

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Mecanismos epigenéticos em leiomiomas uterinos
e o efeito da mifepristona (RU 486) na expressão gênica dos receptores de progesterona total
e B.

Gabriela dos Santos Sant'Anna

Porto Alegre, 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Mecanismos epigenéticos em leiomiomas uterinos
e o efeito da mifepristona (RU 486) na expressão gênica dos receptores de progesterona total
e B.

Gabriela dos Santos Sant'Anna

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Helena von Eye Corleta
Coorientador (a): Prof^ª Dr^ª Ilma Brum da Silva

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Sant'Anna, Gabriela dos Santos

Mecanismos epigenéticos em leiomiomas uterinos e o efeito da mifepristona (RU 486) na expressão gênica dos receptores de progesterona total e B. / Gabriela dos Santos Sant'Anna. -- 2017.
75 f.

Orientadora: Helena von Eye Corleta.

Coorientadora: Ilma Simoni Brum da Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. leiomioma uterino. 2. epigenética. 3. mifepristona. 4. receptores de progesterona. I. von Eye Corleta, Helena, orient. II. Simoni Brum da Silva, Ilma, coorient. III. Título.

Agradecimentos

A minha orientadora Prof^a Dra Helena von Eye Corleta e co-orientadora Prof^a Dra Ilma Brum da Silva, por aceitarem me orientar e auxiliar no processo de consolidação do conhecimento.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular Endócrino Tumoral (LABIMET)-UFRGS, por sua parceria, apoio e auxílio.

A todas as pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo, pela confiança que depositaram nessa proposta de pesquisa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, por oportunizar meu aprimoramento profissional.

RESUMO

Introdução: Leiomiomas uterinos ou miomas são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio e acometem cerca de 50% da população feminina. Têm como principais sintomas, sangramento excessivo e dor pélvica inespecífica. Convencionalmente o estrogênio é considerado o responsável pelo início da proliferação tumoral, mas recentes evidências clínicas e bioquímicas sugerem que a progesterona apresenta um papel importante no desenvolvimento desses tumores. Além disso, mecanismos epigenéticos parecem estar envolvidos na etiologia dos leiomiomas uterinos, como a metilação de DNA e acetilação de histonas. Somente nos EUA são realizadas 240 mil histerectomias/ano para tratar essa doença sendo considerado um problema de saúde pública. Frente a esses dados é imprescindível o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento desses tumores e a busca de tratamentos menos invasivos. A mifepristona (RU 486), um modulador seletivo dos receptores de progesterona e glicocorticoides, é capaz de diminuir o tamanho dos tumores e amenizar os sintomas associados. **Objetivos:** verificar se (1) nos tecidos de leiomiomas uterinos e miométrio, os mecanismos epigenéticos como a metilação global do DNA e a acetilação de histonas estão alterados (2) se em cultura primária de leiomioma uterino e miométrio o tratamento com estradiol e progesterona é capaz de modular a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B, assim como a atividade das enzimas histona acetiltransferase e desacetilase, e (3) se a mifepristona (RU 486) é capaz de modular diretamente a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B após tratamento com os hormônios estradiol e progesterona. **Métodos:** para análise de metilação global do DNA e acetilação de histonas foram utilizadas 25 amostras teciduais para cada grupo de leiomioma uterino e miométrio oriundos de pacientes submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A metilação global do DNA e a atividade da enzima histona acetiltransferase foram dosadas pelo método de ELISA e a enzima histona desacetilase por detecção fluorimétrica. Para verificar o efeito dos hormônios sexuais ovarianos e o efeito da mifepristona (RU 486) sobre a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B foram realizadas 7 culturas primárias de leiomiomas uterinos e miométrio. **Resultados:** (1) Foram observadas hipermetilação ($P = 0,022$) e hipoacetilação ($P = 0,04$) em leiomiomas uterinos quando comparado ao miométrio. Não houve diferença estatística entre estes tecidos em relação à atividade da histona acetiltransferase. (2) Houve aumento da expressão gênica do receptor de progesterona total em cultura primária de leiomioma uterino quando tratado com estradiol ($P = 0,028$) e o receptor de progesterona B teve sua expressão aumentada quando tratado com estradiol, progesterona e estradiol + progesterona ($P = 0,001$). (3) O

tratamento com mifepristona (RU 486) na dose de 10^{-6} M não foi capaz de diminuir a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B em células de leiomiomas uterinos e miométrio. A atividade da enzima histona desacetilase foi maior nas células de leiomioma uterino quando tratadas com estradiol ($P = 0,034$) e estradiol + progesterona + RU 486 ($P = 0,001$) quando comparado às células de miométrio, já a atividade da enzima histona acetiltransferase não foi detectada, devido a sua baixa quantidade. **Conclusão:** Nesse estudo foi observado uma hipermetilação e hipoacetilação nos tecidos de leiomiomas uterinos. Esses resultados sugerem que mecanismos epigenéticos podem estar contribuindo para a diminuição transcricional de genes relacionados ao funcionamento normal do miométrio e, com isso, colaborando para o crescimento desses tumores. Além disso, nossos resultados sugerem que estradiol e progesterona são capazes de modular a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B e o medicamento RU 486 na dose de 10^{-6} M não foi capaz de diminuir diretamente a expressão desses receptores.

Palavra-chave: leiomioma uterino, epigenética, mifepristona, estradiol, progesterona.

ABSTRACT

Introduction: Uterine leiomyoma, also known as fibroids, is a smooth muscle cell tumor, and is clinically apparent in up to 50% of reproductive-age women. Clinical symptoms include abnormal uterine bleeding and pelvic pain. Estrogen has been considered a primary growth promoter of uterine leiomyoma, however clinical and biochemical evidence has suggested that progesterone plays a critical role in the development of these tumors. Furthermore, epigenetic modifications may be involved with etiology of these tumors, through DNA methylation and histone acetylation. In the United States, 240,000 hysterectomies/year are performed to treat uterine leiomyomas which is being considered to be a public health problem. The understanding of molecular mechanisms involved in the development of uterine leiomyoma may provide not only opportunities for a diagnostic, but also generation of novel therapeutic approaches. The mifepristone (RU 486), a synthetic steroid that has affinity for progesterone and glucocorticoid receptors has been reported to induce regression of uterine leiomyoma and reduce the symptoms. **Objective:** verify if (1) DNA global methylation and histone acetylation patterns are altered in uterine leiomyoma tissue compared with myometrium; (2) the treatment with estradiol and progesterone are able to modulate gene expression of total and B progesterone receptors and histone acetylation patterns in primary culture of uterine leiomyoma cells and myometrium as well as (3) the mifepristone (RU 486) are able to modulate the gene expression of total and B progesterone receptors after the treatment with ovarian steroid hormones. **Methods:** DNA global methylation and histone acetylation patterns were analyzed in 25 tissue samples from uterine leiomyoma and myometrium. The DNA global methylation and the activity of histone acetyltransferase were performed using ELISA method. In order to evaluate histone deacetylase activity fluorimetric detection was used. To verify the effect of estradiol and progesterone on total and B progesterone receptors gene expression, as well as the influence of RU486 on these parameters, seven cultured cells from uterine leiomyoma and myometrium cells were performed. **Results:** (1) Hypermethylation ($p = 0.022$) and hypoacetylation ($p = 0.04$) in uterine leiomyoma tissues compared with myometrium were observed. There was no statistical difference between these tissues in histone acetyltransferase activity. (2) We observed increased gene expression of total progesterone receptor in culture cells of uterine leiomyoma when treated with estradiol ($p = 0.028$). There was an increase of B progesterone receptor mRNA when treated with hormones, estradiol and progesterone ($p = 0.001$). The treatment with RU 486 was not able to modulate progesterone receptors. The histone deacetylase activity was elevated in uterine

leiomyoma cells when treated with estradiol ($p = 0.034$) and estradiol + progesterone + RU 486 ($p = 0.001$). The histone acetyltransferase activity was barely detectable. **Conclusion:** In our study we found hypermethylation and hypoacetylation in uterine leiomyoma tissues suggesting that this process may lead to a decreased transcriptional activity of important genes associated with normal myometrium function contributing to the development of these tumors. Furthermore, our results suggest that ovarian steroids hormones increase progesterone receptors expression, being mifepristone (RU 486) at dose of 10^{-6} M unable to decrease total and B progesterone receptors in uterine leiomyoma cells.

Keywords: uterine leiomyoma, epigenetic, mifepristone, estradiol, progesterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estratégias para localizar e selecionar informações.

Figura 2- Localização dos leiomiomas uterinos.

Figura 3- Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona (PR).

Figura 4- Estado de condensação da cromatina.

Figura 5- Mecanismos epigenéticos capazes de alterar a expressão gênica: Metilação do DNA e acetilação de histonas. Adaptado de McCleary-Wheeler *et al.*,2013.

Artigo 1:

Figure 1. Immunofluorescent staining analysis of myometrium and uterine leiomyoma cells. Blue staining for nucleus (A, E). Green staining for actin filaments (B, F). Red staining for myosin filaments (C,G). Merge (D, H).

Figure 2. Gene expression of PR uterine leiomyoma and myometrium cells. A. PRT expression in uterine leiomyoma cells increased when treated with E₂ (p = 0.028). B. The graph shows an increased PRB expression in uterine leiomyoma cells compared with the myometrium for all treatments. E₂ and P₄ increased mRNA expression of PRB (p = 0.001) and the mifepristone (RU486) does not reduce this expression.

Figure 3. HDAC activity in uterine leiomyoma cells and myometrium. The HDAC activity was higher in uterine leiomyoma when compared to the myometrium in E₂ alone (p = 0.034) and E₂ + P₄ + mifepristone (RU486) (p = 0.001) group.

Artigo 2:

Figure 1 - Global DNA methylation in uterine tissue. The global DNA methylation was higher in uterine leiomyoma (46.85%) when compared to the myometrium (24.95%) (Student's t test, $*p = 0.022$); Results are expressed as mean \pm standard deviation, $n = 25$.

Figure 2 - HAT activity in uterine tissue. The HAT activity showed no statistically significant differences between uterine leiomyoma and myometrium (Wilcoxon test, $p = 0.08$). Each point represents one patient. Bars represent the median of values, $n = 25$.

Figure 3 - HDAC activity in uterine tissue. The HDAC activity was higher in uterine leiomyoma when compared to the myometrium (Wilcoxon test, $*p = 0.04$). Each point represents one patient. Bars represent the median of values, $n = 25$.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HR – Hormônio-receptor

EREs- Elementos responsivos a esteróides

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ER α – Receptor de estrogênio α

ER β – Receptor de estrogênio β

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

LH- Hormônio luteinizante

FSH- Hormônio folículo estimulante

SERM – Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio

MSRP – Moduladores seletivos dos receptores de progesterona

PRs – Receptores de progesterona

PRA – Receptor de progesterona A

PRB – Receptor de progesterona B

pb - pares de bases

KDa – Unidade de massa atômica

HAT – histona acetiltransferase

HDAC – histona desacetilase

NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

CpG – citosina precedida por guanina

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

SUMÁRIO

1.Introdução.....	13
2.Revisão da Literatura.....	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
2.2 Leiomiomas uterinos.....	15
2.3 Mecanismos moleculares envolvidos em leiomiomas uterinos.....	16
2.3.1 Receptores de estrogênio.....	18
2.3.2 Receptores de progesterona.....	18
2.4 Epigenética.....	20
2.4.1 Definição e perspectiva histórica.....	20
2.5 Mecanismos Epigenéticos.....	20
2.5.1 Acetilação de histonas.....	22
2.5.2 Metilação do DNA.....	23
2.6 Tratamento atual dos leiomiomas uterinos.....	25
2.6.1 Moduladores seletivos dos receptores de progesterona.....	25
2.6.2 Mifepristona (RU 486).....	26
3.Mapa conceitual.....	27
4. Justificativa.....	28
5. Objetivos.....	28
5.1 Objetivo principal.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
6.Referências.....	30
7.Artigo 1.....	39
8.Artigo 2.....	56
9.Considerações finais.....	71
10.Anexos.....	72

INTRODUÇÃO

Leiomiomas ou miomas são tumores uterinos benignos que se desenvolvem no miométrio e constituem a neoplasia benigna mais comum do sistema genital feminino (Fiebitz *et al.*, 2012). Apresentam como característica um aumento do tecido fibroso e parecem ser dependentes dos hormônios ovarianos, estradiol e progesterona (Corleta *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que esses hormônios atuam localmente e medeiam o crescimento dos leiomiomas uterinos pela ligação com seus receptores, e subsequente ativação de proto-oncogenes e fatores de crescimento (Gomes *et al.*, 2006; Sabry & Al-Hendy, 2012).

São classificados de acordo com a sua localização, podendo ser intramurais, ou seja, localizados no interior da parede uterina; submucosos ocasionando uma protrusão na cavidade endometrial ou subserosos, protrusão na superfície serosa do útero. (Kumar *et al.*, 2005). Em gestantes parecem estar associados com abortos espontâneos, parto prematuro, inércia uterina e hemorragia pós-parto (Stewart, 2001; Lee *et al.*, 2010). Os sintomas são relacionados diretamente com o tamanho, número e localização. Os intramurais causam sangramento e dismenorréia, enquanto que os submucosos produzem sangramentos irregulares e estão associados à disfunção reprodutiva. Os subserosos tendem a causar sintomas mais compressivos e distorção anatômica de órgãos adjacentes (Corleta *et al.*, 2007).

A incidência desses tumores é de aproximadamente 50% da população feminina, sendo mais frequentes nas mulheres em idade fértil, tornando-se sintomáticos em 20-50% dos casos (Okolo, 2008). Nos EUA anualmente chegam a ser realizados 600 mil histerectomias/ano, sendo 40% relacionadas aos leiomiomas uterinos levando a um gasto de 2 bilhões de dólares/ano, sendo um problema de saúde pública. Frente a esses dados é imprescindível o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento desses tumores e a busca por novas terapias. (Asada *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2012).

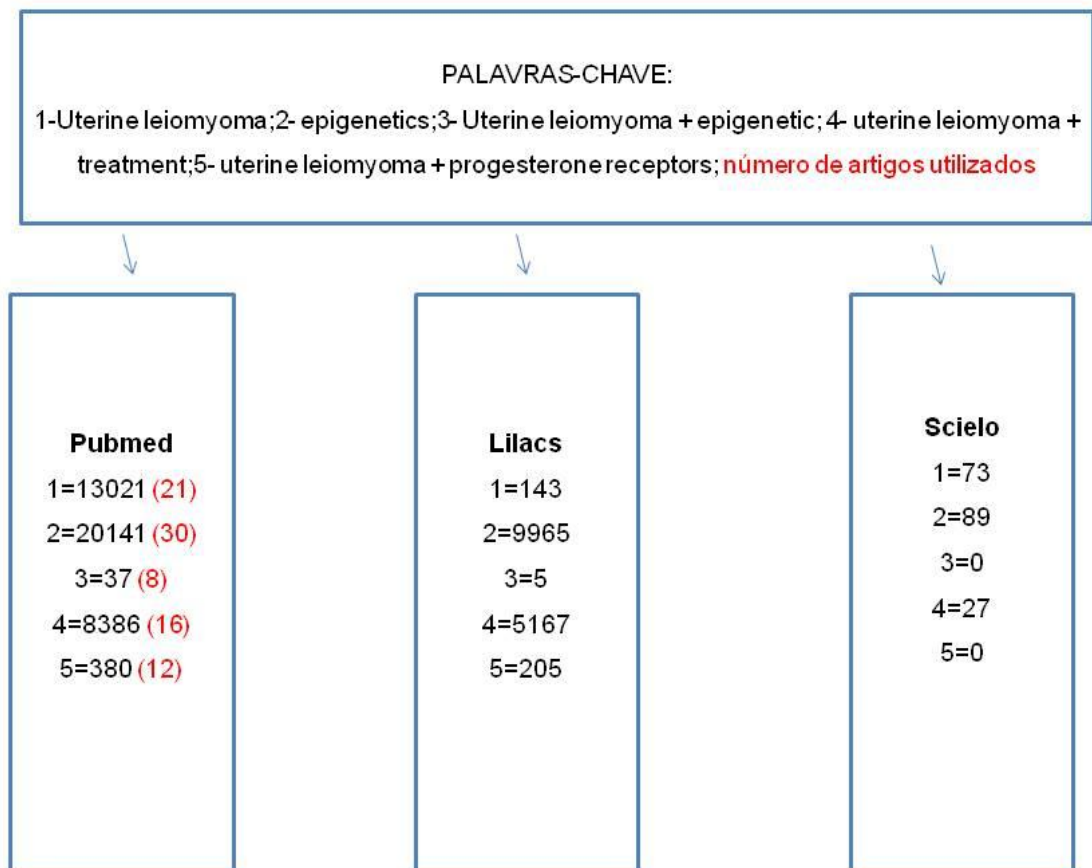
Tem sido proposto o uso do medicamento mifepristona (RU486), um modulador seletivo dos receptores de progesterona, para o tratamento desses tumores. O RU486 diminui a proliferação celular e melhorar os sintomas (Ishikawa *et al.*, 2010; Tieszen *et al.*, 2011; Esteve *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017). No entanto mais estudos devem ser realizados para verificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, além da sua especificidade e eficácia no tratamento desses tumores.

2. Revisão da literatura

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A estratégia de busca foi realizada com as palavras *uterine leiomyoma*, *uterine leiomyoma epigenetics*, *uterine leiomyoma methylation*, *uterine leiomyoma acetylation*, *uterine leiomyoma progesterone receptors* e *uterine leiomyoma mifepristone*, considerando a busca a partir do ano de 1993, sendo citados antes desse ano aqueles com informações relevantes. Bases de dados utilizadas: PubMed (Pubmed-MesH), LILACS (BIREME) e Scielo (figura 1).

Figura 1- Modelo esquemático da estratégia de busca



2.2 Leiomiomas uterinos

O útero é um órgão do sistema genital feminino situado na pelve, anterior ao reto e pósterosuperior à bexiga urinária. O útero possui uma porção intra-abdominal denominada corpo, e uma parte inferior, cilíndrica, vaginal, chamada de colo uterino. O útero é constituído por três camadas: perimétrio (externa), miométrio (intermediária) e endométrio (interna) (Standring & Gray, 2008).

O miométrio é a camada mais espessa do útero, sendo formado por fibras musculares lisas separadas por tecido conectivo, local e podem surgir tumores benignos conhecidos como leiomiomas uterinos, miomas ou fibromas (Flake *et al.*, 2003). Estes são tumores monoclonais originários de células do músculo liso com grande quantidade de matriz extracelular, principalmente colágeno, fibronectinas e proteoglicanos. Esse aumento da matriz extracelular torna esses tumores extremamente fibrosos e rígidos (Parker, 2007; Sankaran & Manyonda, 2008). Além disso, podem apresentar tamanho variado e serem circundados por uma pseudocápsula (Levy *et al.*, 2000). Estima-se que a incidência desses tumores seja de 3 a 4 vezes maior em mulheres afro-americanas quando comparado com mulheres caucasianas (Amant *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2014).

São classificados de acordo com a sua localização podendo ser intramurais (localizados no interior da parede uterina), submucosos (fazem protrusão na cavidade endometrial) ou subserosos (fazem protrusão na superfície serosa do útero). Os leiomiomas subserosos ou submucosos podem estar presos por um pedículo crescendo além da superfície, sendo chamados de pediculados (Kumar *et al.*, 2005) (Figura 2).



Figura 2. Localização dos leiomiossarcomas uterinos. Adaptado de www.nichd.nih.gov/health/topics/uterine/conditioninfo/Pages/default.aspx. Acesso em dezembro de 2016.

Os tratamentos cirúrgicos mais comuns são a miomectomia, a embolização e a histerectomia, sendo este último o único capaz de eliminar totalmente os sintomas e as chances de recidiva, pois resulta na remoção total do útero (Guarnaccia & Rein, 2001; Corleta *et al.*, 2007). Já a terapia medicamentosa consiste em estratégias para minimizar os sintomas (sangramento) e o crescimento dos leiomiossarcomas uterinos.

2.3 Mecanismos moleculares envolvidos nos Leiomiossarcomas uterinos

Evidências sugerem que o surgimento de alguns leiomiossarcomas uterinos ocorra por alterações cromossômicas e mutações gênicas. A transformação neoplásica desses tumores parece ser um processo que ocorre em etapas, nas quais as células adquirem um novo fenótipo decorrente de alterações genômicas (Gomes *et al.*, 2006). Estudos cromossômicos mostram aberrações citogenéticas heterogêneas em cerca de 40% dos casos, sendo as cinco mais frequentes: translocação específica entre os cromossomos 12 e 14, trissomia do cromossomo 12, deleção do cromossomo 7 e rearranjo envolvendo o braço longo do cromossomo 12 e o braço curto do

cromossomo 6 (Flake *et al.*, 2003; Parker, 2007; Islam *et al.*, 2013). Também foi observado o envolvimento dos cromossomos 10, 11 e 22 (Cha *et al.*, 2011). Assim, múltiplos loci gênicos parecem estar envolvidos na formação destes tumores.

Além disso, existe descrição na literatura de mais de 100 genes desregulados nesses tumores, incluindo os receptores de estrogênio α e β , receptores de progesterona A e B, genes relacionados com a produção de matriz extracelular, genes supressores tumorais entre outros (Lee *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2007; Lora *et al.*, 2012).

O desenvolvimento e manutenção desses tumores parecem ser dependentes dos hormônios esteroides sexuais. O modelo clássico proposto por Schuchard e colaboradores (1993) descreve a ação nuclear dos receptores hormonais. Os hormônios esteroides são lipofílicos capazes de se difundirem na membrana plasmática formando complexos de alta afinidade com o seu receptor específico, resultando na ativação do mesmo. Essa ativação envolve mudanças conformacionais e associações entre proteínas, que capacitam o complexo hormônio-receptor (HR) a ligar-se com alta afinidade a regiões do DNA chamadas de elementos responsivos a esteroides (EREs). Esses EREs correspondem a sequências de DNA de 15 a 20 pares de bases localizadas anteriormente ao sítio de início de transcrição do gene responsivo ao esteroide. Uma vez ligado a essa sequência, o complexo HR atua como fator de transcrição, modulando a taxa de transcrição do gene alvo.

Os hormônios ovarianos parecem ter um papel importante no crescimento e desenvolvimento dos miomas (Kim *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Borahay *et al.*, 2015). Está demonstrado que o estrogênio e a progesterona atuam localmente mediando o crescimento tumoral pela ligação aos seus receptores, com subsequente ativação de proto-oncogenes, fatores de crescimento e de seus receptores. Embora o estrogênio seja apontado como o principal responsável nesse processo, evidências bioquímicas, patológicas e clínicas sugerem que a progesterona, agindo por meio dos seus receptores celulares também promova a proliferação celular nos leiomiomas uterinos (Gomes *et al.*, 2006; Sabry & Al-Hendy, 2012).

Os receptores dos hormônios esteroides são encontrados no miométrio e leiomioma (Englund *et al.*, 1998; Maruo *et al.*, 2004) e as interações entre receptores de estrogênio e progesterona podem estar envolvidos na modulação da transcrição gênica em leiomiomas uterinos (Maruo *et al.*, 2004; Tieszen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

2.3.1 Receptores de estrogênio

O estrogênio, assim como a progesterona, desempenha um papel fundamental no sistema genital feminino. O estrogênio exerce efeitos fisiológicos nas células-alvo pela ligação aos seus receptores nucleares específicos, sendo conhecidos dois subtipos: os receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) (Mosselman *et al.*, 1996).

Evidências apoiam o conceito de que o estrogênio está relacionado, pelo menos em parte, no desenvolvimento e crescimento dos leiomiomas uterinos (Ishikawa *et al.*, 2010; Maruo *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2013). Asada *et al.* (2008) observaram que a expressão gênica do $ER\alpha$ está aumentada em leiomiomas uterinos quando comparado ao miométrio, provavelmente devido a uma alteração no padrão de metilação do DNA na região promotora do $ER\alpha$. Além disso, já foi observado que o tratamento com agonistas do Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em pacientes diagnosticadas com leiomiomas uterinos, leva à diminuição dos níveis de estrogênio ocasionando a redução do tamanho do tumor (Lethaby *et al.*, 2001).

2.3.2 Receptores de progesterona

A progesterona possui um papel chave na regulação do desenvolvimento e da função reprodutora feminina. O principal local de síntese e secreção de progesterona, juntamente com o hormônio estradiol, é o ovário na segunda fase do ciclo menstrual (Graham & Clarke, 1997).

Os efeitos fisiológicos da progesterona são mediados pela interação com proteínas intracelulares específicas, os receptores de progesterona (PRs) (Conneely & Lydon, 2000; Jacobsen & Horwitz, 2012) (Figura 3). Os PRs são fatores de transcrição ativados por ligante, membros da família de receptores nucleares para hormônios esteroides (Richer *et al.*, 2002). O receptor de progesterona apresenta duas isoformas, A e B (PRA e PRB), as quais são produtos de um único gene (PGR), são transcritos alternativos, induzidos por estrogênio, e também da tradução de dois códons de iniciação (AUG) alternativos do mRNA que codifica PRB (Kastner *et al.*, 1990; Conneely & Lydon, 2000; Jacobsen & Horwitz, 2012). PRB é a maior isoforma (116 KDa), possuindo uma região de 164 aminoácidos na extremidade N-terminal, não presente em PRA (94KDa) (Mote *et al.*, 2001). O PRB é descrito como forte ativador da transcrição de vários promotores dependentes de progesterona, e o PRA é descrito

como repressor dominante da atividade do PRB, assim como de outros receptores nucleares, sugerindo que uma alta expressão de PRA possa resultar em reduzida responsividade à progesterona (Mote *et al.*, 2002). O PRB também foi apontado como suficiente para capacitar a proliferação e a diferenciação normal do epitélio em resposta à progesterona, sendo que nenhum destes processos aparentemente exige a expressão funcional do PRA (Connelly *et al.*, 2003).

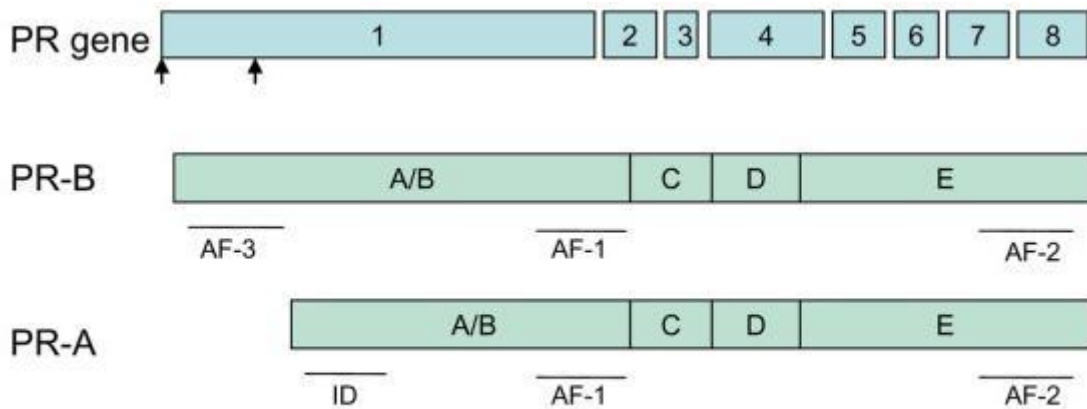


Figura 3. Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona humano (PR). Os números indicam os exons. AF-1, AF-2 e AF-3 são os domínios de transativação. ID é o domínio inibitório específico do PRA. Região A/B é codificada pelo exon 1 e em parte pelo 2 e contém o domínio de transativação específico do PRB, o AF-3; AF-1 comum para PRB e PRA e o ID específico do PRA. Região C: domínio de ligação do DNA; Região D: dedo de zinco, região responsável pelo sinal de localização nuclear; Região E: domínio de ligação ao ligante. Adaptado de Cork *et al.*, 2008 - *Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer*.

Evidências clínicas e bioquímicas têm indicado um papel crucial da progesterona na tumorigênese dos leiomiomas uterinos (Tieszen *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Ishikawa e colaboradores (2010) demonstraram em um modelo xenográfico para leiomioma uterino que a progesterona e seus receptores estimulam diretamente a proliferação tumoral e o estrogênio junto com seus receptores seriam responsáveis pela manutenção dessa expressão. Além disso, culturas de células primárias de miométrio e mioma mostram um aumento na proliferação celular quando estimuladas com progesterona ou estrogênio associado à progesterona (Matsuo *et al.*, 1997; Barbarisi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006).

Além da ação dos hormônios esteroides e seus receptores, mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA e acetilação de histonas têm sido cada vez mais associados com a formação dos leiomiomas uterinos (Islam *et al.*, 2013).

2.4 Epigenética

2.4.1 Definição e perspectiva histórica

O termo Epigenética foi primeiramente descrito, em 1942, pelo biólogo Conrad H. Waddington que definiu como sendo um ramo da Biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, sendo responsáveis pela produção do fenótipo. A definição, proposta por Verdone *et al.* (2006), a descreve como “toda modificação que ocorre na cromatina que não envolva modificações na sequência do DNA”.

Pesquisas recentes têm demonstrado que o ambiente é capaz de induzir modificações epigenéticas e conseqüentemente modular a expressão de genes específicos. A maioria destes estudos utiliza modelos animais e demonstram que essas modificações afetam diferentes estruturas celulares, podendo influenciar no desenvolvimento de diversas doenças (Foley *et al.*, 2009; Handel *et al.*, 2010; Mastroeni *et al.*, 2011). Entre os fatores que podem induzir as modificações epigenéticas, os mais citados incluem a alimentação, poluição, drogas e o exercício físico (Hardy & Tollefsbol, 2011).

2.5 Mecanismos Epigenéticos

Em células eucarióticas, o DNA genômico é envolto por proteínas denominadas histonas, originando a cromatina (Grewal, 2007). Nucleossomo é a unidade estrutural de um cromossomo eucariótico que consiste numa unidade de DNA dividida em duas espirais, que se encontram enroladas em um octâmero protéico, constituído por quatro pares de proteínas chamadas histonas, H2A, H2B, H3 e H4 (Verdone *et al.*, 2006; Kouzarides, 2007; Gonzalo, 2010) que são estabilizadas na cromatina com o auxílio da histona H1 (Verdone *et al.*, 2006).

As histonas são proteínas que possuem alta proporção dos resíduos de aminoácidos, lisina e arginina, os quais são carregados positivamente, resultando em alta afinidade ao DNA, que tem um alto conteúdo de carga negativa. Cada uma das histonas presentes no nucleossomo apresenta uma sequência amino-terminal (N-terminal) flexível de 11 a 37 aminoácidos. Estas regiões são conhecidas como “caudas das histonas” (Kouzarides, 2007).

A posição dos nucleossomos em relação ao DNA é um fator que altera o grau de compactação da cromatina e sua acessibilidade para o processo transcricional (Lund & Lohuizen, 2004). Quando a cromatina se encontra mais condensada, é denominada heterocromatina, sendo associada com a repressão e o silenciamento gênico. Quando a cromatina está mais acessível, ou seja, menos condensada ela é denominada de eucromatina, que permite a transcrição e, com isso, aumenta a expressão gênica (Rodenhiser & Mann, 2006). (Figura 4). Este estado dinâmico da cromatina pode ser alterado por modificações epigenéticas, envolvendo mecanismos bioquímicos que atuam nas histonas ou no próprio DNA, como por exemplo, a acetilação de histonas e a metilação do DNA (Kouzarides, 2007)

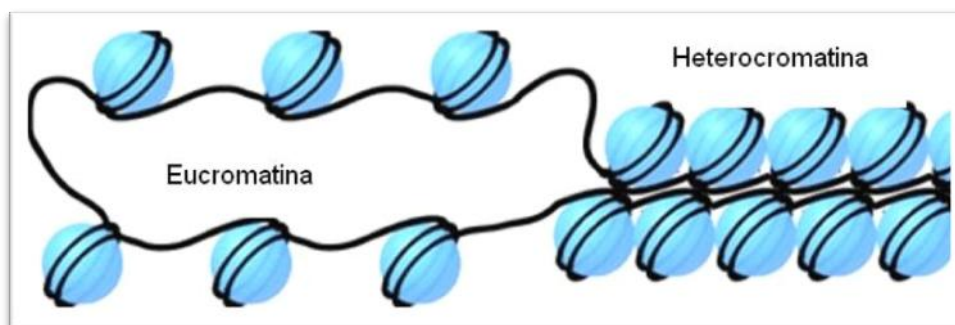


Figura 4. Estado de condensação da cromatina. Adaptado de www.stomponstep1.com/epigenetic. Acesso em dezembro de 2015.

2.5.1 Acetilação de histonas

A acetilação de histonas ocorre principalmente nas caudas N-terminais e estão associadas com a atividade da transcrição gênica, sendo reguladas por dois grupos de enzimas, as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs) (Strahl & Allis, 2000). O desequilíbrio da acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras contribui para a desregulação da expressão gênica e tem sido associado à carcinogênese e à progressão do câncer (Kouzarides, 1999; Ropero & Esteller, 2007).

As HATs são responsáveis por promover a acetilação das histonas, ou seja, remove um grupo acetil da acetil-coenzima A, adicionando-o nos resíduos de lisina. Isto resulta no relaxamento da cromatina, deixando sua estrutura “aberta”, facilitando o processo de transcrição e consequentemente a expressão gênica. Por outro lado, as HDACs removem o grupo acetil da histona, tornando a estrutura da cromatina mais compacta (Strahl & Allis, 2000), atenuando o processo de transcrição e contribuindo para o silenciamento gênico. Desta forma, o sistema HAT-HDAC é importante na regulação do processo de transcrição gênica. Em geral, a acetilação de histonas facilita o processo de transcrição (Waggoner, 2007; Yoo e Jones, 2006), enquanto que a desacetilação de histonas o atenua, contribuindo para o silenciamento gênico (Strahl & Allis, 2000; Turner, 2002).

Em humanos, são descritas 18 enzimas com atividade desacetiladora de histonas, agrupadas em 4 classes. As classes de HDAC (classe I, II E IV) são dependentes de Zn^{2+} , enquanto que a classe III, conhecida como sirtuínas, possui o seu mecanismo dependente de NAD^+ (Shakespear *et al.*, 2011).

Têm sido demonstrado que o equilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC está intimamente ligado à homeostase celular (Taunton *et al.*, 1996) e que o desequilíbrio entre HAT/HDAC, parece influenciar no processo de carcinogênese, morte celular e no surgimento de doenças degenerativas (Verdone *et al.*, 2006; Kazantsev & Thompson, 2008; Willis-Martinez *et al.*, 2010).

Em leiomiomas uterinos e leiomiiossarcomas foi demonstrado que a expressão gênica e protéica da HDAC8 estão aumentadas quando comparado com miométrio, sendo sugerido o uso das HDACs como uma possível ferramenta para diagnóstico de classificação de tumores uterinos (Leval *et al.*, 2006). Além disso, Wei *et al.* (2011) observaram, em cultura celular de

leiomiomas uterinos, que uma diminuição da expressão da HDAC6 acarreta numa diminuição da expressão do ER α e conseqüentemente uma inibição da proliferação celular sugerindo que a acetilação de histonas pode ser capaz de modular os receptores de estrogênios.

2.5.2 Metilação do DNA

Os estágios de condensação da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificação das histonas (Feinberg & Tycko, 2004). A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento, exercendo grande importância no silenciamento e regulação gênica. Consiste na adição covalente de um grupo metil no carbono 5' do anel de citosina, resultando em 5-metilcitosina. Em condições fisiológicas normais, a metilação é mantida pela enzima DNA-metiltransferase, como mecanismo regulatório para silenciamento de genes específicos (Egger *et al.*, 2004).

Regiões ricas em citosina e guanina, conhecidas como regiões CpG, são encontradas em regiões promotoras do DNA, e a hipermetilação dessas, está associada com o silenciamento transcricional de genes supressores do tumor (Ha e Califano, 2006). Atualmente, uma ilha CpG é definida como um fragmento de DNA maior do que 500pb, com um conteúdo de CG maior do que 55% e onde a razão entre o número de sítios CpG observado/esperado é superior a 0,65 (Takai e Jones, 2002). Estima-se que o número total de ilhas CpG no genoma humano seja de 37.729, sendo que 35% destas são mapeadas em regiões promotoras (Zhao & Han, 2009) (Figura 5).

A metilação de regiões CpG está associada à desacetilação das histonas, o que possivelmente induz à compactação da estrutura da cromatina, tornando-a inacessível aos fatores de transcrição gênica (Ng & Bird, 1999). O conhecimento dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens relacionadas à identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos para as doenças humanas, bem como de terapias alternativas capazes de reverter esses eventos que conduzem à proliferação celular anormal (Polo & Almouzni, 2005; Baylin & Ohm, 2006).

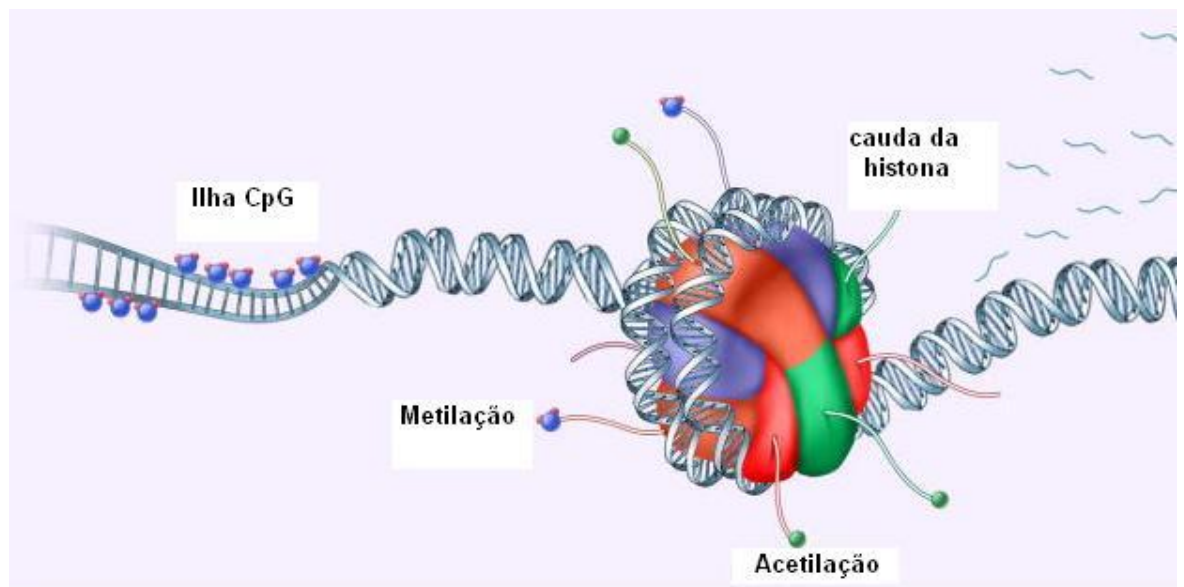


Figura 5. Mecanismos epigenéticos capazes de alterar a expressão gênica: Metilação do DNA e Acetilação de histonas. Adaptado de McCleary-Wheeler *et al.*, 2013.

Um dos primeiros estudos para investigar mecanismos epigenéticos em leiomiomas uterinos demonstrou uma hipometilação do DNA nesses tumores quando comparado ao tecido adjacente normal e foram observadas diferenças na expressão gênica e protéica das DNA metiltransferases, sugerindo que modificações pós-traducionais estão envolvidas no desenvolvimento dos miomas (Li *et al.*, 2003). Já em 2012, Navarro *et al.*, utilizando técnicas de sequenciamento do DNA, observaram em mulheres afro americanas diagnosticadas com leiomiomas uterinos que vários genes apresentavam metilação e expressão gênica alterada, sugerindo que a metilação do DNA possui um papel importante na tumorigênese desses tumores. Corroborando com esses achados, Maekawa *et al.* (2013) verificaram que o surgimento dos leiomiomas uterinos em mulheres japonesas poderia estar associado a alterações no padrão de metilação de múltiplas regiões promotoras de genes, grande parte se apresentando hipermetilado e conseqüentemente diminuindo a transcrição gênica.

2.6 Tratamentos dos leiomiomas uterinos

O tratamento atual dos miomas pode ser cirúrgico ou medicamentoso. Os tratamentos cirúrgicos mais comuns são a miomectomia que pode ser histeroscópica ou laparatômica, e a histerectomia, sendo este último o único capaz de eliminar totalmente os sintomas e as chances de recidiva (Guarnaccia & Rein, 2001; Corleta *et al.*, 2007). Algumas técnicas menos invasivas como a embolização de artérias uterinas e a destruição do mioma com ultrassom focado visam à conservação uterina, preservação da fertilidade e menor tempo de recuperação das pacientes (Khan *et al.*, 2014) no entanto, existem relatos de recidiva (Bhardwaj, 2012; Fischer *et al.*, 2015).

Já a terapia medicamentosa consiste em estratégias para minimizar os sintomas e o crescimento dos leiomiomas uterinos. A administração de agonistas do GnRH (Hormônio liberador das gonadotrofinas) tem efeitos benéficos na redução dos miomas e diminuição dos sintomas a curto prazo mas a administração contínua leva à inibição do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal causando efeitos de hipoestrogenismo graves. Os moduladores seletivos dos receptores de estrogênios (SERM) são moléculas que se ligam aos receptores de estrogênio, podendo ter ação agonista ou antagonista. Quando a atividade do estrogênio é bloqueada ocorre uma diminuição do tamanho do mioma, entretanto esses medicamentos podem acarretar em hiperplasia endometrial (Khan *et al.*, 2014).

2.6.1 Moduladores seletivos dos receptores de progesterona (MSRP)

São substâncias sintéticas derivadas dos esteróides que apresentam a capacidade de ocupar os receptores de progesterona e podem ter ação agonista, antagonista ou agonista-antagonista conforme o tecido alvo. O mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atuam na proliferação celular, angiogênese e apoptose (Silva & Lara, 2011; Khan *et al.*, 2014).

Alguns desses medicamentos estão em diferentes fases de ensaios clínicos, como a Mifepristona (RU486), Asoprisnil (J867) e o Acetato de Ulipristal (CDB 2914).

2.6.2 Mifepristona

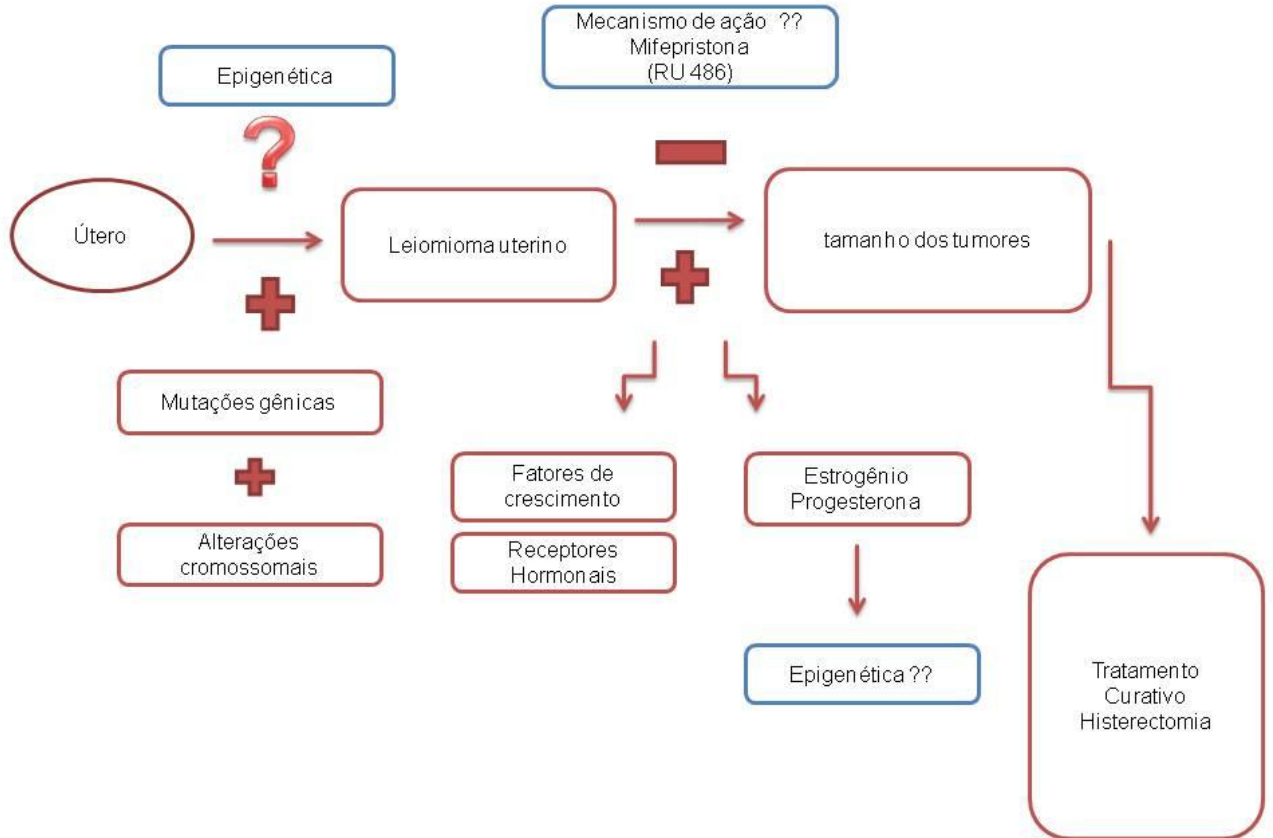
Foi sintetizada por volta de 1980 pelo cientista Étienne-Émile Baulieu com o intuito de ser utilizada primeiramente como pílula abortiva (Creinin, 2000).

A mifepristona é considerada um modulador seletivo dos receptores de progesterona e glicocorticoides apresentando meia-vida plasmática de 20 horas (Sheridan *et al.*, 1989). Atualmente tem sido utilizada no tratamento de leiomioma uterino e endometriose (Moller *et al.*, 2008). Estudos mostram que a mifepristona é capaz de diminuir o tamanho uterino e melhorar os sintomas relacionados a esses tumores (Esteve *et al.*, 2012).

A capacidade da mifepristona em reduzir o volume dos leiomiomas uterinos foi observada em pacientes submetidas ao tratamento por três meses nas doses de 25 e 50mg desse medicamento (Murphy & Castellano, 1993; Murphy *et al.*, 1995). Já na dose de 5mg administrada em pacientes com leiomioma uterino sintomático, houve uma redução significativa dos principais sintomas, como dor pélvica e sangramento excessivo (Feng *et al.*, 2010; Esteve *et al.*, 2012).

Em outros tipos celulares, a mifepristona também demonstrou ser capaz de diminuir a proliferação celular, como em câncer de mama, próstata, ovário, osteossarcoma e meningioma (Goyeneche *et al.*, 2007; Tieszen *et al.*, 2011).

3. Mapa conceitual



4. Justificativa

Os leiomiomas uterinos são tumores benignos do sistema reprodutor feminino originário das células musculares lisas do miométrio, possuindo como característica, um crescimento acelerado. Atingem cerca de 50% da população feminina e é a indicação mais frequente de histerectomia. Importante destacar que, nos Estados Unidos, são realizados aproximadamente 600 mil histerectomias ao ano, sendo 40% relacionadas com os leiomiomas uterinos resultando em um gasto de 2 bilhões de dólares. Os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese dos leiomiomas uterinos não estão determinados. É controverso se a ação dos esteroides sexuais inicia essa afecção ou se apenas promove o seu crescimento, que seria iniciado por outros processos, como por exemplo, mecanismos epigenéticos. Além disso, o crescimento dos leiomiomas é o resultado dinâmico entre a proliferação, diferenciação e a morte celular. Atualmente, tem sido proposto o uso de antiprogestágenos, como a mifepristona para controlar o crescimento dos miomas. Todavia, o crescimento dos tumores logo após o tratamento e os mecanismos de ação da mifepristona ainda não estão esclarecidos. Sendo assim, se torna necessário entender os efeitos moleculares da mifepristona em leiomiomas e investigar outros mecanismos moleculares que possam estar relacionados com seu o desenvolvimento e crescimento.

5. Objetivos

5.1 Principal

Avaliar mecanismos moleculares que possam contribuir para o crescimento tumoral e verificar o efeito do tratamento com mifepristona (RU-486) em leiomioma uterino e miométrio.

5.2 Específicos

Quantificar o processo de acetilação de histonas e metilação global do DNA em amostras teciduais de leiomioma uterino e miométrio;

Avaliar o efeito da mifepristona (RU 486) na expressão gênica dos receptores de progesterona total e B em cultura primária de leiomioma uterino e miométrio.

Avaliar a possível modulação dos hormônios estradiol e progesterona na expressão gênica dos receptores de progesterona em cultura primária de leiomiomas uterinos e miométrio.

Quantificar a atividade da histona acetiltransferase e desacetilase em cultura primária de leiomiomas uterinos e miométrio.

6. Referências

- Amant, F., Huys, E., Geurts-Moespot, A., Lindeque, B. G., Vergote, I., Sweep, F., & Schoenmakers, E. F. 2003. Ethnic variations in uterine leiomyoma biology are not caused by differences in myometrial estrogen receptor alpha levels. *J Soc Gynecol Investig*, 10(2): 105-109.
- Asada, H., Yamagata, Y., Taketani, T., Matsuoka, A., Tamura, H., Hattori, N., Ohgane, J., Shiota, K., & Sugino, N. 2008. Potential link between estrogen receptor-alpha gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod*, 14(9): 539-545.
- Barbarisi, A., Petillo, O., Di Lieto, A., Melone, M. A., Margarucci, S., Cannas, M., & Peluso, G. 2001. 17-beta estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway. *J Cell Physiol*, 186(3): 414-424.
- Bhardwaj, R. 2012. Uterine artery embolisation. *Indian Heart J*, 64(3): 305-308.
- Baylin, S. B. & Ohm, J. E. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6(2): 107-116.
- Borahay, M. A., Al-Hendy, A., Kilic, G. S., & Boehning, D. 2015. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Mol Med*, 21: 242-256.
- Cha, P. C., Takahashi, A., Hosono, N., Low, S. K., Kamatani, N., Kubo, M., & Nakamura, Y. 2011. A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nat Genet*, 43(5): 447-450.
- Chen, W., Ohara, N., Wang, J., Xu, Q., Liu, J., Morikawa, A., Sasaki, H., Yoshida, S., Demanno, D. A., Chwalisz, K., & Maruo, T. 2006. A novel selective progesterone receptor modulator asoprisnil (J867) inhibits proliferation and induces apoptosis in cultured human uterine leiomyoma cells in the absence of comparable effects on myometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(4): 1296-1304.

Conneely, O. M. & Lydon, J. P. 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*, 65(10-11): 571-577.

Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., & Lydon, J. P. 2003. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, 68(10-13): 771-778.

Corleta, H. V. E, Chaves, E. B. M., Krause, M. S., Capp, E. 2007. Tratamento atual dos miomas. *Rev. Bras Ginecol Obstet*, 29(6):.324-328.

Creinin, M. D. 2000. Medical abortion regimens: historical context and overview. *Am J Obstet Gynecol*, 183(2 Suppl): S3-9.

de Leval, L., Waltregny, D., Boniver, J., Young, R. H., Castronovo, V., & Oliva, E. 2006. Use of histone deacetylase 8 (HDAC8), a new marker of smooth muscle differentiation, in the classification of mesenchymal tumors of the uterus. *Am J Surg Pathol*, 30(3): 319-327.

Esteve, J. L., Acosta, R., Pérez, Y., Campos, R., Hernández, A. V., & Texidó, C. S. 2012. Treatment of uterine myoma with 5 or 10mg mifepristone daily during 6 months, post-treatment evolution over 12 months: double-blind randomised clinical trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 161(2): 202-208.

Englund, K., Blanck, A., Gustavsson, I., Lundkvist, U., Sjöblom, P., Norgren, A., & Lindblom, B. 1998. Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(11): 4092-4096.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990): 457-463.

Feng, C., Meldrum, S., & Fiscella, K. 2010. Improved quality of life is partly explained by fewer symptoms after treatment of fibroids with mifepristone. *Int J Gynaecol Obstet*, 109(2): 121-124.

- Fischer, K., McDannold, N. J., Tempany, C. M., Jolesz, F. A., & Fennessy, F. M. 2015. Potential of minimally invasive procedures in the treatment of uterine fibroids: a focus on magnetic resonance-guided focused ultrasound therapy. *Int J Womens Health*, 7: 901-912.
- Feinberg, A. P. & Tycko, B. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2): 143-153.
- Foley, D. L., Craig, J. M., Morley, R., Olsson, C. A., Olsson, C. J., Dwyer, T., Smith, K., & Saffery, R. 2009. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol*, 169(4): 389-400.
- Fiebitz, A., Fritsch, M., Reichelt, U., Ruester, C., Chiantera, V., Vercellino, G. F., Darwish, A., Schneider, A., & Mechsner, S. 2012. Optimized culture conditions for tissue explants of uterine leiomyoma. *Clin Lab*, 58(11-12): 1153-1164.
- Flake, G. P., Andersen, J., & Dixon, D. 2003. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect*, 111(8): 1037-1054.
- Guarnaccia, M. M. & Rein, M. S. 2001. Traditional surgical approaches to uterine fibroids: abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol*, 44(2): 385-400.
- Gomes, M. T. V, Castro, R. A, SILVA, I. D., C, G, Baracat, E. C, Lima, G. R, Girão, M. J. B. C. 2006. Análise da patogênese do leiomioma do útero. *FEMINA*, 34(6): 381-387.
- Goyeneche, A. A., Carón, R. W., & Telleria, C. M. 2007. Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 13(11): 3370-3379.
- Graham, J. D. & Clarke, C. L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18(4): 502-519.
- Grewal, S. I. & Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, 8(1): 35-46.
- Gonzalo, S. 2010. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol (1985)*, 109(2): 586-597.
- Ha, P. K. & Califano, J. A. 2006. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor

genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol*, 7(1): 77-82.

Handel, A. E., Ebers, G. C., & Ramagopalan, S. V. 2010. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med*, 16(1): 7-16.

Hardy, T. M. & Tollefsbol, T. O. 2011. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics*, 3(4): 503-518.

Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V. A., Kakazu, R., Bulun, S. E., & Kurita, T. 2010. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 151(6): 2433-2442.

Islam, M. S., Protic, O., Giannubilo, S. R., Toti, P., Tranquilli, A. L., Petraglia, F., Castellucci, M., & Ciarmela, P. 2013. Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(3): 921-934.

Jacobsen, B. M. & Horwitz, K. B. 2012. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol*, 357(1-2): 18-29.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., & Chambon, P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 9(5): 1603-1614.

Khan, A. T., Shehmar, M., & Gupta, J. K. 2014. Uterine fibroids: current perspectives. *Int J Womens Health*, 6: 95-114.

Kazantsev, A. G. & Thompson, L. M. 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 7(10): 854-868.

Kouzarides, T. 1999. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 9(1): 40-48.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705.

Kim, J. J., Kurita, T., & Bulun, S. E. 2013. Progesterone action in endometrial cancer,

endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev*, 34(1): 130-162.

Kumar, V., Abbas, A. K. 2005. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th edn, **Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders.**

Lee, H. J., Norwitz, E. R., & Shaw, J. 2010. Contemporary management of fibroids in pregnancy. *Rev Obstet Gynecol*, 3(1): 20-27.

Lee, E. J., Kong, G., Lee, S. H., Rho, S. B., Park, C. S., Kim, B. G., Bae, D. S., Kavanagh, J. J., & Lee, J. H. 2005. Profiling of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Cancer*, 15(1): 146-154.

Lethaby, A., Vollenhoven, B., & Sowter, M. 2001. Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD000547.

Li, S., Chiang, T. C., Richard-Davis, G., Barrett, J. C., & Mclachlan, J. A. 2003. DNA hypomethylation and imbalanced expression of DNA methyltransferases (DNMT1, 3A, and 3B) in human uterine leiomyoma. *Gynecol Oncol*, 90(1): 123-130.

Liu, C., Lu, Q., Qu, H., Geng, L., Bian, M., Huang, M., Wang, H., Zhang, Y., Wen, Z., Zheng, S., Zhang, Z. 2017. Different dosages of mifepristone versus enantone to treat uterine fibroids: A multicenter randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)*, 96 (7): e6124.

Lund, A. H. & van Lohuizen, M. 2004. Epigenetics and cancer. *Genes Dev*, 18(19): 2315-2335.

Lora, V., Grings, A. O., Capp, E., von Eye Corleta, H., & Brum, I. S. 2012. Gene and protein expression of progesterone receptor isoforms A and B, p53 and p21 in myometrium and uterine leiomyoma. *Arch Gynecol Obstet*, 286(1): 119-124.

Maekawa, R., Sato, S., Yamagata, Y., Asada, H., Tamura, I., Lee, L., Okada, M., Tamura, H., Takaki, E., Nakai, A., & Sugino, N. 2013. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*, 8(6): e66632.

Maruo, T., Ohara, N., Wang, J., & Matsuo, H. 2004. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update*, 10(3): 207-220.

Matsuo, H., Maruo, T., & Samoto, T. 1997a. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(1): 293-299.

McCleary-Wheeler, A. L., Lomberk, G. A., Weiss, F. U., Schneider, G., Fabbri, M., Poshusta, T. L., Dusetti, N. J., Baumgart, S., Iovanna, J. L., Ellenrieder, V., Urrutia, R., & Fernandez-Zapico, M. E. 2013. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett*, 328(2): 212-221

Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P. D., & Rogers, J. 2011. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 32(7): 1161-1180.

Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392(1): 49-53.

Mote, P. A., Johnston, J. F., Manninen, T., Tuohimaa, P., & Clarke, C. L. 2001. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*, 54(8): 624-630.

Murphy, A. A., Kettel, L. M., Morales, A. J., Roberts, V. J., & Yen, S. S. 1993. Regression of uterine leiomyomata in response to the antiprogestosterone RU 486. *J Clin Endocrinol Metab*, 76(2): 513-517.

Murphy, A. A., Kettel, L. M., Morales, A. J., Roberts, V., Parmley, T., & Yen, S. S. 1995. Endometrial effects of long-term low-dose administration of RU486. *Fertil Steril*, 63(4): 761-766.

Möller, C., Hoffmann, J., Kirkland, T. A., & Schwede, W. 2008. Investigational developments for the treatment of progesterone-dependent diseases. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(4): 469-479.

- Navarro, A., Yin, P., Monsivais, D., Lin, S. M., Du, P., Wei, J. J., & Bulun, S. E. 2012a. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One*, 7(3): e33284.
- Ng, H. H. & Bird, A. 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, 9(2): 158-163.
- Okolo, S. 2008. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 22(4): 571-588.
- Parker, W. H. 2007. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril*, 87(4): 725-736.
- Polo, S. E. & Almouzni, G. 2005. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Lett*, 220(1): 1-9.
- Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., & Horwitz, K. B. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 277(7): 5209-5218.
- Rodenhiser, D. & Mann, M. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 174(3): 341-348.
- Ropero, S. & Esteller, M. 2007. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*, 1(1): 19-25.
- Roth, T. M., Klett, C., & Cowan, B. D. 2007. Expression profile of several genes in human myometrium and uterine leiomyoma. *Fertil Steril*, 87(3): 635-641.
- Sabry, M. & Al-Hendy, A. 2012. Innovative oral treatments of uterine leiomyoma. *Obstet Gynecol Int*, 2012: 943635.
- Sankaran, S. & Manyonda, I. T. 2008. Medical management of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 22(4): 655-676.

- Shakespeare, M. R., Halili, M. A., Irvine, K. M., Fairlie, D. P., & Sweet, M. J. 2011. Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol*, 32(7): 335-343.
- Sheridan, P. L., Evans, R. M., & Horwitz, K. B. 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem*, 264(11): 6520-6528.
- Silva, A.C.J.S.R., Lara, L.A.S. 2011. Moduladores seletivos dos receptores de progesterona: revisão de literatura. *FEMINA*, 39(12): 543-548.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765): 41-45.
- Standring, S. and Gray, H. 2008. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice, *Elsevier*, 40th edn Edinburgh.
- Schuchard, M., Landers, J. P., Sandhu, N. P., & Spelsberg, T. C. 1993. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev*, 14(6): 659-669.
- Stewart, E. A. 2001. Uterine fibroids. *Lancet*, 357(9252): 293-298.
- Takai, D. & Jones, P. A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3740-3745.
- Taunton, J., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272(5260): 408-411.
- Turner, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3): 285-291.
- Tieszen, C. R., Goyeneche, A. A., Brandhagen, B. N., Ortbahn, C. T., & Telleria, C. M. 2011. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer*, 11: 207.
- Verdone, L., Agricola, E., Caserta, M., & Di Mauro, E. 2006. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(3): 209-221.

- Zhao, Z. & Han, L. 2009. CpG islands: algorithms and applications in methylation studies. *Biochem Biophys Res Commun*, 382(4): 643-645.
- Waggoner, D. 2007. Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol*, 14(1): 7-14.
- Wei, L. H., Tornø, P. L., Hsiao, S. M., Jeng, Y. M., Chen, M. W., & Chen, C. A. 2011. Histone deacetylase 6 regulates estrogen receptor alpha in uterine leiomyoma. *Reprod Sci*, 18(8): 755-762.
- Willis-Martinez, D., Richards, H. W., Timchenko, N. A., & Medrano, E. E. 2010. Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer. *Exp Gerontol*, 45(4): 279-285.
- Yoo, Y. G., Kong, G., & Lee, M. O. 2006. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J*, 25(6): 1231-1241.
- Yin, P., Roqueiro, D., Huang, L., Owen, J. K., Xie, A., Navarro, A., Monsivais, D., Coon, J. S., Kim, J. J., Dai, Y., & Bulun, S. E. 2012. Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS One*, 7(1): e29021.

7. Artigo 1

ORIGINAL ARTICLE

Ovarian steroid hormones modulate the expression of progesterone receptors and histone acetylation patterns in uterine leiomyoma cells.

Gabriela dos Santos Sant'Anna^{1,2,3}, Ilma Simoni Brum^{2,3}, Gisele Branchini^{2,3,4}, Lolita Schneider Pizzolato^{2,3}, Edison Capp^{2,3,5}, and Helena von Eye Corleta^{1,2,3,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ² Laboratório de biologia molecular endócrino e tumoral, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ⁴ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, and ⁵ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina da UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

DOI: [10.1080/09513590.2017.1301924](https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1301924)

Abstract

Uterine leiomyomas are the most common benign smooth muscle cell tumors in women. Estrogen (E₂), progesterone (P₄) and environmental factors play important roles in the development of these tumors. New treatments, such as mifepristone, have been proposed. We evaluated the gene expression of total (PRT) and B (PRB) progesterone receptors, and the histone acetyltransferase (HAT) and deacetylase (HDAC) activity after treatment with E₂, P₄ and mifepristone (RU486) in primary cell cultures from uterine leiomyoma and normal myometrium. Compared to myometrium, uterine leiomyoma cells showed an increase in PRT mRNA expression when treated with E₂, and increase in PRB mRNA expression when treated with E₂ and P₄. Treatment with mifepristone had no significant impact on mRNA expression in these cells. The HDAC activity was higher in uterine leiomyoma compared to myometrial cells after treatment with E₂ and E₂ + P₄ + mifepristone. HAT activity was barely detectable. Our results suggest that ovarian steroid hormones modulate PR, and mifepristone was unable to decrease PRT and PRB mRNA. The higher activity of HDAC leiomyoma cells could be involved in transcriptional repression of genes implicated in normal myometrium cell function, contributing to the maintenance and growth of uterine leiomyoma.

Keywords Estradiol, histone deacetylase activity, mifepristone, progesterone, uterine leiomyoma.

Introduction

Uterine leiomyoma, also known as fibroids, is a benign smooth muscle cell tumor of the myometrium, and is clinically apparent in up to 25–30% of reproductive-age women [1–3]. The common symptoms associated with uterine leiomyomas are irregular and excessive bleeding, pelvic pain, infertility and recurrent abortion. In addition, uterine leiomyoma is the most common indication for hysterectomy [4,5].

Although the etiology of these tumors is still unknown, it is agreed that growth is affected by the concentrations of sex hormones, especially estrogen and progesterone [6–8]. Conventionally, estrogen has been considered a primary growth promoter of uterine leiomyomas but evidence suggests a critical role for progesterone in the pathogenesis of this tumor [7, 9]. In vitro studies have demonstrated that progestin can contribute similar growth-promoting effects to estrogen on primary cultures of human uterine leiomyoma cells [10–12]. There are two predominant progesterone receptor (PR) isoforms, designated PRA and PRB [13, 14]. These receptors are both ligand-activated transcription factors, but they exhibit distinct biological functions. PRB acts as a transcriptional activator of progesterone-responsive genes [15], whereas PRA acts as a ligand-dependent repressor of PRB transcriptional activity [16]. Moreover, PRA and PRB have been identified in uterine leiomyoma and myometrium [8]. Some studies show a significant increase in total progesterone receptors (PRT) in uterine leiomyoma compared to normal myometrium [17,18] and the over-expression of PRB mRNA was described in uterine leiomyoma suggesting that this predominant expression reveals an activated phenotype of progesterone-stimulated proliferation related to the growth of this tumor [17]. Furthermore, environmental factors, such as high body mass index, early menarche and ethnicity appear to be involved in the development of uterine leiomyoma [3].

Epigenetic modifications regulate gene expression in eukaryotes and may also be affected by the environment, making them potentially important mechanisms in complex multifactorial diseases. One of the best characterized epigenetic modifications is histone acetylation patterns, which are maintained by specific combinations of two enzymes: histone acetyltransferase (HAT) that catalyzes the addition of acetyl groups to lysine residues on amino-terminal tails of histones and histone deacetylase (HDAC) that removes these acetyl groups [19, 20]. HDAC is associated with gene silencing, whereas HAT is associated with

transcriptional activity [21].

Several studies emphasize the important contribution of epigenetics in the development of uterine leiomyoma [22–25]. The understanding of molecular mechanisms involved in the development of uterine leiomyoma may provide opportunities for the diagnostic and well as generation of novel therapeutic approaches.

Treatment options for uterine leiomyoma consist of surgical, medical and interventional therapy. Hysterectomy is a definitive treatment; however, given that uterine leiomyoma is the most common type of tumor in women of reproductive age, the treatment of uterine leiomyoma must prioritize uterine conservation [6]. There are several drugs for medical treatment and mifepristone (RU486), a synthetic steroid that has affinity for progesterone and glucocorticoid receptors [26] has been reported to induce regression of uterine leiomyoma and reduce the symptoms [1,9,27,28].

Therefore, the aim of this study was to examine the expression of total and B progesterone receptors, HAT/HDAC activity and the effect of mifepristone in primary cell cultures of uterine leiomyoma after treatment with estrogen and progesterone.

Methods

Tissue collection and cell culture

Human uterine leiomyoma and normal myometrial tissues were obtained at surgery from seven premenopausal women (mean age 43 years); following the protocol approved by Ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. All subjects showed intramural tumors. The subjects had not received any hormonal treatment during the 6 months prior to surgery. To perform the cell culture, the samples were minced into small pieces and treated with collagenase. The dissociated cells were transferred into cell culture flasks and maintained in F12 medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% kanamycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and cultured in 5% CO₂ at 37° C. Cultures were isolated with trypsin-EDTA (SIGMA, Saint Louis, MO) after reaching 80% confluence.

Confocal imaging of immunofluorescence staining

Actin filaments and myosin proteins control several cellular processes in human cells, including uterine muscle contraction. Alpha smooth muscle actin (α SMA) and myosin are cytoskeletal proteins and markers of vascular smooth muscle cells.

Uterine leiomyoma and myometrium cells were cultured and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Fixed cells were incubated with a monoclonal rabbit anti-alpha actinin primary antibody (Abcam RabMab technology, Cambridge, MA) and mouse myosin heavy chain primary antibody (SIGMA, Saint Louis, MO) at 4 °C overnight, followed by incubation with Alexa Fluor 660 (green fluorescence) and Alexa Fluor 488 (red fluorescence) secondary antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA) at room temperature for 1 h. Next, cells were counterstained with 100 ng/ml 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; SIGMA, Saint Louis, MO) for 30 min. All samples were stained and observed on the same day using identical imaging conditions. Confocal images were taken on an Olympus Fluo View FV1000 Confocal Microscope (Olympus Corporation, Center Valley, PA). All images were taken with a zoom of 1.5, a 3.2 ms pixel dwell time, and a 0.29 mm pixel size, with line averaging set to 4.

Drug treatment

In order to determine the effects of mifepristone (SIGMA, Saint Louis, MO) and the impact of estradiol (SIGMA, Saint Louis, MO) and progesterone (SIGMA, Saint Louis, MO) on the gene expression of PRs and histone acetylation patterns, the cultured cells were divided into the following groups: estradiol 10^{-8} M (E_2); progesterone 10^{-6} M (P_4); estradiol 10^{-8} M + progesterone 10^{-6} M ($E_2 + P_4$); estradiol 10^{-8} M + progesterone 10^{-6} M + mifepristone 10^{-6} M ($E_2 + P_4 +$ mifepristone). All treatments were performed for 7d, as previously standardized in our laboratory.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted using the reagent Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were lysed directly in wells containing 1 mL of Trizol per 10 cm^2 . The extraction followed the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified by the Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE).

Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 0.5 mg of total RNA with oligo (DT) primers, using the Superscript III First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. For quantitative analysis of messenger RNAs (mRNAs) by RT-PCR, we used Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA samples were amplified on the StepOnePlus™ Real time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a total volume of 12.5 mL. A serial dilution of cDNA pool of samples from group considered as the control condition (cells treated with estradiol 10^{-8} M + progesterone 10^{-6} M) was used to perform a standard curve to achieve the relative quantification of target mRNA. The amount of target mRNAs was normalized by beta-2-microglobulin mRNA expression ($\beta 2m$) and the results are expressed as arbitrary units (target mRNA/ $\beta 2m$ mRNA).

Primer design

Primers were designed and synthesized by IDT (IDT, Integrated DNA Technologies, Coraville, IA). The sequences are the following: Progesterone Receptor "total" (PRtotal): forward 5' ACCCGCCCTATCTCAACTACC 3', reverse 5' AGGACA CCATAATGACAGCCT 3'; Progesterone receptor B (PRB): forward 5' CCACATTCAACACCCACTTTC 3', reverse 5' TGCCTTCAGCTCAGTCATG 3'; beta-2-microglobulin ($\beta 2m$): forward 5' CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3', reverse 5' ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'

Nuclear protein extraction and histone acetylation/ deacetylation

Nuclear extract was isolated using a commercial kit (Nuclear Extraction kit; EMD Millipore Corporation, Temecula, CA). Global HDAC activity was determined using a HDAC assay kit (Fluorimetric detection, catalog #17-372, Upstate Biotechnology, Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were incubated with the HDAC assay substrate at 30°C for 45 min prior addition of the activator solution. Samples were then incubated for 10 min at room temperature. HDAC activity was measured on a microplate reader (excitation = 360nm, emission = 450nm) and expressed as pmoles of HDAC per mg of protein.

HAT activity was determined using a HAT Activity Colorimetric Assay Kit (Colorimetric detection, catalog #EPI001, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. Briefly, nuclear extract proteins (50 mg) were incubated for 3 h at 37°C with buffers, substrates and a NADH-generating enzyme. Enzyme activity was measured on a microplate reader (optical density (OD) = 440 nm) and expressed as relative OD per mg of protein.

Statistical analysis

The PR expression and HAT/HDAC activity were statistically analyzed using the generalized estimating equation (GEE). This test allows the analysis of situations in which the individuals or subjects are independent but the information about a variable is collected several times over a period of time or in situations in which a subject is submitted to different analysis groups, considering that the observations are correlated [29,30]. In cells culture studies, the analysis groups are derived from the same cells, and then cannot be treated independently.

The data was expressed as the mean \pm SD. A difference with a $p < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using SPSS version 18.0 (IBM Corporation, Armonk, North Castle, NY).

Results

Confocal immunofluorescence staining

The confocal immunofluorescence confirmed that cultured myometrial cells and uterine leiomyoma cells were derived from smooth muscle cells. The nucleus was stained in blue, myosin filaments in red and actin filaments in green (Figure 1).

Effects of estradiol, progesterone and mifepristone on gene expression of progesterone receptors

The cultured cells treated with estradiol (E_2), progesterone (P_4) and mifepristone were analyzed. The uterine leiomyoma cells showed an increase in PRT mRNA expression,

compared to myometrium, when treated with E₂ (p = 0.028). Treatment with mifepristone had no significant impact on mRNA expression in either cell type (Figure 2A).

In the presence of the ovarian sex steroid hormones E₂ and P₄, uterine leiomyoma cells demonstrated an increase in the mRNA expression of PRB compared to myometrial cells (p = 0.001). Furthermore, we observed that treatment with E₂ + P₄ + mifepristone did not decrease the PRB mRNA expression in these cells (Figure 2B).

Effects of ovarian steroid hormones in HAT/HDAC patterns

Preliminary data showed that the expression of HAT was barely detectable in uterine leiomyoma cells, and, therefore, this study focused on HDAC activity. The HDAC activity was significantly higher in uterine leiomyoma cells, as compared to myometrium cells, when treated with E₂ (p = 0.034) or E₂ + P₄ + mifepristone (p = 0.01) (Figure 3).

Discussion

Uterine leiomyomas are benign smooth muscle tumors originating from the myometrium and are clinically apparent in up to 25% of women of reproductive age. Several factors, including estradiol, progesterone and epigenetics mechanisms, have been implicated in uterine leiomyoma development and growth [1].

Evidence supports the concept that ovarian steroid sex hormones play a critical role in the regulation of uterine leiomyoma growth [7, 8]. Ishikawa et al. [9] suggest that estradiol is required for up-regulation of progesterone receptors. This study demonstrated that uterine leiomyoma cells are associated with significantly increased expression of PRT mRNA when treated with estradiol. Furthermore, PRB mRNA was higher in uterine leiomyoma cells, when compared with normal myometrium, after treatment with estradiol and progesterone (p = 0.001). Mifepristone was not able to decrease this expression. Tsigkou et al. [31] found higher content of PRB mRNA and similar levels of PRT mRNA in uterine leiomyoma compared with myometrial tissue. They postulated that these tumor cells produce lower amounts of truncated PR mRNA transcripts and splice variants, so that PRT mRNA does not increase despite the higher levels of PRB.

Medications used to treat uterine leiomyoma, such as mifepristone, a synthetic steroid that has affinity for progesterone and glucocorticoid receptors [26], are assumed to induce apoptosis and inhibit proliferation. Most clinical studies demonstrate the efficacy of mifepristone in reducing the symptoms and decreasing the size of uterine leiomyomas [1, 6, 32] but little research has focused on the mechanism of action of mifepristone against these tumors. Tieszen et al. [33] showed that mifepristone was able to inhibit the growth of cancer cells derived from breast, ovary, prostate, bone and nervous system. However, most of these cells did not express the nuclear progesterone receptor, suggesting that mifepristone acts through non-classical mechanisms; whereby, mifepristone operates as a cell growth inhibitor without a need for the presence or function of nuclear PRs. Moreover, Ishikawa and collaborators [9] demonstrated, in a uterine leiomyoma xenograft model, that tumor volume was significantly higher in the presence of estradiol and progesterone and the growth-promoting effect of these hormones was blocked by co-administration of mifepristone, suggesting the requirement of both estradiol and progesterone for human uterine leiomyoma growth. Studies have demonstrated that PRB is a strong transactivator in response to progesterone, whereas PRA is less active and in most cases inhibits the transcriptionally active PRB [34,35]. Our data demonstrates that estradiol and progesterone modulate the expression of PRs and mifepristone is not able to decrease the expression of PRT or PRB mRNA. It is possible that mifepristone preferentially binds PRA, but this hypothesis is untested. According to Patel and colleagues [8], PRA mRNA cannot be directly measured by quantitative RT-PCR-based techniques due to the common sequences of PRA and PRB.

Moreover, epigenetic mechanisms play a central role in the development of uterine leiomyoma tumors [24, 36] and we found that HDAC activity was higher in uterine leiomyoma cells after treatment with estradiol. Many HDACs exist as components of multiprotein complexes, which target specific genomic regions through interactions with binding factors that include transcriptions factors, nuclear receptors and others epigenetic modifier genes. The regulation of gene expression by HDACs can be mediated by nuclear receptors, especially estrogen receptors (ER) that belong to a large superfamily of nuclear receptors [37]. Several studies suggest posttranslational modifications are involved in the pathogenesis of uterine leiomyoma [22, 38, 39]; however, little is known about the mechanisms and functions of epigenetics in uterine leiomyoma formation. Kawai and coworkers [38] demonstrated that HDAC1 can interact with estrogen receptor α and suppresses its transcriptional activity and Macaluso et al. [39] showed that ER-gene transcription is regulated by a multiprotein complex that includes HDACs, DNA

methyltransferases and retinoblastoma protein Rb. Furthermore, HDAC6 appears to be involved in the regulation of ER α expression in uterine leiomyoma. However, this histone deacetylase does not regulate chromatin remodeling because it is located in the cytoplasm where it regulates microtubules and protein degradation. When HDAC6 expression was silenced using small interfering RNA (siRNA), there was a significant reduction in ER α protein but not mRNA levels, consistent with HDAC6 function regulating protein degradation [22].

In our study, we found a higher HDAC activity in uterine leiomyoma cells. Due to the interaction of this protein with several nuclear receptors, such as ER, it is possible that this higher activity could lead to transcriptional repression of genes involved in normal myometrium cell function, and thus contribute to the maintenance and growth of uterine leiomyoma.

Our results suggest that ovarian steroid hormones increase progesterone receptors expression and mifepristone at dose of 10^{-6} M is not able to decrease PRT and PRB mRNA levels in uterine leiomyoma cells. Moreover, HDAC activity was increased in the presence of estrogen. Given that this enzyme is responsible for decreased gene transcription, this finding may lead to the development of new strategies for treatment of this disorder.

Acknowledgments

This work was supported in part by Fundo de Incentivo á Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest

References

1. Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, et al. Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:921–34.
2. Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, et al. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *J Reprod Med* 1996;41:483–90.
3. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007; 87:725–36.
4. Evans P, Brunzell S. Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2007;75:1503–8.
5. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001; 357:293–8.
6. Chung YJ, Chae B, Kwak SH, et al. Comparison of the inhibitory effect of gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist, selective estrogen receptor modulator (SERM), antiprogestosterone on myoma cell proliferation in vitro. *Int J Med Sci* 2014;11:276–81.
7. Maruo T, Ohara N, Wang J, et al. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2004;10: 207–20.
8. Patel B, Elguero S, Thakore S, et al. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update* 2015;21:155–73.
9. Ishikawa H, Ishi K, Ann Serna V, et al. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* 2010;151:2433–42.
10. Barbarisi A, Petillo O, Di Lieto A, et al. 17-beta estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2001; 186:414–24.

11. Chen W, Ohara N, Wang J, et al. A novel selective progesterone receptor modulator asoprisnil (J867) inhibits proliferation and induces apoptosis in cultured human uterine leiomyoma cells in the absence of comparable effects on myometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1296–304.
12. Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:293–9.
13. Giangrande PH, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 1999;54: 291–313.
14. Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two function-ally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* 1990;9:1603–14.
15. Wen DX, Xu YF, Mais DE, et al. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:8356–64.
16. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, et al. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7:1244–55.
17. Fujimota J, Hirose R, Ichigo S, et al. Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma. *Tumour Biol* 1998;19:126–31.
18. Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, et al. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 1997;12:815–22.
19. Verdone L, Agricola E, Caserta M, et al. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006;5:209–21.

20. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
21. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003;278:4035–40.
22. Wei LH, Torng PL, Hsiao SM, et al. Histone deacetylase 6 regulates estrogen receptor alpha in uterine leiomyoma. *Reprod Sci* 2011;18: 755–62.
23. Greathouse KL, Bredfeldt T, Everitt JI, et al. Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 546–57.
24. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the patho-genesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One* 2013;8: e66632.
25. Yang Q, Mas a, Diamond MP, et al. The mechanism and function of epigenetics in uterine leiomyoma development. *Reprod Sci* 2015;23: 163–75.
26. Mahajan DK, London SN. Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril* 1997;68:967–76.
27. Murphy AA, Kettel LM, Morales AJ, et al. Regression of uterine leiomyomata in response to the antiprogestosterone RU 486. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:513–7.
28. Bagaria M, Suneja A, Vaid NB, et al. Low-dose mifepristone in treatment of uterine leiomyoma: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009; 49: 77–83.
29. Guimarães LSP, Hirakata VN. Uso de modelo de equações de estimativas generalizadas na análise de dados longitudinais. *Rev HCPA* 2012;32:503–11.
30. Twisk JWR. Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis. *Eur J Epidemiol* 2004;19:769–76.

31. Tsigkou A, Reis FM, Lee MH, et al. Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertil Steril* 2015; 104:170–5.
32. Esteve JLC, Acosta R, Pe´rez Y, et al. Mifepristone versus placebo to treat uterine myoma: a double-blind, randomized clinical trial. *Int J Womens Health* 2013; 5:361–9.
33. Tieszen CR, Goyeneche A, Brandhagen BN, et al. Antiprogesterin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer* 2011;11:207.
34. Pieber D, Allport VC, Hills F, et al. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* 2001;7:875–9.
35. Merlino AA, Welsh TN, Tan H, et al. Nuclear progesterone receptors in the human pregnancy myometrium: evidence that parturition involves functional progesterone withdrawal mediated by increased expression of progesterone receptor-A. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1927–33.
36. Navarro A, Yin P, Monsivais D, et al. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One* 2012;7:e33284.
37. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007; 1:19–25.
38. Kawai H, Li H, Avraham S, et al. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer* 2003; 107: 353–8.
39. Macaluso M, Cinti C, Russo G, et al. pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene* 2003; 22:3511–7.

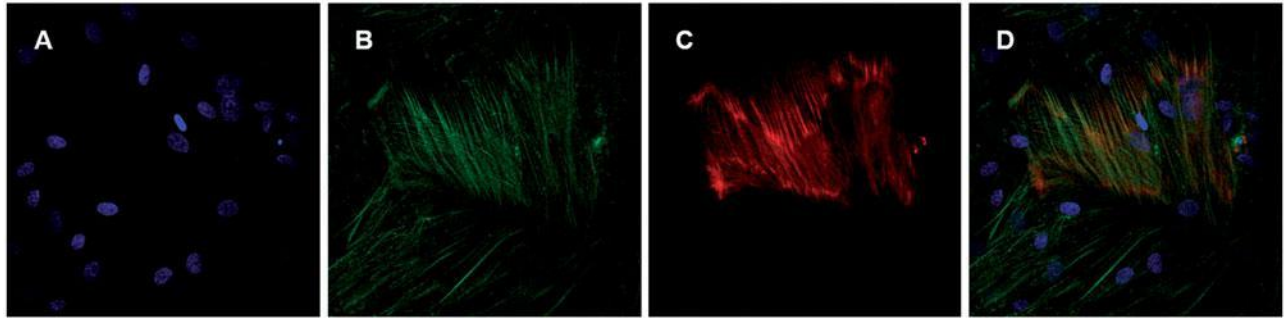
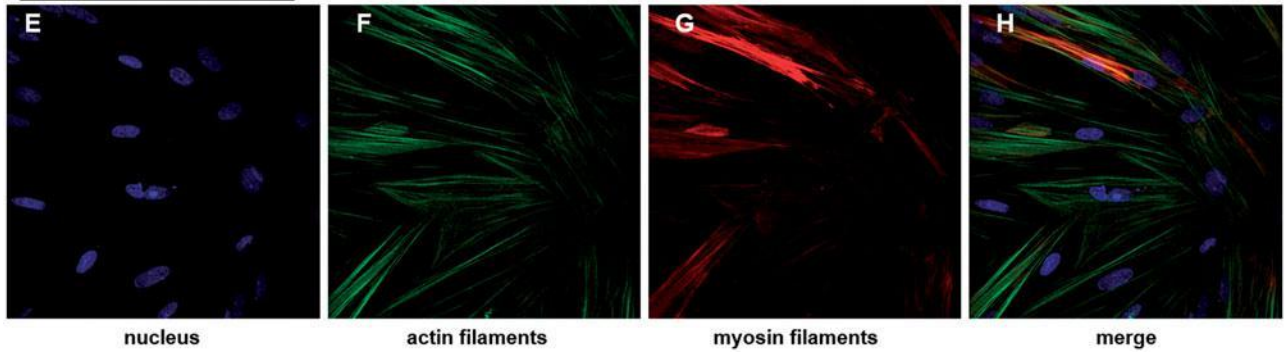
Myometrium cells**Uterine leiomyoma cells**

Figure 1. Immunofluorescent staining analysis of myometrium and uterine leiomyoma cells. Blue staining for nucleus (A, E). Green staining for actin filaments (B, F). Red staining for myosin filaments (C, G). Merge (D, H).

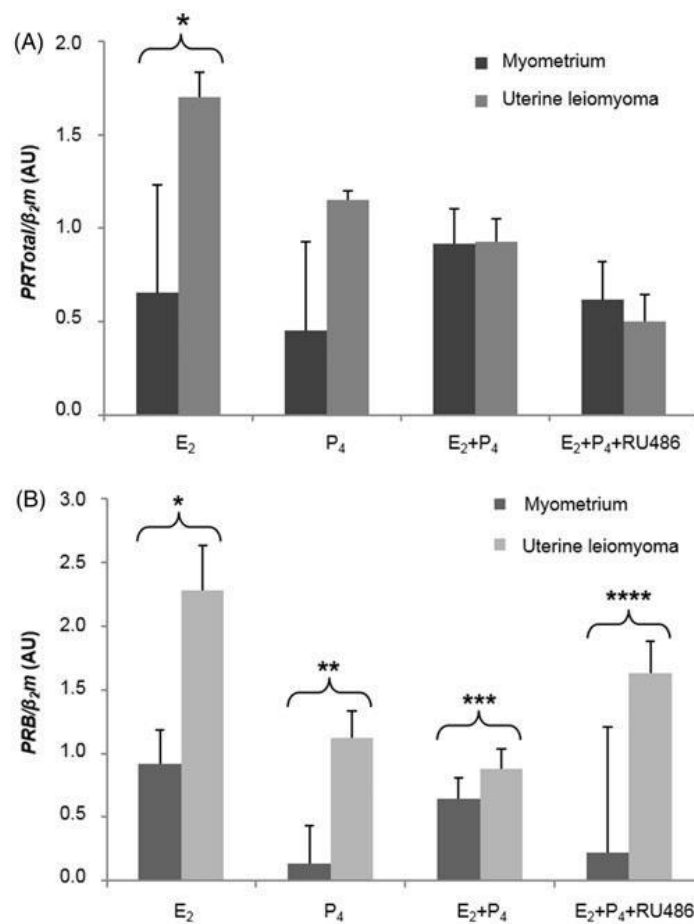


Figure 2. Gene expression of PR in uterine leiomyoma and myometrium cells. A. PRT expression in uterine leiomyoma cells increased when treated with E₂ (p = 0.028). B. The graph shows an increased PRB expression in uterine leiomyoma cells compared with the myometrium for all treatments. E₂ and P₄ increased mRNA expression of PRB (p = 0.001) and the mifepristone (RU486) does not reduce this expression.

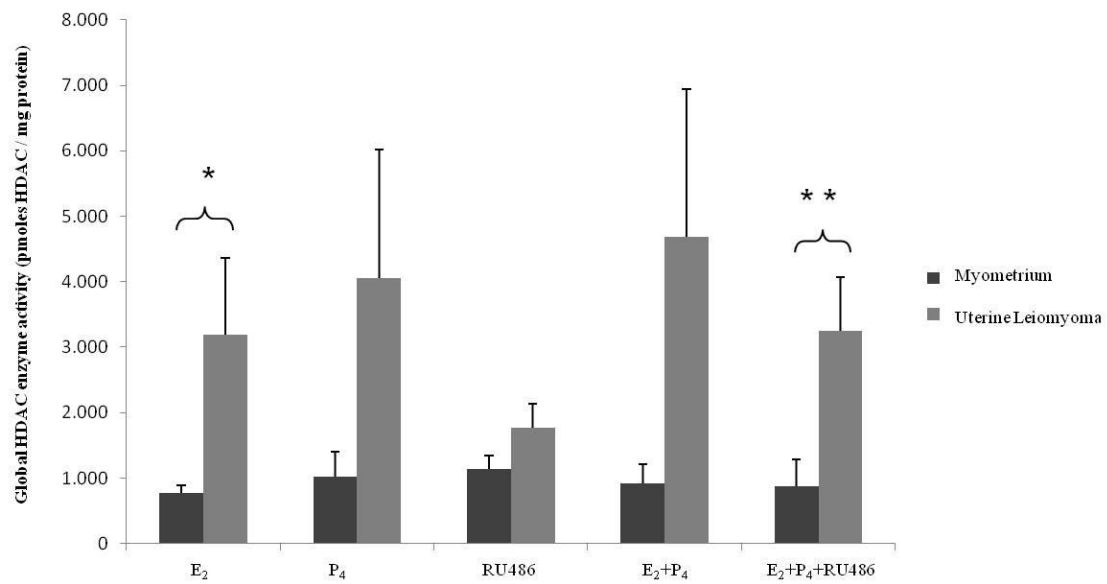


Figure 3. HDAC activity in uterine leiomyoma cells and myometrium. The HDAC activity was higher in uterine leiomyoma when compared to the myometrium in E₂ alone ($p = 0,034$) and E₂ + P₄ + mifepristone (RU 486) ($p = 0,001$) group.

8. Artigo 2

ORIGINAL ARTICLE

Submitted to Gynecologic and Obstetric Investigation

DNA hypermethylation and histone hypoacetylation in uterine leiomyoma.**Gabriela dos S. Sant'Anna^{1,2,3}; Ilma S. Brum^{1,2,5}; Edison Capp^{1,2,5}; Gisele Branchini,⁴; Lolita Schneider Pizzolato^{1,2}; Helena von E. Corleta^{1,3,5}**¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.² Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,Brazil.³ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil.⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.**Corresponding author:****Gabriela Sant'Anna****Universidade Federal do Rio Grande do Sul****Rua Sarmiento Leite, 500.****CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS.****E-mail address: gabriela.sant@ufrgs.br****Tel: +55 51 3308-3559**

Abstract

Background: Uterine leiomyomas are benign monoclonal tumors that originate from myometrial smooth muscle cells. There is evidence that epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone modifications are important in the development of uterine leiomyomas. Therefore, our aim was to evaluate global DNA methylation and histone acetylation/deacetylation in uterine leiomyoma and myometrial tissue. **Methods:** Paired specimens of leiomyoma uterine and myometrium were obtained from 25 women and purified genomic DNA (200 ng) was used for global DNA methylation measurement. Global HDAC activity was determined using a HDAC assay kit (Fluorimetric detection) and HAT activity was determined using a HAT Activity Colorimetric Assay Kit. **Results:** We found greater global DNA hypermethylation ($p = 0.022$) and histone hypoacetylation ($p = 0.04$) in uterine leiomyoma in comparison with myometrium. Histone acetylation activity was not statistically different between tissues ($p = 0.08$). **Conclusion:** Both DNA methylation and histone deacetylation may contribute to gene silencing. In our study, we found that hypermethylation was associated with hypoacetylation and could lead to transcriptional repression of genes involved in normal myometrium cell function, and thus contribute to maintenance and growth of uterine leiomyoma. Our results suggest that epigenetic have a role in the development of uterine leiomyomas.

Keywords: Uterine leiomyoma, global DNA methylation, histone acetylation, histone deacetylation.

Introduction

Uterine leiomyomas (fibroids) are benign monoclonal tumors that originate from myometrial smooth muscle cells in the uterus [1, 2]. It is the most common gynecological tumor in women of reproductive age and is symptomatic in 30% of women [3]. Clinical symptoms include abnormal uterine bleeding, pelvic pressure and pain, reduced fertility, and frequent pregnancy loss. In addition, uterine leiomyoma is the most common indication for hysterectomy [4, 5]. Risk factors for uterine leiomyoma include high body mass index, early menarche, and ethnicity. On the other hand, exercise, use of hormonal contraception, smoking, and giving birth are associated with a decreased risk of uterine leiomyoma [2]. These findings suggest that both genetic and environmental factors are involved in the development of uterine leiomyoma.

Epigenetic modifications regulate gene expression in eukaryotes. Modifications such as DNA methylation and histone modification have important roles in gene imprinting and human carcinogenesis [6, 7]. The most common epigenetic mark is DNA methylation, which has an important role in the regulation of gene expression. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases, which covalently add a methyl group to the 5'-carbon of the cytosine ring within the context of CpG dinucleotides [8].

Histone acetyltransferases (HATs) catalyze the addition of acetyl groups to lysine residues on amino-terminal tails of histones; conversely, histone deacetylases (HDACs) remove these acetyl groups [9]. Histone deacetylases recognize methylated DNA and promote chromatin packaging, silencing the gene expression [10, 11].

The DNA methylation pattern of uterine leiomyoma and myometrium is controversial; one study found that uterine leiomyoma was hypomethylated compared with myometrium [12],

whereas other studies found the opposite pattern [13, 14]. In addition, little is known about patterns of histone acetylation and deacetylation in this type of tumor.

To clarify these findings, our aim was to investigate global DNA methylation and histone acetylation/deacetylation in uterine leiomyoma.

Material and methods

Tissue collection

Human uterine leiomyoma and normal myometrial tissues were obtained at surgery from 25 premenopausal women (mean age 43 years); following the protocol approved by Ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. All subjects showed intramural tumors.

DNA extraction and global DNA methylation

DNA was extracted from cells using a commercial kit (GenElute®Mammalian Genomic DNA Miniprep kit; Sigma-Aldrich, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified genomic DNA (200 ng) was used for global DNA methylation measurement.

Levels of tissue global DNA methylation were obtained with an ELISA-based commercial kit (MDQ1, Imprint® Methylated DNA quantification kit, Sigma-Aldrich, MO, USA). Quantification of global DNA methylation was obtained by calculating the amount of methylated cytosine in the sample (5 mC) relative to global cytidine in a methylated positive control. All samples were analyzed in duplicate.

Nuclear protein extraction and histone acetylation

Nuclear extract was isolated using a commercial kit (Nuclear Extraction kit; EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA).

Global HDAC activity was determined using a HDAC assay kit (Fluorimetric detection, catalog #17-372, Upstate Biotechnology, Temecula, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were incubated with the HDAC assay substrate at 30°C for 45 minutes prior to addition of the activator solution. Then, samples were incubated for 10 minutes at room temperature. HDAC activity was measured on a microplate reader (excitation = 360 nm, emission = 450 nm) and expressed as pmoles of HDAC per mg of protein.

HAT activity was determined using a HAT Activity Colorimetric Assay Kit (Colorimetric detection, catalog #EPI001, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, nuclear extract proteins (50 µg) were incubated for three hours at 37°C with buffers, substrates and NADH-generating enzyme. Enzyme activity was measured on a microplate reader (optical density (OD) = 440 nm) and expressed as relative OD per µg of protein.

Statistical analysis

For global DNA methylation, differences between groups were analyzed by the Student's t-test. A Wilcoxon test was used to analyze HAT and HDAC activity between tissues. Significance was accepted at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS 20 (Statistical Package for the Social Science).

Results

Global DNA methylation

Global DNA methylation was higher in uterine leiomyoma (46.85%) (hypermethylation) compared with myometrium tissue (24.95%) ($p = 0.022$) (Figure 1).

HAT and HDAC activity

HAT activity was not statistically different between uterine leiomyoma and myometrium ($p = 0.08$) (Figure 2). HDAC activity was higher (hypoacetylation) in uterine leiomyoma compared with the myometrium ($p = 0.04$) (Figure 3).

Discussion

“Epigenetics” is a term used to describe heritable alterations in gene expression without alterations in DNA sequence; such alterations regulate the dynamics of gene expression and play a crucial role in embryonic development, tissue differentiation, imprinting, neurodegenerative disease and cancer [11, 15, 16].

One of the first studies to investigate epigenetic mechanisms in uterine leiomyoma found global DNA hypomethylation in leiomyoma compared with myometrium. Differences in DNMTs (DNA methyltransferases) expression were also observed, suggesting post-translational DNA modifications were involved in leiomyoma development [12]. Similar to recent reports, we showed higher global DNA methylation in uterine leiomyoma compared with myometrium. One study analyzed DNA methylation patterns in uterine leiomyomas from African American women using genome-wide analysis. They found several aberrantly methylated and concomitantly expressed genes in leiomyomas and suggested DNA methylation played a key role in the pathogenesis of uterine leiomyomas by altering the mRNA expression profile of normal myometrium [14]. Another study showed that uterine

leiomyomas in Japanese women were associated with genome-wide alterations in DNA methylation at multiple gene promoter regions. From 120 genes analyzed, 65 genes were found to be hypermethylated and, hence, transcriptionally downregulated in uterine leiomyoma compared with myometrium [13].

Studies on the involvement of epigenetic mechanisms in the pathogenesis of uterine leiomyoma focused on DNA methylation; some studies showed that histone modifications were directly involved and important in uterine leiomyoma development [17, 18, 19]. It is well known that histone modifications such as histone acetylation and deacetylation are correlated with chromatin accessibility and transcription [20].

It is important to note that DNA methylation can recruit histone deacetylases, which remove acetyl groups on histones. This is associated with a more condensed chromatin state and transcriptional gene silencing. Some studies have demonstrated that histone modifications are directly involved in uterine disease development [17, 18, 19, 21, 22]. We observed higher HDAC activity in uterine leiomyoma compared with myometrium, whereas no significant difference was detected in HAT activity. Wei et al (2011) reported that HDAC6 was involved in the regulation of ER α expression in uterine leiomyoma. However, this histone deacetylase does not regulate chromatin remodeling because it is located in the cytoplasm where it regulates microtubules and protein degradation. When HDAC6 expression was silenced using small-interfering (siRNA), there was a significant reduction in ER α protein but not mRNA levels, consistent with its function regulating protein degradation.

HDAC activity has been investigated in other parts of the female reproductive system. Both gene and protein expression of HDAC1 and 2 were higher in stromal endometriotic cells (Hs832cT) than in human endometrial stromal cells (HESCs) and epithelial endometrial cells (EEC) [21]. In human breast cancer tissues, HDAC1, 2 and 3 expressions were analyzed on tissues microarrays and immunohistochemistry showed that HDAC2 and 3 were strongly

expressed in more aggressive tumor types [23]. These findings support the idea that epigenetic mechanisms specifically related to DNA methylation and histone modifications can be involved in female reproductive system function.

Both DNA methylation and histone deacetylation may contribute to gene silencing. Because HDACs are multiprotein complexes, they can be targeted to specific genomic regions by interaction with DNA binding factors such as transcription factors and nuclear receptors, and epigenetic modifiers such as methyl-binding proteins (MBDs), DNA methyl transferases (DNMTs) and histone methyl transferases (HMTs) [22]. The best-characterized interaction is the recruitment of HDACs to methylated DNA via the MeCP2, a MBD. MeCP2 recruits HDAC-containing complexes to methylated gene promoters to mediate transcription repression [24, 25, 26].

There is a growing body of evidence that suggests posttranslational modifications are involved in the pathogenesis of uterine leiomyoma; however, little is known about the mechanisms and functions of epigenetics in uterine leiomyoma formation. Several studies have investigated DNA methylation patterns in uterine leiomyoma [7, 13, 14, 12], but it remain unclear how histone modifications and interactions between DNA methyl groups and histone modifications regulate tumor development [27]. In our study, we found a hypermethylation and hypoacetylation in uterine leiomyoma suggesting that these processes could lead to transcriptional repression of genes involved in normal myometrium cell function, and thus contribute to maintenance and growth of uterine leiomyoma.

Conclusion

Comprehensive studies on histone modifications related to DNA methylation are needed to develop therapeutic agents for the treatment of uterine leiomyoma. In addition, further studies are needed to determine the relationship between global DNA methylation and histone acetylation/deacetylation.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE, Grant number 130299) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- 1- Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, Toti P, Tranquilli AL, Petraglia F, Castellucci M & Ciarmela P. Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: 921-934.
- 2- Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril.* 2007; 87: 725-736.
- 3- Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, Stolley PD & Guzinski GM. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *J Reprod Med.* 1996; 41: 483-490.
- 4- Evans P & Brunzell S. Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2007; 75: 1503-1508.
- 5- Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet.* 2001; 357: 293-298.
- 6- Esteller M, Corn PG, Baylin SB & Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3225-3229.
- 7- Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ogane J, Hattori N, Shiota K & Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15: 259-267
- 8- Ohgane J, Yagi S & Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta.* 2008; 29: Suppl A S29-35
- 9- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128: 693-705.
- 10- Egger G, Liang G, Aparicio A & Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004; 429: 457-463.

- 11-Ropero S & Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* 2007; 1: 19-25.
- 12-Li S, Chiang TC, Richard-Davis G, Barrett JC & McLachlan JA. DNA hypomethylation and imbalanced expression of DNA methyltransferases (DNMT1, 3A, and 3B) in human uterine leiomyoma. *Gynecol Oncol.* 2003; 90: 123-130.12
- 13-Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A & Sugino N. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One.* 2013; 8: e66632.
- 14-Navarro A, Yin P, Monsivais D, Lin SM, Du P, Wei JJ & Bulun SE. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One.* 2012; 7: e33284.
- 15-Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148-1159.
- 16-Landgrave-Gomez J, Mercado-Gomez O & Guevara-Guzman R Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 58.
- 17-Bredfeldt TG, Greathouse KL, Safe SH, Hung MC, Bedford MT & Walker CL. Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT. *Mol Endocrinol.* 2010; 24: 993-1006.
- 18-Greathouse KL, Bredfeldt T, Everitt JI, Lin K, Berry T, Kannan K, Mittelstadt ML, Ho SM & Walker CL. Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 2012; 10: 546-557.

- 19-**Wei LH, Tornøge PL, Hsiao SM, Jeng YM, Chen MW & Chen CA. Histone deacetylase 6 regulates estrogen receptor alpha in uterine leiomyoma. *Reprod Sci.* 2011; 18: 755-762.
- 20-**Kim JK, Samaranyake M & Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 596-612.
- 21-**Colon-Diaz M, Baez-Vega P, Garcia M, Ruiz A, Monteiro JB, Fourquet J, Bayona M, Alvarez-Garriga C, Achille A, Seto E & Flores I. HDAC1 and HDAC2 are differentially expressed in endometriosis. *Reprod Sci.* 2012; 19: 483-492.
- 22-**Yao Y, Li H, Gu Y, Davidson NE & Zhou Q. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling. *Carcinogenesis.* 2010; 31: 382-387.
- 23-**Muller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, Winzer KJ, Dietel M, Weichert W & Denkert C. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer.* 2013; 13: 215.
- 24-**Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP & Kouzarides T The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4035-4040.
- 25-**Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J & Wolffe AP Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998; 19: 187-191.
- 26-**Ng HH & Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9: 158-163.
- 27-**Yang Q, Mas A, Diamond MP & Al-Hendy A. The Mechanism and Function of Epigenetics in Uterine Leiomyoma Development. *Reprod Sci.* 2016; 23:163-175.

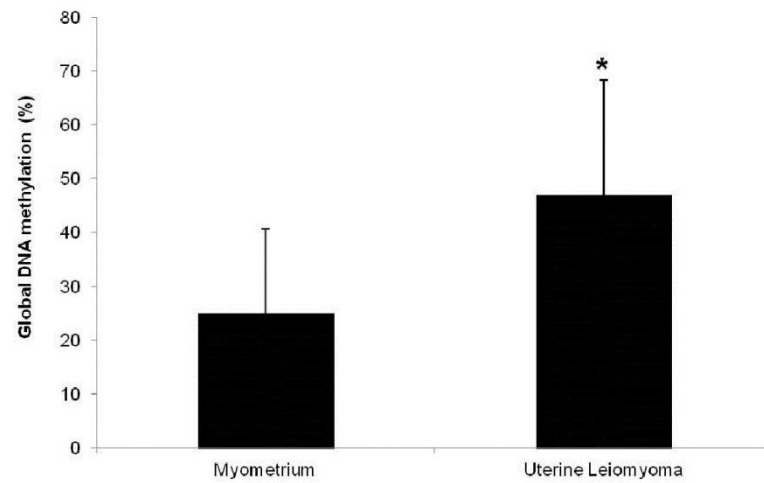


Figure 1 - Global DNA methylation in uterine tissue. The global DNA methylation was higher in uterine leiomyoma (46.85%) when compared to the myometrium (24.95%) (Student's t test, $*p = 0,022$); Results are expressed as mean \pm standard deviation, n=25.

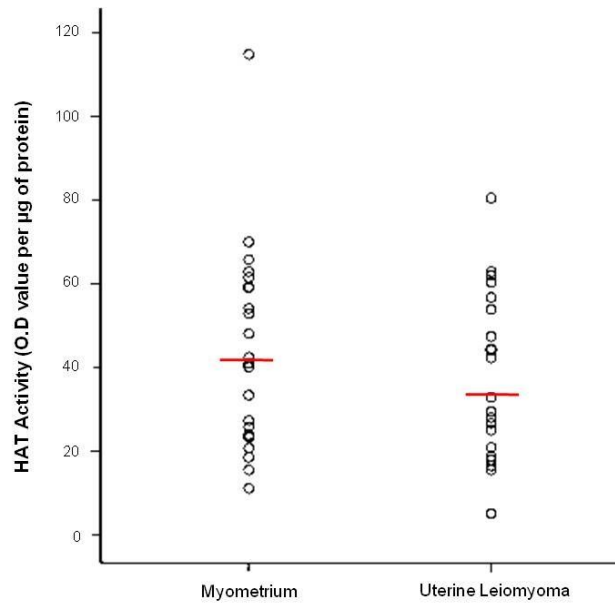


Figure 2 - HAT activity in uterine tissue. The HAT activity showed no statistically significant differences between uterine leiomyoma and myometrium (Wilcoxon test, $p = 0.08$). Each point represents one patient. Bars represent the median of values, $n=25$.

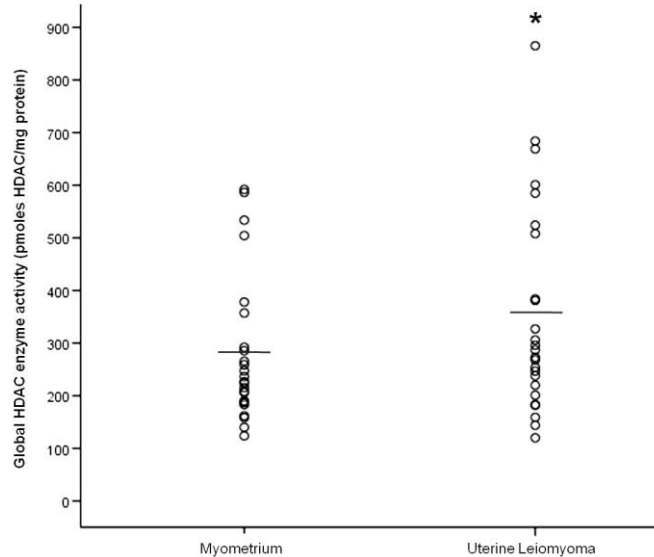


Figure 3 - HDAC activity in uterine tissue. The HDAC activity was higher in uterine leiomyoma when compared to the myometrium (Wilcoxon test, $*p = 0.04$). Each point represents one patient. Bars represent the median of values, $n=25$.

9. Considerações finais

Nosso estudo demonstrou que os hormônios ovarianos modulam a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B em leiomiomas uterinos e miométrio. Nesses tumores também foi observado uma hipermetilação do DNA e hipoacetilação de histonas, processos que estão relacionados com silenciamento gênico, reforçando a hipótese de que mecanismos epigenéticos estão envolvidos no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Estes achados remetem a uma nova hipótese, que genes supressores estão com a sua transcrição gênica diminuída, favorecendo o crescimento tumoral. Quanto à ação da mifepristona (RU 486), na concentração de 10^{-6} M não foi possível demonstrar sua modulação sobre a expressão gênica dos receptores de progesterona total e B em leiomioma uterino e miométrio. A partir de nossos resultados, futuros experimentos são necessários, como a análise de metilação gene específico dos receptores de progesterona e de genes supressores. O entendimento dos mecanismos moleculares e celulares que possam estar envolvidos na etiologia da miomatose uterina, bem como a ação da mifepristona neste tecido é importante para que novas abordagens clínicas possam ser desenvolvidas no tratamento desses tumores.

10. Anexo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Efeito da mifepristona sobre os mecanismos epigenéticos em 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.

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: _____



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 130299

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

HELENA VON EYE CORLETA

GABRIELA DOS SANTOS SANT ANNA


Título: Efeito da mifepristona sobre os mecanismos epigenéticos em leiomiomas uterinos

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 23 de julho de 2013.



Prof. José Roberto Goldim
Coordenação CEP/HCPA