais específicos como, por exemplo, *versicano*, *agrecano*, *sindecano-4* e proteínas da membrana basal (REHN AP et al, 2007; RUSSEL DL et al, 2003).

Receptor de progesterona e ADAMTS-1

O receptor de progesterona (PR) é um membro da superfamília de receptores nucleares e regula inúmeras funções nos tecidos reprodutivos, incluindo o útero, ovário e glândula mamária. O hormônio Luteinizante (LH) induz seletivamente o PR nas células murais da granulosa dos folículos pré-ovulatórios no ovário. No ovário, a ADAMTS-1 é seletivamente induzida pelo LH nas células da granulosa e células *cumulus*, ocorrendo um pico de mRNA (RNA mensageiro) e de sua produção protéica em torno de 8 a 12h depois da exposição dos ovários ao hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) (RICHARDS JS et al, 2002). Além disso, a transcrição do ADAMTS-1 aumenta após o pico de expressão do receptor de progesterona (PR), mas antes da ovulação. Dessa forma, a indução da ADAMTS-1 é drasticamente reduzida quando a síntese de progesterona é inibida. Essa metaloprotease tem papel importante na atividade ovariana PR-regulada que culmina na ruptura do folículo (RICHARDS JS, RUSSEL D, OCHSNER S, ESPEY L, 2002) (Figura 5).

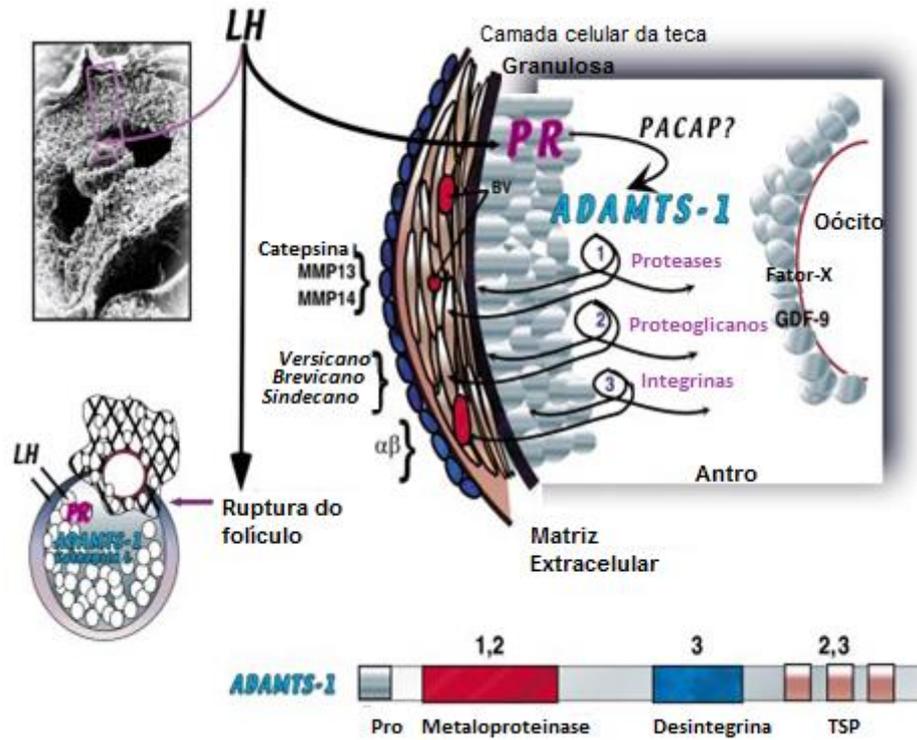


Figura 5: Potenciais sítios de ação da ADAMTS-1. Atua em proteínas específicas da ECM, alterando estrutura e função (Adaptado para o português: RICHARDS et al, 2002)

2. OBJETIVO

Verificar a expressão gênica do ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e tecido adjacente normal (miométrio).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O presente trabalho será apresentado nas normas da revista *Gene Expression*. Por apresentar resultados parciais, o texto está em português. As normas da revista se encontram disponíveis em <http://www.elsevier.com/journals/gene-expression-patterns/1567-133X/guide-for-authors>

EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ADAMTS-1 EM TECIDOS DE LEIOMIOMA UTERINO E MIOMÉTRIO

CZARNABAY D^{1,2}., SANT'ANNA GS^{1,2}, CORLETA H³, BRUM IS^{1,2}.

¹Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Sarmiento Leite, 500, prédio 12101- Porto Alegre -RS

²Departamento de Fisiologia , Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS

³Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350-Porto Alegre - RS

Autor correspondente:

Ilma Simoni Brum

Departamento de Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Sarmiento Leite, 500 Prédio 12101. CEP:

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail :ilma@ufrgs.br

Telefone: 51 33083559

Resumo

Os leiomiomas uterinos são tumores benignos, ricos em matriz extracelular, derivados de miócitos e originados de uma única célula de músculo liso. Os miomas são dependentes de hormônios esteroides sexuais; raramente aparecem antes da menarca e geralmente sofrem involução após a menopausa, intensificando a relação do hormônio com o crescimento do tumor. A família ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteinases com motivos trombospondina) é um grupo de proteinases formadas por seis domínios, identificadas em mamíferos e invertebrados. Estudos demonstram que ADAMTS-1 parece ter um importante papel na tumorigênese e na ligação com o receptor de progesterona, dessa maneira o objetivo desse trabalho é verificar a expressão gênica do ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e miométrio de 15 pacientes submetidas à cirurgia de histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Resultados:** Os resultados apresentaram distribuição não paramétrica. Os valores expressos em mediana (percentil 25-75) nos tecidos de miométrio foram 0,9399 (0,4775-1,8738) e nos tecidos de leiomioma foram 0,6934 (0,4041-1,3071). O erro padrão encontrado foi de 0,39608. **Conclusão:** os dados encontrados não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o tecido de leiomioma uterino e miométrio. Embora não tenhamos observado diferenças significativas na amostra estudada, a expressão gênica alterada do ADAMTS-1 tem sido descrita em diferentes tipos de tumores, evidenciando a necessidade de futuras pesquisas.

Palavras-chave: *Leiomioma uterino; Progesterona; ADAMTS-1.*

1. Introdução

Os leiomiomas uterinos são os tumores pélvicos sólidos mais comuns no trato genital feminino. O termo *fibroma* foi introduzido por Karl Von Rokitansky em 1860 e em seguida modificado por Vichow para *leiomioma* devido a sua derivação da musculatura lisa¹. Comumente chamados de mioma uterino, são observados em 70% das mulheres, apresentando sintomas em apenas 30% das mulheres acima de 30 anos¹. Foram destacadas maiores frequências das neoplasias em mulheres negras, menarca precoce, idade entre 40 e 50 anos, índice de massa corporal, peso e índice de gordura elevados. Mulheres que são expostas a fatores associados ao aumento de hormônios ovarianos, como estrogênio e progesterona, também são incluídas na população de risco^{2,3}.

Os miomas são tumores benignos, ricos em matriz extracelular, derivados de miócitos e originados de uma única célula de músculo liso. Existem duas fases bem distintas de desenvolvimento do tumor: fase de transformação e fase de proliferação. Na fase de transformação ocorre a mudança de uma célula normal para uma célula anormal. Já na fase de proliferação, ocorre o crescimento dessas células anormais. Os miomas são dependentes de estrogênio (hormônios ovarianos), raramente aparecem antes da menarca e geralmente sofrem involução após a menopausa, intensificando a relação do hormônio com o crescimento do tumor. Assim como o estrogênio, a progesterona e o GH também atuam no crescimento e manutenção do leiomioma^{4,5}. A progesterona e o Receptor de progesterona (PR) tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento do tumor, embora evidências experimentais obtidas de cultura celular *in vitro* e

modelos animais enfatizam a maior importância somente do estrogênio^{6, 7}. Durante a fase secretora/lútea do ciclo ovariano, na qual a progesterona é dominante, alguns marcadores de proliferação celular como o Ki67 e antígenos nucleares de proliferação celular estão aumentados⁸.

Os leiomiomas são classificados conforme sua localização, podendo ser intramurais, submucosos ou subserosos. Os intramurais estão localizados no interior da parede uterina, os submucosos são aqueles que provocam uma protusão na cavidade endometrial e os subserosos podem se apresentar suspensos por um pedículo, crescendo além da superfície (pediculados)^{9,10}.

As ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteinases com motivos Trombospondina) são um grupo de proteinases formadas por seis domínios, identificadas em mamíferos e invertebrados. Inicialmente, a ADAMTS-1 foi descrita como um mediador da inflamação, porém descobriu-se que atua na organogênese, formação de vasos sanguíneos e linfáticos, foliculogênese ovariana, ovulação, proliferação celular e é um dos alvos do PR. Nesses eventos fisiológicos, ocorre uma remodelação da matriz extracelular (ECM) através da degradação proteolítica de substratos-chave como a condroitina sulfatada, proteoglicanos e colágeno¹¹.

Considerando o papel da proteína ADAMTS-1 na tumorigênese e sua possível associação como receptor de progesterona, o objetivo deste trabalho é verificar a expressão gênica do ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e miométrio.

2.Resultados

As pacientes apresentavam média de idade de 44,8 anos (média calculada a partir de 12 pacientes, visto que três pacientes não possuíam esse dado no prontuário), possuíam diferentes classificações do mioma uterino e foram diagnosticadas em diferentes fases do desenvolvimento do leiomioma (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição das características das pacientes e quantificação das amostras.

| Paciente | Idade | Classificação do Mioma | Quantificação da expressão do Mioma | Quantificação da expressãoMiométrio |
|----------|---------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 55 anos | Intramural | 0,72 | 1,77 |
| 2 | 44 anos | - | 2,25 | 2,42 |
| 3 | 43 anos | Intramural | 1,31 | 1,61 |
| 4 | 47 anos | Intramural | 0,10 | 0,44 |
| 5 | 41 anos | Intramural | 5,38 | 0,66 |
| 6 | 43 anos | Subseroso | 1,48 | 2,50 |
| 7 | 50 anos | Intramural | 0,69 | 1,98 |
| 8 | 31 anos | Intramural | 1,31 | 0,78 |
| 9 | 46 anos | Intramural | 0,61 | 0,05 |
| 10 | 49 anos | Intramural | 0,49 | 0,20 |
| 11 | - | Intramural | 0,04 | 2,12 |
| 12 | 40 anos | Intramural | 0,56 | 0,94 |
| 13 | - | Subseroso | 0,32 | 0,51 |
| 14 | - | Subseroso | 1,19 | 1,05 |
| 15 | 49 anos | Intramural | 0,04 | 0,02 |

Tabela 1: Pacientes numeradas de 1 a 15; Idade das pacientes em anos; mioma intramural (desenvolve-se na espessura do endométrio), subseroso (recoberto pelo peritônio visceral); valores da quantificação da expressão do gene ADAMTS-1 no tecido de mioma e de miométrio; - dados não encontrados.

Para a análise de expressão gênica o teste de normalidade indicou variável de distribuição assimétrica (figura 1). Os valores expressos em

mediana (percentil 25-75) nos tecidos de miométrio foram 0,9399 (0,4775-1,8738) e nos tecidos de leiomioma foram 0,6934 (0,4041-1,3071).

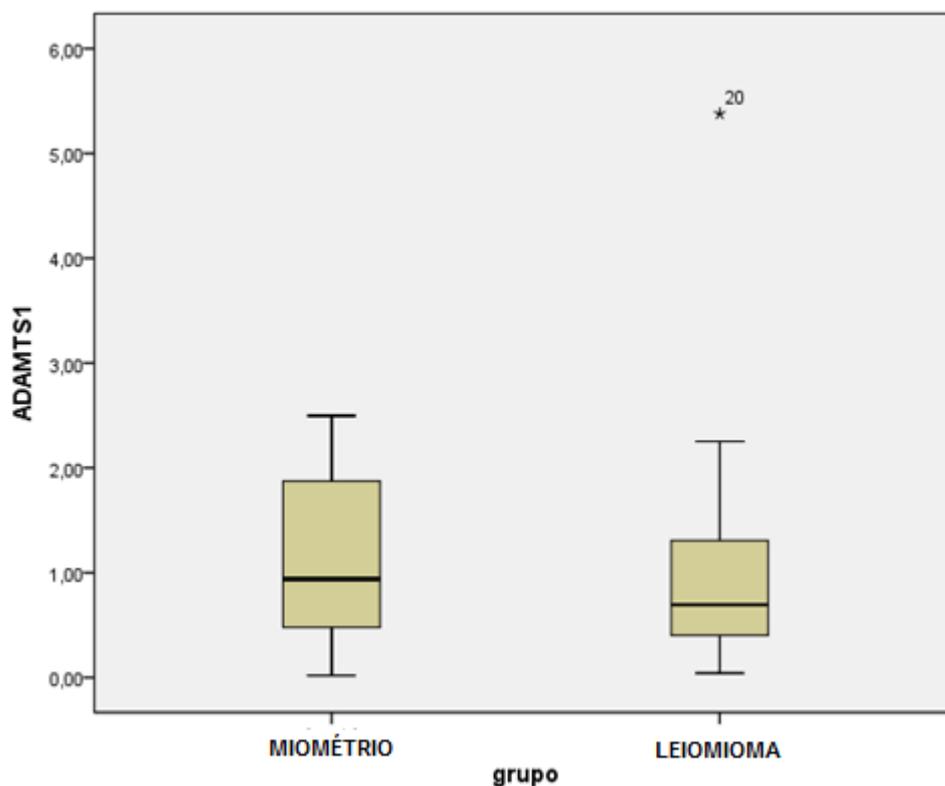


Figura 1: Gráfico de distribuição da expressão gênica do ADAMTS-1 em amostras de mioma uterino e miométrio (n=15 em cada grupo).

Tabela 2: Dados de Percentil 25-75

| | | | Percentis | | | | | | |
|------------------------------|---------|-----------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| | | Grupo | 5 | 10 | 25 | 50 | 75 | 90 | 95 |
| Média ponderada | ADAMTS1 | Miométrio | 0,0206 | 0,0386 | 0,4404 | 0,9399 | 1,9784 | 2,4511 | |
| | | Leiomioma | 0,0413 | 0,0422 | 0,3217 | 0,6934 | 1,3081 | 3,5024 | |
| Separatrizes de Tukey | ADAMTS1 | Miométrio | | | 0,4775 | 0,9399 | 1,8738 | | |
| | | Leiomioma | | | 0,4041 | 0,6934 | 1,3071 | | |

Tabela 2: Valores de percentil 5 até 95 para as amostras de miométrio e leiomioma, utilizando Média Ponderada (Weighted Average) e Separatrizes de Tukey (Tukey's Hinges).

As mensurações encontradas no teste GEE (Equações de Estimativas Generalizadas) evidenciaram que os grupos não possuem diferença

significativa, visto que os valores encontrados na comparação de amostras pareadas na diferença das médias foi igual (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados do Teste Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). Comparações Pareadas

| Grupo (I) | Grupo (J) | Diferença da média (I - J) | Erro Padrão | df | Bonferroni | Intervalo 95% de Confiança (WALD) da diferença | |
|------------------|-----------|----------------------------|-------------|----|------------|--|-----------------|
| | | | | | | Limite Inferior | Limite Superior |
| Miométrio | Mioma | 0,0384 | 0,39608 | 1 | 0,923 | -0,7379 | 0,8147 |
| Mioma | Miométrio | -0,0384 | 0,39608 | 1 | 0,923 | -0,8147 | 0,7379 |

Tabela 3: Diferença da média do grupo I (miométrio e mioma) em relação a média do grupo J (mioma e miométrio) foi a mesma, assim como no Bonferroni.

3. Discussão

No presente estudo, a análise da expressão do gene ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e miométrio não demonstrou diferenças significativas nas amostras avaliadas.

Alterações na expressão gênica do ADAMTS-1 têm sido descritas em diferentes tipos de tumores, como por exemplo, o câncer de mama e pulmão^{12, 13,14}. Freitas e colaboradores (2013) observaram que em câncer de mama há um aumento da expressão gênica do ADAMTS1 e que este aumento não está relacionado com os níveis de receptores de estrogênio e progesterona. Rocks et al (2006) verificaram que em câncer de pulmão há uma diminuição da expressão gênica do ADAMTS1 quando comparado com o tecido adjacente normal, podendo sua interação estar relacionada com o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular).

No presente estudo os leiomiomas uterinos intramurais e subserosos coletados apresentavam estruturas histológicas distintas. A determinação do ciclo ovariano das pacientes não foi possível devido à hipermenorréia, principal manifestação clínica observada. A impossibilidade de avaliar o ciclo ovariano pode ter sido uma variável de interferência nos resultados encontrados referentes à expressão gênica, considerando-se que, conforme a fase do ciclo ovariano ocorre uma maior ou menor expressão do receptor de progesterona e secreção da mesma, assim influenciando os resultados da expressão do gene ADAMTS-1, visto que a secreção da ADAMTS-1 é dependente da expressão do receptor de progesterona¹⁵.

O tamanho da amostra também pode ter influenciado os resultados obtidos, pois os tecidos de leiomiomas são muito heterogêneos.

O leiomioma uterino se desenvolve não apenas pela hiperplasia e hipertrofia de células miometriais, mas também pelo aumento da matriz extracelular. A localização anatômica das amostras selecionadas para a pesquisa foi distinta e durante o período do estudo, não foi mensurada a quantidade de matriz extracelular presente em cada amostra. Considerando que a ADAMTS-1 tem importante papel na remodelação da ECM, a expressão do gene ADAMTS-1 em cada uma das amostras pode ter se comportado de forma diferente¹⁶.

A variação nos efeitos hormonais sobre o leiomioma está relacionada ao seu crescimento autônomo. Para que ocorra o desenvolvimento e crescimento do mioma é necessária uma complexa interação entre estrogênio, progesterona, fatores de crescimento, citocinas e mutações somáticas. Tanto o estrogênio quanto a progesterona são considerados fatores mitogênicos, ou promotores do crescimento do tumor, no entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse crescimento ainda não são completamente conhecidos, necessitando o desenvolvimento de estudos moleculares para elucidar a ação desses hormônios na formação do leiomioma.

4. Materiais e Métodos

Estudo observacional prospectivo analítico.

Amostra

Foram incluídas no estudo 15 pacientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As pacientes que fizeram parte da pesquisa tinham idade entre 31 e 55 anos e indicação de histerectomia por miomatose na fase pré-menopausa, recomendada pelo seu médico assistente. Foram excluídas do estudo pacientes na fase pós-menopausa que utilizaram medicação hormonal nos três últimos meses anteriores à cirurgia, pacientes com endocrinopatias ou outras doenças

uterinas associadas, ou ainda exame anátomo-patológico não confirmando o diagnóstico de leiomioma uterino.

Considerações Éticas

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todas as participantes de pesquisa foram informados sobre o estudo em questão, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e receberam a sua via do documento.

Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no Centro Cirúrgico do HCPA, logo após a cirurgia para retirada do útero. Amostras do leiomioma uterino e do miométrio de cada paciente foram coletadas com bisturi e imediatamente armazenadas em 2 frascos previamente identificados com o número da paciente e o tipo de tecido, contendo *RNA Later (Solução de estabilização da Life Technologies, USA)*.

Extração e purificação de RNA

Foi realizada a extração de RNA total segundo o protocolo do fabricante Trizol® (Invitrogen, CA). O RNA foi purificado conforme protocolo

padrão (kit AMBION, Life Technologies, USA). As amostras foram armazenadas em freezer (-80°C).

Quantificação do RNA

A quantificação foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, USA), utilizando 1 µL de cada amostra.

Síntese de cDNA

A síntese foi realizada segundo o protocolo do fabricante (kit para SST III, Invitrogen, USA) a partir de 2 µg de RNA total. As amostras foram armazenadas no freezer -20°C.

PCR Real-Time

Os oligonucleotídeos sense e antisense do gene ADAMTS-1 (tabela 4) foram diluídos em tampão TE (Tris-HCl 1M, pH: 8.0, EDTA e água) e armazenados na temperatura de -20°C. Utilizando o kit SyBr Green (Invitrogen, USA) para reação do PCR, foi preparado um MIX contendo H₂O ultra pura , mastermix, oligonucleotídeos, ROX (fluoróforo diluído 1:10) na quantidade correspondente para o trabalho ser reproduzido. Foi realizada uma curva de diluição na placa (curva padrão), servindo como controle a partir de um *pool* de amostras (amostras de cDNA do tecido de miométrio). Em cada poço foi pipetado 24 µL do MIX e 1 µL de cDNA de cada amostra

(mioma e miométrio), efetuadas em duplicatas. O gene ADAMTS-1 foi normalizado pelo gene Beta-2-microglobulina (IDT, USA). As amostras de cDNA foram diluídas em proporção 1:50.

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos do ADAMTS-1 e BMG

| | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| ADAMTS-1 sense | 5'- CGTCAATGCTTTCCAACCTG-3' |
| ADAMTS-1 antisense | 5'- TGTATGGGATTCTGAGGCTTG-3' |
| BMG –sense | 5'- CTATCCAGCGTACTCAAAG-3' |
| BMG –antisense | 5'- ACAAGTCTGAATGCTCCACT-3' |

Análise estatística

Foi avaliada pelo teste de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). A normalidade foi verificada a partir do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram analisados utilizando o *software* SPSS para Windows (v. 17.0, SPSS Inc. Chicago, IL) para $\alpha = 0,05$.

4. Conclusão

Esse estudo foi o primeiro a avaliar a expressão gênica do ADAMTS-1 em tecidos de leiomioma uterino e miométrio. Os dados encontrados não mostraram diferenças significativas entre a expressão gênica no tecido de leiomioma uterino e tecido adjacente normal. Futuras investigações são necessárias para determinar os mecanismos precisos pelos quais o ADAMTS-1 poderia estar envolvido na tumorigênese.

Referências

1. VITIELLO, D.; MCCARTHY, S. Diagnóstico por imagen de los miomas. *Obstet Gynecol Clin N Am*, 33. p 85-95. 2006.
2. BOCLIN, K.L.S. & FAERSTEIN, E. Prevalência de diagnóstico médico auto-relatado de miomas uterinos em população brasileira. *Rev. Bras Epidemiol* . 2013; 16(2): 301-13
3. ANDRADE, A.M.; FRANCISCO, O. Análise do conhecimento sobre miomas uterino de mulheres residentes em São Pedro do Turvo, SP.
4. MARINO JL, ESKENAZI B, WARNER M, SAMUELS S, VERCELLINI P, GAVONI N et al. Uterine leiomyoma and menstrual cycle characteristics in a population-based cohort study. *Hum Reprod* 2004; 19(10): 2350-5
5. SILVA, ALB et al. Miomas e infertilidade: bases fisiopatológicas e implicações terapêuticas. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife*, 5 (1): 13-18, jan. / mar., 2005
6. GRIFFITHS A, D'ANGELO A, AMSO N. Surgical treatment of fibroids for subfertility: protocol for a Cochrane review. (Update software). *The Cochrane Library* 2003; (2)
7. ISHIKAWA H et al. Progesterone Is Essential for Maintenance and Growth of Uterine Leiomyoma. *Endocrinology*, June 2010, 151(6):2433–2442
8. KIM JJ, KURITA T, BULUN SE. Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer. *Endocr Rev*. Feb 2013; 34(1): 130-162
9. CIAVATTINI, A.; DI GIUSEPPE, J.; Uterine Fibroids: Pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstet Gynecol Int*. 2013
10. BOWDEN, W.; SKORUPSKI, J.; KOVANJI, E.; RAJKOVIC, A. Detection of novel copy number variants in uterine leiomyomas using high-resolution SNP arrays. *Mol Hum Reprod*, v.15 (9), p. 563-568. 2009
11. APTE SS. A Desintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *J. Biol. Chem*. 2009; 284:31493-31497.
12. FREITAS VM et al. Decreased expression. Of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. *Molecular Cancer* 2013, 12:2

13. ROCKS N et al. Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC). *British Journal of Cancer* (2006) 94, 724 – 730
14. PORTER S, SCOTT SD et al. Dysregulated Expression of Adamalysin-Thrombospondin Genes in Human Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2429-2440
15. RICHARDS JS, RUSSEL DL, OCHSNER S, ESPEY LL. Ovulation: New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-like Response. *Annu. Rev. Physiol.* 2002. 64:69–92
16. TAN Ide A, RICCIARDELLI C, RUSSEL D. The metalloproteinase ADAMTS1: A comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *Int. J. Cancer.* 2013; 133: 2263-2276

4 Considerações Finais e Perspectivas

Este estudo foi delineado a partir de um projeto de Doutorado desenvolvido através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O projeto analisa tecidos de leiomioma uterino e miométrio, porém os critérios avaliados são distintos. O n utilizado no presente estudo foi o alcançado até o momento no projeto de doutorado. Elucidar o papel do ADAMTS-1 na tumorigênese do leiomioma uterino é de extrema importância para o possível desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Em diferentes tipos de tecidos, esse gene tem a capacidade de estimular ou inibir o crescimento celular. Portanto, a investigação dos mecanismos envolvidos nesses processos tão contraditórios pode ser o foco de um futuro estudo.

Referências gerais

1. ANDRADE, A.M.; FRANCISCO, O. Análise do conhecimento sobre miomas uterino de mulheres residentes em São Pedro do Turvo, SP.
2. APTE SS. A Desintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:31493-31497.
3. BOCLIN K.L.S., FAERSTEIN E. .Prevalência de diagnóstico médico auto-relatado de miomas uterinos em população brasileira. *Rev Bras Epidemiol* .2013; 16(2): 301-13
4. CHOI JE, KIM DS, KIM EJ, et al. Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;187:80–4.
5. FEBRASGO. Leiomioma Uterino: Manual de Orientação. São Paulo, Ed Ponto, 2004.
6. GAVIN CJ, RILEY GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2005; 7(4)
7. GILA MR, PARRA JF, PAREDES AG. Mioma asintomático: conduca a seguir. *Atualización Obstetricia y Ginecologia*, 2011.
8. GRIFFITHS A, D'ANGELO A, AMSO N. Surgical treatment of fibroids for subfertility: protocol for a Cochrane review. (Update software). *The Cochrane Library* 2003; (2).
9. GUSTAVSSON H, JENNBÄCKEN K, WELEN K, et al. Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgenin dependent prostate cancer. *Prostate* 2008;68:161–70.
10. HEINEMANN K, THIEL C, MAHNER S, LEWIS MA, RAFF T, AHLHABICH D, et al. Benign gynecological tumors: Estimated incidence: Results of the German Cohort Study on Women's Health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 107(1): 78-80.

11. ISHIKAWA H et al. Progesterone Is Essential for Maintenance and Growth of Uterine Leiomyoma. *Endocrinology*, June 2010, 151(6):2433–2442
12. KATZ VL, LENTZ GM, LOBO RA & GERSHENSON DM (eds.). *Comprehensive Gynecology*. 5th edn. Philadelphia: Mosby, 2007.
13. KHO KA, NEZHAT C. Parasitic Myomas. *Obstet Gynecol* 2009; 114:611-15.
14. KIM JJ, KURITA T, BULUN SE. Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer. *Endocr Rev*. Feb 2013; 34(1): 130-162
15. LAMMINEN S, RANTALA I, HELIN H, RORARIUS M, TUIMALA R. Proliferative activity of human uterine leiomyoma cells as measured by automatic image analysis. *Gynecol Obstet Invest* 1992, 34:111–114
16. LIGON AH, MORTON C. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Hum Reprod Update*. 2001;7(1):8-14.
17. LIM JH, WANG H. Uterine Disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120 (4).
18. LIND GE, KLEIVI K, MELING GI, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol* 2006;28:259–72.
19. MARINO JL, ESKENAZI B, WARNER M, SAMUELS S, VERCELLINI P, GAVONI N et al. Uterine leiomyoma and menstrual cycle characteristics in a population-based cohort study. *Hum Reprod* 2004; 19(10): 2350-5.
20. MCLUCAS B. Diagnosis, imaging and anatomical classification of uterine fibroids. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*. Vol. 22, No. 4, 2008, pp. 627–642
21. REHN AP, BIRCH MA, KARLSTROM E, et al. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone* 2007;41:231–238.

22. RICCIARDELLI C, FREWIN KM, TAN IDE A, et al. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 2011;179:3075–85.
23. RICHARDS JS, RUSSEL DL, OCHSNER S, ESPEY LL. Ovulation: New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-like Response. *Annu. Rev. Physiol.* 2002. 64:69–92
24. RUSSELL DL, DOYLE KM, OCHSNER SA, et al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J BiolChem*2003;278:42330–9.
25. SCHMALL RJ. Uterine fibroids: natural history and therapeutic options. *Appl Radiol* 2000; 29: 15–22.
26. SEALS DF, COURTNEIDGE SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 2003; 17: 7-30.
27. SILVA, ALB et al. Miomas e infertilidade: bases fisiopatológicas e implicações terapêuticas. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.*, Recife, 5 (1): 13-18, jan. / mar., 2005
28. SOZEN I, ARICI A. Cellular Biology of Myomas: Interaction of Sex Steroids with Cytokines and Growth Factors. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2006;33:41-58.
29. TAN Ide A, RICCIARDELLI C, RUSSEL D. The metalloproteinase ADAMTS1: A comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *Int. J. Cancer.* 2013; 133: 2263-2276.
30. TORTORELLA MD, MALFAIT AM, DECCICO C, ARNER E. The role of ADAMTS 4 (aggrecanase-1) and ADAMTS 5 (aggrecanase-2) in model of cartilage degradation. *Osteo arthr. Cartil.* 2001; 9: 539-552.
31. VITIELLO, D.; MCCARTHY, S. Diagnóstico por imagen de los miomas. *Obstet Gynecol Clin N Am*, 33. p85-95. 2006.
32. WILDE S, SCOTT-BARRET S. Radiological appearances of uterine fibroids. *Indian J. Radiol. Imaging.* 2009 ; Jul-Sep;19(3):222-31

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Efeito da mifepristona sobre os mecanismos epigenéticos de leiomiomas uterinos.

Pesquisadores responsáveis: Helena Corleta, Ilma Brum da Silva, Gabriela Sant'Anna.

Endereço: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS) – Centro de Pesquisa Experimental - Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular.

Telefones para contato: (51) 33083559

Telefone do Comitê de Ética em pesquisa: (51) 3359-7640

Prezada paciente,

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de leiomiomas uterinos, popularmente conhecidos como miomas. Estes tumores benignos são bastante frequentes em mulheres. Como a Sra. tem o diagnóstico de leiomioma uterino e foi recomendada cirurgia para a retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-la a participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que um pequeno fragmento do tumor e do tecido adjacente normal que o envolve sejam encaminhados para estudo genético. O restante do tumor será destinado ao exame histopatológico normal.

Se a Sra. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (nesse caso, estes trabalhos serão apresentados ao Comitê de Ética e a Senhora será novamente consultada). No futuro essas características poderão auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos, no entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora.

A Sra. é livre para decidir por participar ou não do estudo e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. A Sra. não terá qualquer custo financeiro se optar por participar desse estudo. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar, e uma via deste documento lhe será entregue. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para uso exclusivo de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informada dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Porto Alegre, _____ de _____ 201__

Paciente ou responsável: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____