



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

***EFEITO DA MIFEPRISTONA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E
EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA EM UM
MODELO DE CULTURA PRIMÁRIA DE MIOMÉTRIO E LEIOMIOMA
HUMANOS***

Aline Lopes Amaral

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação como requisito parcial
para a obtenção do título de mestre em
Ciências Biológicas: Fisiologia

Porto Alegre, junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Ilma Brum, pela confiança inicialmente depositada em mim. Pela presença e orientação constantes ao longo da realização deste projeto, e pelos bons exemplos que me fizeram amadurecer como aluna. Especialmente, pela compreensão e paciência nos momentos finais.

Aos professores Dra. Helena Corleta e Dr. Edison Capp, pelas relevantes contribuições em nossos encontros científicos. À Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro, pelos exemplos e ensinamentos como professora. À todos, agradeço pela revisão desta dissertação.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por terem me proporcionado uma excelente experiência de estudo.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre: equipe do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, pelo auxílio com as coletas de material cirúrgico, e ao Centro de Pesquisa Experimental, pela estrutura indispensável para a realização deste projeto.

Aos colegas Gustavo Ferreira e Amanda Machado, pela imensurável e indispensável ajuda técnica, pela convivência intensa e sempre agradável na sala de cultura, pelas muitas horas compartilhadas, às vezes frustrantes, mas sempre divertidas. Enfim, por terem sido muito mais do que

ótimos colegas, verdadeiros amigos. Obrigada por sempre tornarem os meus dias mais alegres.

Agradeço a Ana Santin e a Carol Hillebrand, pelo auxílio em várias etapas deste projeto, por estarem sempre disponíveis para qualquer ajuda, e também pela amizade nas horas difíceis.

À todos os meus colegas de laboratório: Vanderlei, Lolita, Gisele, Fernanda, Carlos, Diego, Anita, Gabriela, Patrícia, Joelson e Carol Luft, por manterem um ambiente de trabalho sempre agradável e tranquilo, e por terem, de alguma forma, contribuído para a minha formação e para a realização deste trabalho.

À minha mãe, meus avós e minha tia, por todo apoio e incentivo aos estudos durante toda a minha vida. Por terem sido sempre exemplos de amor, trabalho e dedicação a tudo o que fazem. E o mais importante, por terem compreendido e apoiado minhas escolhas. Ao meu marido Gregor, por sempre me fazer acreditar que seria possível, pela cumplicidade, pelo amor e pela dedicação a mim nestes últimos momentos. E por fazer parte do meu mais recente projeto de vida, a Olivia.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO.....	13
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	19
HIPÓTESES.....	36
OBJETIVOS	37
MÉTODOS	38
1. Delineamento da Pesquisa	38
2. Pacientes	38
3. Cálculo do Tamanho da Amostra.....	39
4. Aspectos Éticos.....	39
5. Coleta das amostras	39
6. Procedimentos para cultura de células de leiomioma e miométrio humanas	40
6.1. Manutenção das células em cultura.....	41
7. Imunocitoquímica.....	42
8. Avaliação da proliferação celular	43
9. Avaliação da expressão gênica por RT-PCR.....	44
9.1. Extração de RNA total.....	45

9.2. Quantificação do RNA.....	46
9.3. Síntese do cDNA.....	46
10. Análise estatística	52
RESULTADOS.....	55
1. Estabelecimento da cultura primária de mioma e miométrio.....	55
2. Caracterização dos tecidos.....	60
3. Avaliação da proliferação celular	65
4. Análise da expressão gênica dos receptores de progesterona.....	84
DISCUSSÃO	92
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS	121
ANEXO 1 Termo de Consentimento Livre e esclarecido	121

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância de uma via
B2M	Beta-2-microglobulina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
cDNA	DNA complementar
C _T	Ciclo limiar
Cy3	Fluoróforo verde
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, fluoróforo azul
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirino nucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de estrógenos
ER α	Receptor de estrógenos alfa
ER β	Receptor de estrógenos beta
EREs	Elementos responsivos a esteroides
F12	<i>F-12 Nutrient Mixture</i> (meio de cultura)
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>

GLM	<i>General Linear Model</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HR	Complexo hormônio-receptor
IGF-I/II	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I/tipo II
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
kDa	Quilo-Dalton
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular
MTT	Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
PAs	Antagonistas da progesterona
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrogênio
PR	Receptor de progesterona
PRAB	Fragmento comum às isoformas do receptor de progesterona
PRA	Isoforma A do receptor de progesterona
PRB	Isoforma B do receptor de progesterona
PRMs	Moduladores seletivos dos receptores de progesterona
PTH-rp	Peptídeo relacionado ao paratormônio
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro

RU486	Esteróide sintético antagonista do receptor de progesterona
SBF	Soro bovino fetal
SBF-DT	Soro bovino fetal desteroídado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SYBR	Corante Sybr Green I
TTBS	Solução salina de Tris e Tween
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
T _m	Temperatura de dissociação
UA	Unidades Arbitrárias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programas utilizados nas reações de PCR em tempo real, para amplificação dos genes em estudo	página 51
Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT PCR em tempo real, para amplificação de fragmentos dos genes em estudo	página 51
Tabela 3. Condições de cultivo testadas e respostas observadas para cada tipo de tecido.....	página 56
Tabela 4. Descrição do esquema de tratamento dos grupos.....	página 65
Tabela 5. Análise da proliferação celular de miométrio e leiomioma através de contagem de células nos tempos 7 e 9	página 66
Tabela 6. Análise da proliferação celular de miométrio e leiomioma através de MTT nos tempos 7 e 9	página 67
Tabela 7. Análise da expressão gênica de receptores de progesterona em miométrio através de PCR em tempo real	página 84
Tabela 8. Análise da expressão gênica de receptores de progesterona em leiomioma através de PCR em tempo real.....	página 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos miomas quanto à localização	página 21
Figura 2. Etiologia dos leiomiomas	página 24
Figura 3. Mecanismo de ação dos hormônios esteroides	página 26
Figura 4. Algoritmo dos grupos experimentais	página 41
Figura 5. Curva de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real	página 48
Figura 6. Esquema temporal das culturas em garrafas de 150 cm ²	página 58
Figura 7. Esquema temporal das culturas em placas multiwell, para os experimentos de proliferação e extração de RNA	página 59
Figura 8. Células de cultura primária de miométrio normal (A) e leiomioma (B) em monocamada, após 7 dias de cultivo	página 61
Figura 9. Células de cultura primária de miométrio em monocamada após 5 dias de cultivo (A), 10 dias de cultivo (B) e 15 dias de cultivo (C)	página 62
Figura 10. Células de cultura primária de leiomioma em monocamada após 5 dias de cultivo (A), 10 dias de cultivo (B) e 15 dias de cultivo (C)	página 63
Figura 11. Imunocitoquímica de fluorescência	página 64
Figura 12. Análise da proliferação celular de miométrio através de contagem de células nos tempos 7 e 9.....	página 68
Figura 13. Análise da proliferação celular de miométrio através de MTT nos tempos 7 e 9.....	página 69
Figura 14. Análise da proliferação celular de leiomioma através de contagem de células nos tempos 7 e 9.....	página 70

Figura 15. Análise da proliferação celular de leiomioma através de MTT nos tempos 7 e 9.....	página 71
Figura 16. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 7	página72
Figura 17. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 9	página 73
Figura 18. Análise da proliferação celular através de MTT em mioma e miométrio no tempo 7.....	página 74
Figura 19. Análise da proliferação celular através de MTT em mioma e miométrio no tempo 9.....	página 75
Figura 20. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 7 em miométrio.....	página 76
Figura 21. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 7 em leiomioma	página 77
Figura 22. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 9 em miométrio.....	página78
Figura 23. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 9 em leiomioma	página 79
Figura 24. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 7	página 81
Figura 25. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 9	página 83
Figura 26. Expressão gênica de PRAB em miométrio.....	página 86
Figura 27. Expressão gênica de PRB em miométrio	página 87

Figura 28. Relação entre a expressão gênica de PRAB e PRB em miométrio	página 88
Figura 29. Expressão gênica de PRAB em leiomioma	página 89
Figura 30. Expressão gênica de PRB em leiomioma	página 90
Figura 31. Relação entre a expressão gênica de PRAB e PRB em leiomioma	página 91

RESUMO

Introdução: leiomiomas uterinos são os tumores benignos mais prevalentes nas mulheres em idade fértil, ocorrem em cerca de 50% da população feminina e são a indicação mais frequente de histerectomia. A importância dos esteroides ovarianos na etiologia dos leiomiomas está bem estabelecida; contudo, as contribuições relativas dos estrógenos e da progesterona no crescimento dos leiomiomas ainda são controversas. Muitos estudos têm apresentado evidências de que a progesterona seria mais importante do que os estrógenos para o desenvolvimento destes tumores, e antiprogestágenos como a mifepristona podem tornar-se uma nova possibilidade de tratamento conservador. Ensaios clínicos têm sugerido que a mifepristona é efetiva no tratamento de leiomiomas, causando redução no tamanho dos tumores. Todavia, a recorrência da proliferação dos tumores após o fim do tratamento e os mecanismos de ação da mifepristona na regulação dos receptores de progesterona ainda não estão esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da mifepristona sobre a proliferação celular e a expressão gênica de receptores de progesterona A e B, em um modelo de cultura de células de miométrio e leiomioma, sob diferentes condições hormonais. **Métodos:** fragmentos de leiomioma e de miométrio adjacente foram obtidos de cinco pacientes submetidas à histerectomia. Foram padronizadas as culturas primárias de leiomioma e miométrio, e as células de cada tipo de tecido em cultura foram divididas em cinco grupos de tratamento: estradiol, estradiol e

mifepristona, estradiol e progesterona, estradiol, progesterona e mifepristona e controle (etanol utilizado como veículo dos hormônios). Foi realizada análise imunocitoquímica para α -actina. A proliferação celular foi avaliada através de contagem em hemocitômetro e ensaio de MTT no tempo 7 (após o tratamento com mifepristona) e no tempo 9 (após a recuperação do tratamento). No dia 7, foi feita extração de RNA para avaliar a expressão de receptores de progesterona (PRs) A e B através de PCR em tempo real. **Resultados:** o estabelecimento do modelo de cultura de células foi confirmado através da coloração positiva para α -actina e pela observação de características morfológicas típicas de células musculares lisas. As técnicas de avaliação da proliferação celular, contagem e MTT, mostraram correlação positiva. O tratamento com estradiol aumentou a proliferação celular de ambos os tipos de tecido, em relação ao grupo controle. O tratamento com progesterona associada ao estradiol aumentou a proliferação das células de ambos tecidos, em relação ao tratamento com estradiol isoladamente e ao controle. Para os dois tratamentos, as células de leiomioma proliferaram mais do que as células de miométrio. No tempo 7, o tratamento com mifepristona associada ao estradiol inibiu a proliferação celular em leiomioma (42%) e no miométrio (23%), em comparação ao mesmo tecido tratado somente com estradiol. O tratamento com mifepristona em associação com estradiol e progesterona inibiu a proliferação celular em leiomioma (105%) e miométrio (56%), em comparação ao mesmo tecido tratado com estradiol e progesterona. No tempo 9, após a recuperação do tratamento com mifepristona, células de miométrio mostraram maior resposta proliferativa do que células de leiomioma. Todavia, o tratamento com mifepristona não foi capaz de inibir completamente a

proliferação celular, visto que todos os grupos tratados mostraram aumento de proliferação do tempo 7 até o tempo 9. Foi demonstrada a expressão das duas isoformas de PRs, A e B, em miométrio e leiomioma *in vitro*; contudo, as comparações entre os grupos de tratamento não foram possíveis devido ao reduzido tamanho amostral. **Conclusões:** culturas primárias de células de miométrio e leiomioma são um modelo viável para avaliação da proliferação celular em diferentes condições hormonais, e o ensaio de MTT pode ser um bom método de avaliação. A mifepristona inibiu a proliferação celular em ambos os tipos de tecido, com o maior efeito quando associada ao estradiol e à progesterona e em células de leiomioma. Células de miométrio e leiomioma expressam as duas isoformas de PRs *in vitro*. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da mifepristona na regulação da expressão gênica e proteica dos PRs.

ABSTRACT

Introduction: uterine leiomyomata are the most common benign tumors in women of reproductive age, with an estimated incidence greater than 50% and being the most common indication for hysterectomy. Importance of ovarian steroids in the etiology of leiomyomas is well established; however, relative contributions of estrogens and progesterone in leiomyomas growth are still controversial. Many studies have presented evidences that progesterone is more important than estrogens for the development of these tumors, and antiprogestins like mifepristone have become a new possibility for conservative treatment. Clinical trials suggest that mifepristone is effective in treating leiomyomata, producing reduction of their size. However, recurrence of tumor proliferation after treatment and molecular mechanisms of mifepristone action in regulating progesterone receptors remains unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of mifepristone on cell proliferation and progesterone receptors A and B gene expression, in a model of leiomyoma and matched myometrium cell cultures under different hormonal conditions.

Methods: human leiomyoma and matched myometrial tissues were obtained from five patients undergoing hysterectomy. Cells maintained in culture from each tissue were divided into 5 treatment groups: estradiol, estradiol and mifepristone, estradiol and progesterone, estradiol, progesterone and mifepristone, and control group (ethanol as a vehicle from hormones). Immunocytochemistry analysis for α -actin was performed. Cell proliferation was evaluated by hemocytometer counting and MTT assay at day 7 (after

mifepristone treatment) and day 9 (after recovery from treatment). RNA extraction was performed at day 7 to evaluate progesterone receptors (PRs) A and B expression by real time PCR. **Results:** culture cell establishment was confirmed by positive staining for α -actin and by observed morphological characteristics from smooth muscle cells. Cell proliferation evaluating techniques, hemocytometer counting and MTT, showed positive correlations. Estradiol treatment increased cell proliferation for leiomyoma and myometrium cells compared to control group. Progesterone combined to estradiol increased cell proliferation in both cell types, compared to estradiol alone and control group. For both hormonal treatments, leiomyoma showed significantly higher proliferation than myometrial cells. At day 7, mifepristone treatment in association with estradiol inhibited cell proliferation in leiomyoma (42%) and myometrial cells (23%), compared to the same tissue treated with estradiol alone. Mifepristone treatment in association with estradiol and progesterone also inhibited cell proliferation in leiomyoma (105%) and myometrial cells (56%), compared to the same tissue treated with estradiol and progesterone. At day 9, after recovery from mifepristone treatment, myometrial cells showed greater proliferative response than leiomyoma cells. However, mifepristone treatment was not able to completely inhibit cell proliferation, whereas treated groups showed increased proliferation from day 7 to 9. We have found that two isoforms of PRs, A and B, were expressed in both myometrial and leiomyoma in vitro; however, comparisons between groups were not possible due to the small sample size. **Conclusions:** primary myometrial and leiomyomata cell cultures are a viable model for cell proliferation analysis under different hormonal conditions, and MTT assay could also be a good evaluation method.

Mifepristone inhibited cell proliferation of both types of tissue, with maximum effect in association with estradiol and progesterone in leiomyoma cells. PRs A and B were expressed in myometrial and leiomyoma cells *in vitro*. Further investigation is needed to clarify whether mifepristone regulates gene and protein expression of PRs.

INTRODUÇÃO

O útero é um órgão do sistema reprodutor feminino situado na pelve, anterior ao reto e póstero-superior à bexiga urinária. Apresenta uma porção dilatada, o corpo, cuja parte superior é chamada de fundo do útero, e uma parte inferior, cilíndrica, que se abre na vagina, chamada de colo uterino. O útero é constituído por três camadas: perimétrio (externa), miométrio (intermediária) e endométrio (interna) (Standring & Gray, 2008).

O perimétrio ou serosa consiste em duas lâminas de peritônio que recobrem as faces anterior e posterior do útero. O miométrio é a camada mais espessa do útero, sendo formado por fibras musculares lisas separadas por tecido conjuntivo. As fibras musculares formam feixes que estão dispostos em três camadas: interna (longitudinal), média (circular) e externa (longitudinal). Durante a gestação, há hipertrofia (aumento do volume) e hiperplasia (aumento do número de células) das fibras musculares lisas, além do aumento do calibre

vascular de artérias e veias. O endométrio, camada mais interna, está constituído por epitélio cilíndrico simples (revestimento interno do lúmen uterino) e lâmina própria, que contém inúmeras glândulas tubulares simples (glândulas endometriais). Na camada superficial do endométrio ocorrem as alterações cíclicas causadas pelos esteroides ovarianos e é onde se aloja o produto da concepção até o momento do parto, quando a contração do miométrio produz a força propulsora para a expulsão do feto (DeCherney & Nathan, 2007).

Leiomiomas ou miomas são tumores uterinos que se desenvolvem no miométrio e constituem a neoplasia benigna mais comum do sistema reprodutor feminino (Flake et al., 2003). Habitualmente, os leiomiomas ocorrem no corpo uterino, podendo surgir também no colo do útero. Na maioria das vezes são firmes, de tamanhos variados e circundados por pseudocápsula, composta de miométrio uterino comprimido. Nos leiomiomas, a celularidade (quantidade de núcleos por unidade de área) é um pouco maior e o arranjo em feixes mais nítido do que no miométrio normal. A boa delimitação do tumor e a ausência de invasão dos tecidos vizinhos sugerem benignidade (Kumar et al., 2005). Os leiomiomas tornam-se malignos (leiomiossarcomas) em menos de 0,1% das pacientes (Levy et al., 2000).

Os leiomiomas são classificados de acordo com a localização em que ocorrem em 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 ainda apresentar-se presos por um pedículo, crescendo

além da superfície, sendo chamados de pediculados ou pedunculados (Figura 1) (Kumar et al., 2005).

Os sintomas são relacionados diretamente ao tamanho, ao número e à localização dos miomas. Os subserosos tendem a causar sintomas compressivos e distorção anatômica de órgãos adjacentes, os intramurais causam sangramento e dismenorréia, enquanto que os submucosos produzem sangramentos irregulares com maior frequência e estão associados à disfunção reprodutiva (Corleta et al., 2007). Hemorragia, dor suprapúbica e, não raramente, infertilidade e abortamentos podem ocorrer. O sangramento e as dores podem causar anemia e transtornos sociais, além de sintomas urinários e constipação. Em gestantes, os leiomiomas aumentam a frequência de aborto espontâneo, má apresentação fetal, inércia uterina e hemorragia pós-parto (Stewart, 2001).

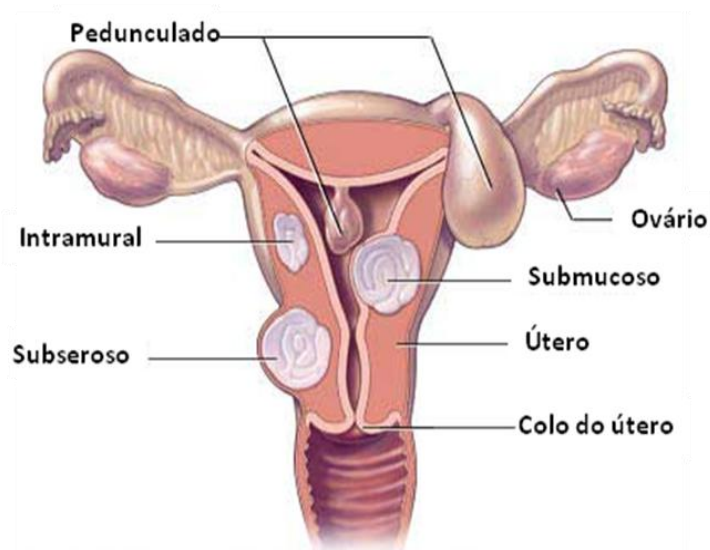


Figura 1. Classificação dos miomas quanto à localização. Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2010 (Mayo, 2010).

Os leiomiomas ocorrem em cerca de 50% da população feminina, sendo relativamente raros em mulheres muito jovens e na pós-menopausa. São os tumores mais freqüentes nas mulheres em idade fértil, tornando-se sintomáticos em 20% a 50% dos casos. Por serem frequentemente assintomáticos, estima-se que essa prevalência possa ser ainda maior (Okolo, 2008). Na maioria dos países, os miomas uterinos são a indicação mais frequente de histerectomia na pré-menopausa. Representam, conseqüentemente, um grande problema de saúde pública em todo o mundo (Martel et al., 2004).

Estudos demográficos relatam ser a miomatose três a nove vezes mais frequente em mulheres afro-americanas em relação às caucasianas, além de estar associada a um pior prognóstico naquelas pacientes (Wise et al., 2004). A paridade também é um fator de risco significativo, sendo a idade da paciente no nascimento do último filho inversamente proporcional ao risco de desenvolvimento de miomas, sugerindo que a gestação pode inibir a formação de novos tumores ou promover a regressão dos já existentes. A gestação revela a notável capacidade de crescimento das células musculares lisas do miométrio normal sem que haja transformação maligna. Uma hipótese proposta é a de que as células do leiomioma assumam o fenótipo do miométrio gestacional (Andersen & Barbieri, 1995). De fato, existem características em comum entre ambos, como o aumento da matriz extracelular, a expressão de receptores para hormônios peptídicos e esteroides e a expressão da proteína conexina 43, necessária para a comunicação entre as células e para as contrações sincronizadas do trabalho de parto. Todavia, nos leiomiomas não ocorre regressão via apoptose e a perda da diferenciação característica do

miométrio pós-parto, potencialmente pela diferença na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e das prostaglandinas presentes na etapa final do parto. O efeito protetor da gestação, fase na qual estes mediadores são induzidos, é consistente com esta hipótese (Cesen-Cummings et al., 2000).

Muitas citocinas e fatores de crescimento podem promover o desenvolvimento de leiomiomas através de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos: o fator de crescimento tumoral- β (TGF- β), fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1/2), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sozen & Arici, 2002).

Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas. Estudos cromossômicos, no entanto, 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). Recentemente, foi demonstrado o envolvimento dos cromossomos 10, 11 e 22 (Cha et al., 2011). Assim, múltiplos locus gênicos parecem estar envolvidos.

A obesidade e a menarca precoce, que aumentam o tempo de exposição aos estrógenos, são conhecidos fatores de risco (Okolo, 2008). Os leiomiomas se desenvolvem durante os anos reprodutivos e regredem após a menopausa, indicando um potencial de crescimento dependente de hormônios esteroides ovarianos (Maruo et al., 2004). Culturas de tecidos mostram um crescimento significativo quando as células são estimuladas apenas com

progesterona e também quando são estimuladas com estrogênio e progesterona (Wilson et al., 1980) (Figura 2).

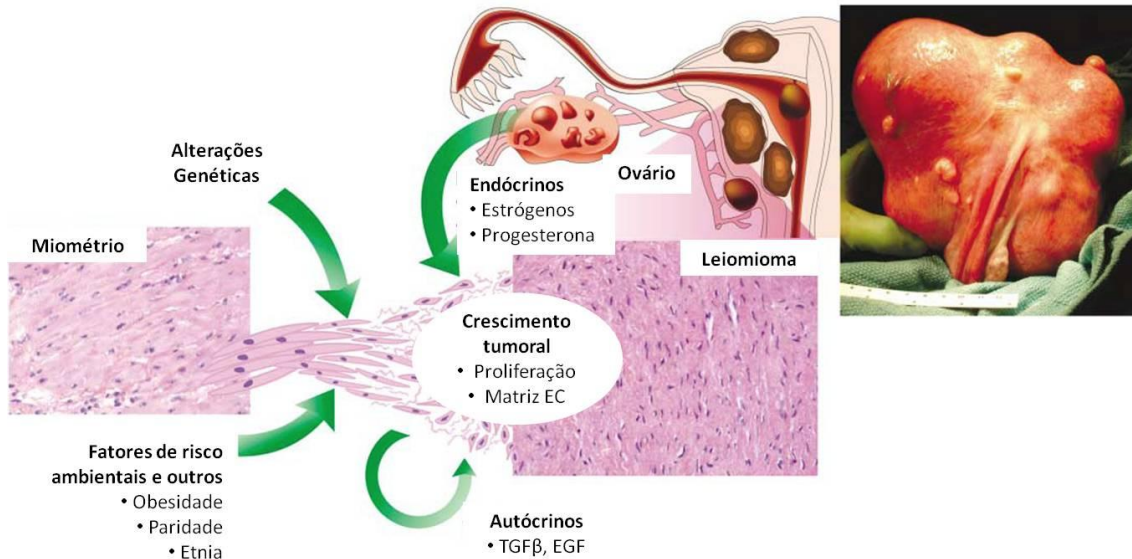


Figura 2. Etiologia dos leiomiomas. Os leiomiomas são heterogêneos em sua história natural e etiologia, alterações genéticas cromossômicas e fatores de risco como obesidade, paridade e etnia contribuem para o seu desenvolvimento. O crescimento tumoral ocorre através do aumento do número de células e da matriz extracelular e é promovido por fatores de crescimento endócrinos e autócrinos. Adaptado de Walker & Stewart, 2005.

O modelo clássico de ação dos hormônios esteroides, proposto por Schuchard e colaboradores (1993), é aplicável aos receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos, glicocorticóides e mineralocorticóides e descreve a ação nuclear dos receptores desses hormônios. Os hormônios esteroides, por serem lipofílicos, difundem-se através da membrana celular,

formando complexos de alta afinidade com o receptor específico, resultando na ativação do mesmo. A 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 elementos responsivos a esteroides (EREs). Esses elementos responsivos correspondem a sequências de DNA de 15 a 20 pares de bases localizadas anteriormente ao sítio de início da 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. O modelo propõe ainda que a ligação do complexo HR aos EREs ativa a transcrição dos chamados genes regulatórios precoces (*early genes*), cuja resposta ocorre poucos minutos após a estimulação hormonal. As proteínas codificadas por estes genes retornam ao núcleo e modulam a expressão dos chamados genes estruturais tardios (*late genes*). Esses genes codificam proteínas envolvidas no efeito biológico final do hormônio (Schuchard et al., 1993) (Figura 3).

Os receptores caracterizam-se pela organização em domínios funcionais específicos, que incluem domínios de ligação ao hormônio (na região carboxi-terminal), de ligação ao DNA (central), domínios de transativação (na região amino-terminal), responsáveis pelo recrutamento de co-ativadores da transcrição, e ainda domínios inibitórios, responsáveis pelo recrutamento de co-repressores da transcrição gênica. Há também domínios de dimerização, através dos quais os receptores ligados aos hormônios dimerizam-se, e assim formam o complexo HR ativado (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004). Demonstrou-se, ainda, que uma vez o hormônio tendo se ligado ao receptor, as regiões de ligação ao DNA e N-terminal da mesma

molécula do receptor interagem entre si, estabilizando o complexo e otimizando a ligação com proteínas co-regulatórias (Takimoto et al., 2003).

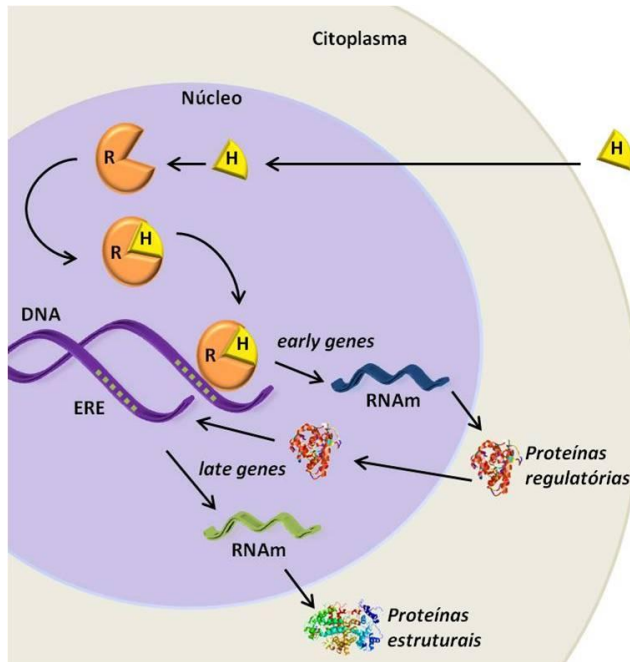


Figura 3. Mecanismo de ação dos hormônios esteroides. O hormônio esteroide (H) difunde-se através das membranas celular e nuclear, ligando-se ao seu receptor específico (R). O complexo hormônio-receptor se liga a elementos responsivos aos hormônios esteroides (ERE) no DNA, localizados na região

promotora dos genes-alvo, induzindo a transcrição imediata dos genes precoces (early genes). A proteína produzida por estes genes regula a transcrição dos genes estruturais tardios (late genes) cujos produtos são proteínas estruturais que interferem no desenvolvimento celular.

O tempo de ação dos hormônios esteroides para a síntese de quantidades significativas de novas proteínas é da ordem de horas. No entanto, algumas das respostas aos hormônios esteroides não se enquadram neste modelo clássico de ação genômica. Muitos fenômenos induzidos pelos esteroides ocorrem rapidamente – por exemplo, a reação acrossomal que é induzida pela progesterona segundos após o contato deste hormônio com os

espermatozoides. A observação de fenômenos como este estimulou a realização de pesquisas que identificaram respostas aos esteroides que ocorrem em segundos ou minutos e que seguem vias não-genômicas (Losel & Wehling, 2003).

O mecanismo de ação não-genômica envolve a geração de segundos mensageiros intracelulares e ativação de várias cascatas de transdução, como o fluxo de íons (comumente cálcio), modulação do AMP cíclico e as vias das proteínas-quinase. Alguns estudos já identificaram receptores de membrana para hormônios esteroides acoplados a proteínas G (Karteris et al., 2006; Razandi et al., 2002; Sachdeva et al., 2000), no entanto, a caracterização destes receptores ainda é limitada. Em muitos casos, a ação não-genômica dos esteroides também pode ser atribuída aos receptores clássicos, que também podem interagir com cascatas de sinalização intracelulares. Ainda, a geração de segundos mensageiros estimulada pela ligação aos receptores de membrana pode influenciar o genoma através de diversos mecanismos. Mesmo não atuando primariamente no DNA, vários segundos mensageiros modulam a expressão de genes através de fatores de transcrição, em uma interação complexa entre vias genômicas e não-genômicas. Esta ação rápida, não-genômica dos hormônios esteroides é, sem dúvida, de uma importância ainda subestimada (Losel et al., 2003).

Os estrógenos exercem seus efeitos fisiológicos nas células-alvo através da ligação aos receptores nucleares específicos, sendo conhecidos dois subtipos: os receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) (Mosselman et al., 1996).

Várias evidências apoiam o conceito de que os estrógenos estão relacionados ao desenvolvimento e crescimento dos leiomiomas. Alguns autores identificaram a expressão de RNAm de ambos os receptores, ER α e ER β , em miométrio normal e em leiomiomas (Benassayag et al., 1999; Kovacs et al., 2001; Pedeutour et al., 1998). Sakaguchi e colaboradores demonstraram que os níveis de RNAm dos receptores de estrógenos variam durante o ciclo menstrual, e que os níveis de RNAm do ER α predominam sobre os do ER β (Sakaguchi et al., 2003). Outros estudos observaram níveis elevados de RNAm de ambos receptores em leiomiomas em relação ao miométrio normal (Benassayag et al., 1999; Kovacs et al., 2001).

Já foi demonstrado que a ligação do hormônio a ambos os receptores é capaz de estimular a transcrição dos mesmos genes-alvo, apesar de o grau de ativação do ER β ser menor do que o do ER α (Enmark & Gustafsson, 1999). Vários genes regulados por estrógenos estão mais expressos em leiomiomas do que no miométrio normal, incluindo a proteína de junção comunicante conexina 43, o colágeno tipo I e III, o IGF-I e o IGF-I-R, o peptídeo relacionado ao paratormônio (PTH-rp) e os receptores de progesterona (PRs) (Andersen et al., 1995).

Além disso, vários autores identificaram nos leiomiomas uma maior expressão da enzima aromatase, uma estrógeno sintetase que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos. Os estrógenos sintetizados *in situ* nos leiomiomas exercem um efeito autócrino e/ou parácrino sobre o crescimento tumoral (Bulun et al., 1994; Shozu et al., 2001; Shozu et al., 2002). Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, que comparou a expressão proteica da enzima aromatase e da proteína dos receptores ER α e ER β em 12

amostras de tecido de leiomiomas e miométrio normal adjacente, não encontrou diferenças significativas de expressão entre os tecidos. Desta forma, pode-se observar que, para que ocorra o desenvolvimento tumoral, não é necessário que ocorra um aumento quantitativo nos níveis de estrógenos, mas possivelmente, a interação destes hormônios com outros fatores de transcrição como citocinas e fatores de crescimento (Olmos Grings et al., 2012).

Também foi demonstrado que os estrógenos exercem efeitos mitogênicos nas células de leiomiomas através da ativação da via das MAP-kinases, possivelmente através da ligação a receptores de membrana, exercendo desta forma um efeito rápido e não-genômico que envolve a fosforilação de proteínas intracelulares. Ainda, sugere-se que a ação dos estrógenos pode ser mediada em parte por fatores de crescimento como EGF, IGF-I e PDGF produzidos nas próprias células-alvo no útero (Barbarisi et al., 2001).

Embora o número de receptores de estrogênio (ER) varie no miométrio durante o ciclo menstrual, o tecido do mioma continua a ter níveis elevados de ERs, especialmente no início das fases folicular e lútea. Além disso, o tecido tumoral perde a capacidade de limitar os níveis de receptores de estrogênio (Nelson et al., 1992).

A progesterona exerce seus efeitos através da interação com os receptores intracelulares específicos, que se apresentam como duas isoformas: PRB (100-120 kDa) e PRA (94 kDa), as quais são produtos de um único gene, como resultado da transcrição de dois promotores alternativos, induzidos por estrógenos, e também da tradução de dois códons de iniciação alternativos do

RNA mensageiro (mRNA) codificando PRB (Gronemeyer et al., 1991; Kastner et al., 1990).

Estes receptores funcionam como fatores de transcrição, mas ambos apresentam funções biológicas diferentes. O PRB é descrito como um 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 pode resultar em reduzida responsividade à progesterona (Conneely et al., 2003; Graham & Clarke, 1997; Mote et al., 2002). O PRB também foi apontado como suficiente para permitir a proliferação e a diferenciação normais do epitélio em resposta à progesterona, sendo que nenhum destes processos aparentemente exige a expressão funcional de PRA (Conneely et al., 2003). A ligação da progesterona aos receptores regula negativamente a transcrição induzida por estrógenos de ambos os subtipos, PRA e PRB, e atua como repressora da atividade dos ER (Hodges et al., 2002).

Várias evidências clínicas e bioquímicas têm indicado um papel crucial da progesterona na patogênese do leiomioma, sugerindo o envolvimento deste hormônio com a proliferação das células tumorais, como a observação de que a atividade mitótica dos leiomiomas é maior na fase secretória do ciclo menstrual (Maruo et al., 2000a; Rein, 2000a). Também foi demonstrado que a administração de acetato de medroxiprogesterona aumentou significativamente a atividade mitótica de leiomiomas em comparação ao grupo controle não-tratado (Tiltman, 1985).

Brandon e colaboradores identificaram um aumento na expressão gênica e proteica de PRs, associado a um aumento do marcador de proliferação celular Ki-67 nos leiomiomas em relação ao miométrio normal adjacente, sugerindo uma amplificação da sinalização mediada pela progesterona no crescimento de leiomiomas (Brandon et al., 1993b). Outras pesquisas também demonstraram um aumento na expressão proteica dos PRs nos leiomiomas em relação ao miométrio normal, com uma significativa dominância da isoforma PRA sobre PRB. Todavia, não foi encontrada a mesma diferença entre os níveis de RNAm dos receptores, sugerindo controle pós-transcricional (Nisolle et al., 1999; Viville et al., 1997a). Diferentemente, Fujimoto e colaboradores identificaram maior expressão de RNAm de PRB em leiomiomas em relação ao miométrio normal, sugerindo um fenótipo ativado para a proliferação celular estimulada pela progesterona. No entanto, não se pode afirmar que níveis elevados de PRA estariam associados a uma menor responsividade à progesterona em leiomiomas (Fujimoto et al., 1998).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa referentes à análise de amostras pareadas de leiomioma e miométrio normal adjacente não encontraram diferenças na expressão gênica e proteica das duas isoformas de receptores de progesterona. No entanto, a expressão gênica e proteica das proteínas p53 e p21, envolvidas com o controle do ciclo celular, foi maior em leiomiomas em relação ao miométrio normal, indicando a possível interação entre hormônios e proteínas intracelulares e evidenciando a variabilidade de mecanismos que podem estar envolvidos na promoção do crescimento desses tumores (Lora et al., 2012).

O crescimento de leiomiomas é o resultado do balanço da dinâmica entre a proliferação, a diferenciação e a morte celular. Contudo, os mecanismos celulares fundamentais envolvidos na ação dos hormônios esteroides sexuais na regulação da proliferação e apoptose das células dos miomas ainda permanecem controversos (Barbarisi et al., 2001; Maruo et al., 2000b; Rein, 2000b).

O tratamento da miomatose atualmente pode ser medicamentoso ou cirúrgico. Os tratamentos cirúrgicos são a miomectomia, que pode ser histeroscópica ou laparotômica e, mais comumente, a histerectomia, a qual elimina os sintomas e as chances de recidiva (Guarnaccia & Rein, 2001; Jourdain et al., 1996). Novas técnicas mais conservadoras, como a embolização de artérias uterinas, têm surgido como alternativa (Hutchins et al., 1999; Pelage et al., 2000). No entanto, existem relatos de taxa de recorrência de leiomiomas de 27% em dez anos (Candiani et al., 1991), 12,7% em dois anos e 16,7% em cinco anos (Doridot et al., 2001).

O tratamento medicamentoso consiste em várias estratégias que objetivam minimizar os sintomas e o crescimento dos leiomiomas. A administração de agonistas do GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas) tem efeitos benéficos na redução dos leiomiomas e controle dos sintomas a curto prazo. Sua utilização prévia ao tratamento cirúrgico tem se apresentado como um consenso. Vários estudos sustentam benefícios intra e pós-operatórios, como menor perda sanguínea, menor necessidade de transfusões e menor tempo cirúrgico. Apesar destes benefícios, a suspensão da medicação leva à recorrência da doença, retomando o volume uterino pré-tratamento em semanas (Chavez & Stewart, 2001; Fedele et al., 1990). Desta forma, apesar

de todo conhecimento adquirido sobre essa doença, não há tratamento cirúrgico conservador ou medicamentoso definitivo (Nowak, 2001).

A mifepristona (RU 486) foi o primeiro antagonista sintético dos receptores de progesterona e de glicocorticóides (Chwalisz et al., 2005).

Apesar de os antagonistas da progesterona mostrarem potencial no tratamento de várias disfunções ginecológicas, eles são utilizados tradicionalmente como contraceptivos de emergência e abortivos (Herrmann et al., 1982).

O fato de a progesterona ter vários efeitos na reprodução feminina ampliou as aplicações clínicas para esta classe de compostos. Desde a síntese da mifepristona, foram descritos inúmeros outros análogos cuja ação varia desde antagonistas da progesterona (PAs) até efeitos mistos agonistas/antagonistas, conhecidos como moduladores seletivos dos receptores de progesterona (PRMs). A mifepristona é considerada PRM pelo fato de em baixas doses poder exibir atividade agonista, embora pouco significativa (Elger et al., 2000).

A mifepristona tem alta afinidade pelos receptores de progesterona e de glicocorticóides. Após sua ligação, a interação entre o receptor e as proteínas de choque térmico hsp90 e a proteína p59 é mantida, mas não há interação com o DNA no elemento responsivo hormonal. A mifepristona tem meia-vida plasmática prolongada, em torno de 20 horas (Sheridan et al., 1989), o que efetivamente exclui a ligação dos agonistas (progesterona ou cortisol) aos receptores. A hiperfosforilação dos receptores também é induzida e, mesmo ocorrendo dimerização dos receptores e ligação

ao DNA, não ocorre a transcrição de genes estimulada pela progesterona (Skafar, 1991).

Tanto os PAs quanto os PRMs podem ter aplicações clínicas no tratamento de miomas. Embora o exato mecanismo do efeito antiproliferativo da mifepristona nesta condição não seja claro, existem evidências clínicas e *in vitro* de que os progestágenos (agonistas) promovam o crescimento dos miomas (Spitz & Chwalisz, 2000).

A expressão das duas isoformas de PRs é elevada em miomas uterinos em relação ao miométrio adjacente, e no mioma parece haver o predomínio da isoforma PRA (Brandon et al., 1993a; Viville et al., 1997b). Estudos *in vitro* demonstram que a expressão do bcl-2, uma proteína reguladora da apoptose, se encontra aumentada em leiomiomas e é regulada pela progesterona (Maruo et al., 2000b; Matsuo et al., 1997).

Alguns estudos sobre a capacidade da mifepristona de reduzir o crescimento de leiomiomas foram realizados. Murphy e colaboradores administraram doses de 5, 25 e 50 mg diariamente durante três meses para um total de 30 pacientes. Observaram uma significativa redução no volume dos miomas nas doses de 25 e 50 mg (Murphy & Castellano, 1994; Murphy et al., 1995a; Murphy et al., 1993b; Murphy et al., 1995b). Yang e colaboradores (2006) administraram doses de 10 e 20 mg diariamente, durante 3 meses, para 43 pacientes com miomas. Houve redução de 40% no volume dos miomas, melhora de sintomas como dor abdominal e anemia, sem diferença significativa entre as duas doses (Yang et al., 1996). Nestes estudos, a menor dose eficaz foi de 10 mg diários. São necessários estudos a longo prazo, particularmente

para avaliar se há crescimento dos miomas após cessado o tratamento (Spitz & Chwalisz, 2000).

A principal desvantagem do tratamento com agonistas do GnRH é a deficiência profunda de estrógenos, trazendo como efeito colateral uma importante perda da massa óssea. Em contraste, no tratamento com mifepristona não foi observada redução na densidade óssea em estudos com humanos (Murphy & Castellano, 1994; Murphy et al., 1995a; Murphy et al., 1993b; Murphy et al., 1995b; Yang et al., 1996) e em primatas (Grow et al., 1996). A mifepristona tem efeito antiproliferativo em tecidos como miométrio e endométrio, mas não no epitélio vaginal e nos ossos. Outros estudos realizados em ratas ovariectomizadas sugerem que a mifepristona não tem efeito nos ossos. Logo, sugere-se que o tratamento de miomas com a mifepristona oferece nítidas vantagens sobre o tratamento com agonistas do GnRH (Barengolts et al., 1995).

Os PAs e PRMs estão entre os compostos terapêuticos mais interessantes e controversos dos últimos vinte anos. É evidente que estes agentes têm numerosas aplicações comprovadas e potenciais na saúde reprodutiva feminina, e restringir sua utilização como método abortivo seria subestimar sua utilidade. O tratamento anti-hormonal para os leiomiomas pode constituir uma alternativa eficaz, de relativo baixo custo e com poucos ou raros efeitos colaterais, conforme tem sido observado em algumas pesquisas. No entanto, são necessários estudos adicionais, principalmente para avaliar efeitos de diferentes doses e efeitos em longo prazo do tratamento com antagonista dos receptores de progesterona (Spitz & Chwalisz, 2000).

HIPÓTESES

- A resposta ao tratamento hormonal pode ser diferente nas células de leiomioma em relação ao miométrio.
- O tratamento com mifepristona pode inibir a proliferação celular de células de miométrio e leiomioma, e a resposta pode variar em função do tratamento com progesterona;
- A resposta aos tratamentos pode estar relacionada a diferenças na expressão gênica dos receptores de progesterona. O tratamento com mifepristona pode alterar a expressão destes receptores.

OBJETIVOS

Estabelecer a técnica de cultura primária de células de leiomioma e miométrio normal adjacente, a partir de espécimes cirúrgicos uterinos; e

Avaliar, no modelo de cultura estabelecido, o efeito do tratamento com estradiol, progesterona e mifepristona sobre a proliferação celular e expressão gênica dos receptores de progesterona A e B.

MÉTODOS

1. Delineamento da Pesquisa

Estudo experimental

2. Pacientes

Foram convidadas a participar do estudo pacientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com indicação de histerectomia por miomatose na fase pré-menopausa, indicada pelo seu médico assistente. Foram excluídas do estudo: pacientes na fase pós-menopausa; pacientes que utilizaram medicação hormonal nos três meses anteriores à cirurgia; pacientes com endocrinopatias ou outras doenças uterinas associadas; exame anátomo-patológico não confirmando diagnóstico de leiomioma uterino.

3. Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Pozzobon, 2006), considerando-se um poder de 95%, nível de significância de 0,05 e diferença entre as médias de 0,34. O cálculo amostral foi baseado em dados de proliferação celular, cujo n necessário é de 6 pacientes em cada grupo. Os tecidos de mioma e miométrio a serem comparados foram obtidos da mesma paciente.

4. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, sob o número 11-0286. As pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1).

5. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no centro cirúrgico imediatamente após a retirada do útero. Os miomas e o tecido miometrial normal adjacente foram identificados e fragmentos destes dois tecidos foram coletados em frascos identificados, sendo o restante do material encaminhado ao exame anátomo-patológico em formol para confirmar o diagnóstico clínico de leiomiomatose.

6. Procedimentos para cultura de células de leiomioma e miométrio humanas

Os fragmentos de leiomioma e miométrio normal foram acondicionados em frasco estéril contendo solução salina com sais de Hank (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e solução de penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA), e transportados ao laboratório acondicionados a 4°C. No laboratório, em capela de fluxo laminar foram retirados os coágulos, o material foi reduzido a fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank, transferido para um frasco de vidro pesado previamente e determinado o peso do tecido. O tecido foi armazenado em frasco contendo solução de Hank a 4°C por 12 a 24 horas para posterior dissociação. Após, foi submetido à dissociação enzimática durante 3 horas a 37°C. O meio de dissociação foi preparado com solução de Hank e a enzima collagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) (7,5mg/g de tecido). O volume total de meio de dissociação é calculado em função do peso do tecido a ser digerido, mantendo-se uma relação de 50 mL de meio para cada 20g de tecido. O processo de dissociação é realizado em frasco de Erlenmeyer especial para digestão enzimática, estando sob constante agitação. Após a dissociação enzimática, a ação da collagenase foi inibida pela adição de igual volume de solução de Hank. Esta suspensão celular foi vertida em filtros de nylon de 250 e 150 micra (Polylabo, Strasbourg, France) para reter porções de tecido não digeridas. O filtrado foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos, e o precipitado ressuspendido em meio para ser semeado em garrafas de cultura.

6.1. Manutenção das células em cultura

As células em cultura eram observadas a cada 24 horas em microscópio invertido (Carl Zeiss Jena, Germany), mantidas e tratadas de acordo com o protocolo experimental desenvolvido para este modelo de cultura celular (Tabela 3; Figuras 6 e 7). Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o algoritmo a seguir (Figura 4).

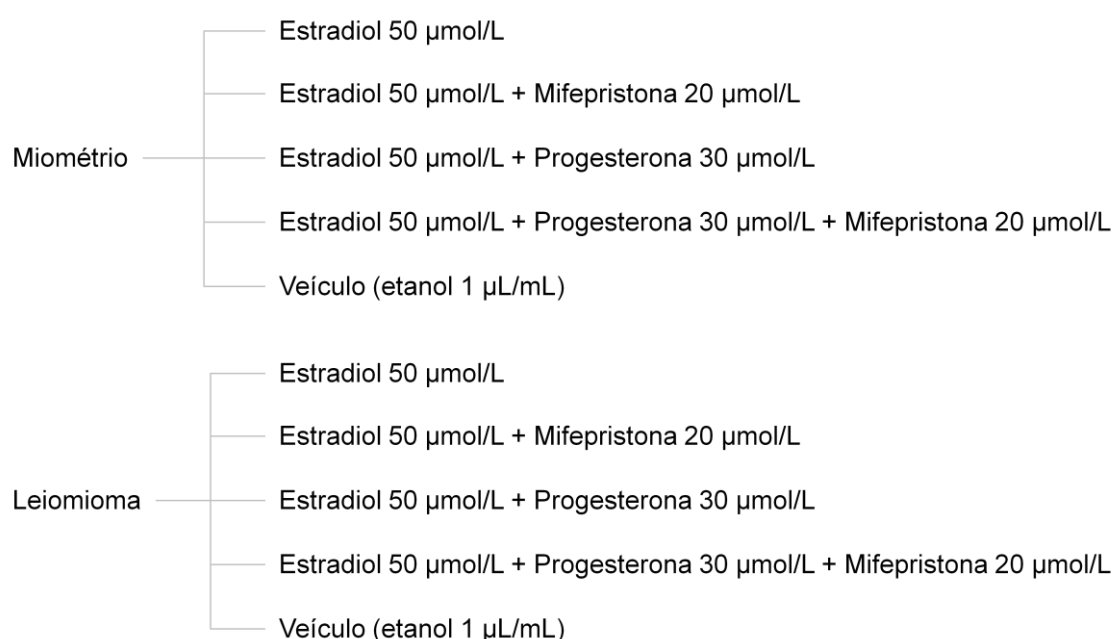


Figura 4. Algoritmo dos grupos experimentais. Para ambos os tipos de tecido, miométrio e leiomioma, os grupos foram assim definidos: Grupo 1: Tratamento com estradiol 50 $\mu\text{mol/L}$. Grupo 2: Tratamento com estradiol 50 $\mu\text{mol/L}$ e mifepristona 20 $\mu\text{mol/L}$. Grupo 3: Tratamento com estradiol 50 $\mu\text{mol/L}$ e progesterona 30 $\mu\text{mol/L}$. Grupo 4: Tratamento com estradiol 50 $\mu\text{mol/L}$, progesterona 30 $\mu\text{mol/L}$ e mifepristona 20 $\mu\text{mol/L}$. Grupo 5: Controle (veículo dos hormônios – etanol 1 $\mu\text{L/mL}$).

As células em suspensão, antes da semeadura, foram submetidas a um teste de viabilidade por coloração com azul de Tripán e contagem em hemocítômetro. Em seguida, foram distribuídas em placas de plástico estéreis do tipo multiwell (Nunclon, Nalge Nunc Intern., Denmark) numa concentração de 1×10^4 células/mL para as técnicas de contagem, extração de RNA e imunocitoquímica, e numa concentração de 10^2 células/mL para a técnica de MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*). A coloração imunocitoquímica era feita concomitantemente, utilizando-se anticorpo para α -actina para confirmar a origem muscular lisa das células em cultura. As placas contendo as células foram incubadas em estufa (NuAire Inc., Minesota, USA) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO_2 .

7. Imunocitoquímica

A análise imunocitoquímica foi realizada conforme o método descrito por Loureiro e colaboradores (Loureiro et al., 2010). As lamínulas de vidro contendo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1%/PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Para o bloqueio de sítios inespecíficos as lamínulas foram incubadas com albumina bovina sérica 5%/PBS durante duas horas. As células foram então incubadas *overnight* com anticorpo primário anti- α -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA), diluído 1:50 em TTBS (0,5M Tris Base, 9% NaCl, 0,5% Tween 20, pH 8,4). Após, foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com os fluoróforos Cy3 (verde, sheep anti-rabbit; 1:5000) ou rodamina (vermelho, sheep anti-mouse; 1:400) durante duas horas.

Foram realizados controles negativos, sem a incubação com o anticorpo primário, nos quais não foi observada imunorreatividade. Os núcleos foram corados com 0,25 µg/mL do corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). As lâminas foram observadas em microscópio invertido e as imagens foram capturadas através de câmera digital acoplada.

8. Avaliação da proliferação celular

Duas técnicas foram empregadas para avaliar a proliferação celular: contagem em hemocitômetro e MTT.

Para a contagem em hemocitômetro, as células foram semeadas em placas de 6 poços numa densidade de 10^4 células/mL de meio de cultura e incubadas com 2 mL de meio com 10% de SBF. Nos dias de avaliação, o meio de cultura foi aspirado e foram feitas duas lavagens com 300 µL de PBS (Tampão Salina-Fosfato) para remoção de células mortas. A seguir, foram adicionados 300 µL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% por poço e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 5 minutos, tempo necessário para ocorrer o descolamento das células da placa. As células ainda aderidas foram removidas da placa com o uso de *scraper*, e a suspensão celular obtida foi transferida para um microtubo, no qual eram acrescentados 600 µL de meio de cultura com 10% de SBF para inativar a atividade proteolítica da tripsina, uma vez que o SBF contém α 1-anti-tripsina. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 800 xg por 10 minutos, o sobrenadante era descartado e o *pellet* de células ressuspendido em meio de cultura. Uma alíquota da suspensão celular foi utilizada para a contagem das células pelo método de exclusão das células mortas com o corante azul de Tripan, em

hemocítômetro espelhado. A contagem de cada grupo foi feita em triplicata (média da contagem de 3 poços).

Para avaliação da proliferação celular pela técnica do MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*) as células foram semeadas em placas multiwell de 96 poços numa densidade de 10^2 células/mL de meio de cultura, incubadas com 100µL de meio com 10% de SBF. Nos dias de avaliação foram retirados 10µL do meio de cultura e adicionados 10µL de solução de 5mg/mL de MTT (Sigma Chem. Co. St Louis, MO, USA) diluído em PBS com pH de 7,2 e incubou-se por 4 horas a 37°C. O MTT é um sal tetrazolium reduzido a formazan pelo sistema mitocondrial succinatotetrazolium redutase. A proliferação das células resulta em um aumento da atividade do sistema mitocondrial que conduz a um aumento na quantidade de formazan formado. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

Após as 4 horas de incubação, aspirou-se todo o meio da placa ficando o formazan retido no fundo da placa. Adicionou-se 100µL de DMSO por poço e a densidade óptica foi medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. A leitura do MTT para cada grupo foi feita em sextuplicata (média da leitura de 6 poços).

9. Avaliação da expressão gênica por RT-PCR

Os níveis de RNAm do PRA e do PRB foram avaliados indiretamente pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir da transcrição reversa, RT-PCR. O princípio desta técnica é a síntese de um DNA complementar ao RNAm (cDNA), cujos fragmentos específicos

homólogos à seqüência do RNAm que codifica cada proteína em estudo podem ser amplificados por PCR e semi-quantificados.

9.1. Extração de RNA total

Após as células receberem as diferentes condições de tratamento, elas foram lavadas duas vezes com 1mL de PBS e lisadas diretamente nas placas com solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) usando 1 mL de trizol/10cm². A solução contendo o lisado de células foi transferida para tubos de microcentrífuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foram incubadas por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. A amostra era separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa era transferida para tubos novos e identificados, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas ou incubadas a 15-30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, adicionando 1mL de etanol/mL de trizol. As amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas a 12.000 xg, 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido e o precipitado seco à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60°C. Após este procedimento o RNA foi quantificado e as amostras armazenadas para posterior síntese de cDNA.

9.2. Quantificação do RNA

A quantificação da concentração de RNA de cada grupo de tratamento das amostras foi realizada por meio do fluorímetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA) segundo o protocolo específico Qubit Quantitation Platform, com reagentes do kit Quant-it™ (Invitrogen®, EUA), utilizando-se 1µL de RNA para cada 199 µL de *working solution* em cada leitura.

9.3. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estima-se que 1µg dá origem a 20ng de cDNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4 com KCl 50mM, cloreto de magnésio 25mM 10mM e ditioneitol (DTT) 0,1M sendo incubado por 2 minutos a 42° C. Em seguida foi feita incubação com a enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

9.4. PCR em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência. Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBR Green I*. O reagente utilizado nas amplificações foi o Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen).

O corante *SYBR Green I* se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1.000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação ou dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso se obteve a especificidade do produto amplificado, uma vez que a T_m é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos. A figura 5 ilustra curvas de dissociação obtidas em reações de PCR em tempo real para o RNAm de PRB e PRAB.

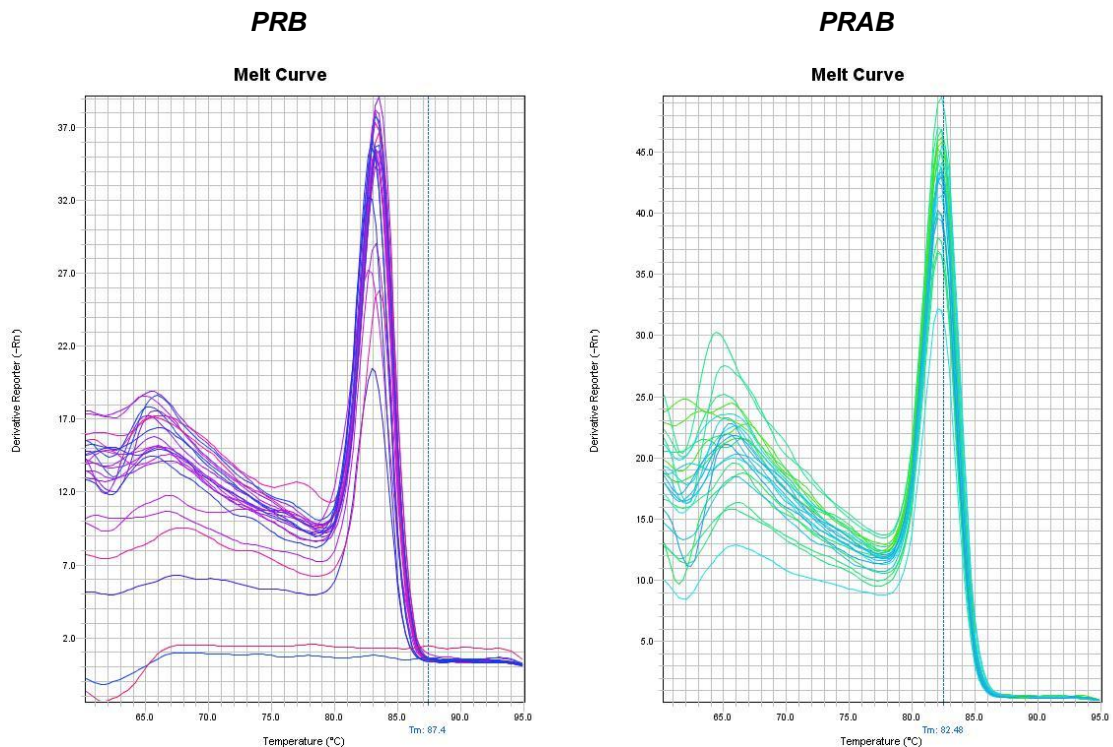


Figura 5. Curvas de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real. As curvas correspondem aos produtos da amplificação das reações para o RNAm de PRB e PRAB, respectivamente. As curvas foram construídas com aumentos gradativos de 0,5°C, entre 60 e 99°C. A fluorescência foi lida por 10s.

Curva de Padronização

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva de padronização, através da qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA de células de mioma e miométrio (de 0,0002 ng a 2 ng). Cada diluição do cDNA foi feita em duplicata, juntamente com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluísse o valor esperado para o RNAm nas amostras. O momento em que

ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T , que é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de cDNA (ng). Portanto, a curva de padronização é gerada utilizando-se os valores de C_T , num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *SYBR Green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA.

Curva de Normalização

Para minimizar possíveis variações de massa entre as amostras, nos procedimentos experimentais, um gene normalizador foi amplificado simultaneamente ao gene de interesse. O gene normalizador ou constitutivo é um gene expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Neste trabalho foi utilizado como gene constitutivo o da $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2$ -m), amplificado da mesma forma que o gene de interesse (curva padrão de 0,0002 a 2 ng de cDNA). Em cada reação realizada para a amplificação do gene de interesse foi feita a amplificação do gene constitutivo, minimizando assim as variações de pipetagem. Os resultados são expressos como a relação gene de interesse/ $\beta 2$ -microglobulina, em unidades arbitrárias.

Protocolo geral da RT-PCR em tempo real

As condições da reação de PCR para cada gene são padronizadas antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testadas a concentração e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e a duração de cada etapa do ciclo. A concentração final dos oligonucleotídeos

em cada reação foi de 100 nM, e os programas utilizados para amplificação de cada gene estão listados na tabela 1. A tabela 2 lista as características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes em estudo.

O reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG é fornecido a uma concentração de 2X. A *mix* é otimizada para reações com o reagente *SYBR Green*, e contém: corante *SYBR Green I*; Platinum® *Taq* DNA Polimerase; dNTPS; solução tampão com concentrações otimizadas de seus componentes (Tris-HCl, KCl e MgCl₂). Assim, as reações foram realizadas adicionando-se, para cada amostra, 12,5 µL deste reagente, 0,25 µL da solução de uso de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2 µL da amostra e 10 µL de água, conforme padronização, totalizando um volume final de 25 µL. As amostras foram amplificadas no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, USA).

As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 40 ciclos, e a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência (C_T limiar), conforme descrito anteriormente.

Tabela 1. Programas utilizados nas reações de PCR em tempo real, para amplificação dos genes em estudo.

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Temperatura de Melting (valor aproximado)
<i>β2m</i>	-	-	-	-	77°C
<i>PRB</i>	94°C 50s	59°C 40s	72°C 45s	40	80°C
<i>PRAB*</i>	94°C 45s	56°C 30s	72°C 45s	40	81°C

**PRAB – fragmento comum às duas isoformas do receptor de progesterona. Por diferirem apenas na região N-terminal da proteína PRB, não é possível avaliar a expressão gênica de PRA isoladamente. Assim, utiliza-se a denominação PRAB, que indica a análise da expressão de ambos os mRNAs codificadores de PRA e PRB.*

Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real, para amplificação de fragmentos dos genes em estudo.

Gene	Sequência sintetizada	Fragmento	Referência
<i>β2m</i>			
<i>sense</i>	5"CTATCCAGCGTACTCCAAAG3'	168 pb	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
<i>antisense</i>	5"ACAAGTCTGAATGCTCCACT3'		
<i>PRB</i>			
<i>sense</i>	5'GCCAGACCTCGGACACCTT3'	77 pb	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004
<i>antisense</i>	5'CAGGGCCGAGGGAAGAGTAG3'		(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004))
<i>PRAB</i>			
<i>sense</i>	5'AGAGCACTGGATGCTGTTGCT3'	68 pb	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004
<i>antisense</i>	5'TGGCTTAGGGCTTGGCTTT3'		(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004))

10. Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. Os dados obtidos de proliferação celular (contagem e MTT) foram representados como média \pm erro padrão da média por terem apresentado distribuição normal ($n=5$). Os dados obtidos de expressão gênica foram representados como mediana e intervalo máximo e mínimo, por não terem obtido distribuição normal. Devido ao reduzido tamanho amostral ($n=3$), não foi possível realizar análise estatística e os dados foram apresentados apenas em caráter descritivo.

Os dados de proliferação celular (contagem e MTT) foram avaliados quantitativamente através do teste de Equações de Estimação Generalizadas (*Generalized Estimating Equations – GEE*) e teste de Bonferroni *post hoc*. O método das Equações de Estimação Generalizadas (*Generalized Estimating Equations – GEE*) foi proposto por Zeger e Liang (Zeger & Liang, 1986) com o objetivo de estimar parâmetros de regressão especialmente quando os dados estão correlacionados. O modelo GEE avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em um contexto populacional, e não somente individual, sendo o método mais recomendado para se estudar a diferença na resposta média populacional entre grupos com diferentes fatores de risco (Twisk, 2004).

Em situações em que os sujeitos estudados são independentes, mas a informação sobre uma variável é coletada repetidas vezes ao longo do tempo, estas observações são correlacionadas. É possível também que os sujeitos dividam características em comum, e, portanto, não possam ser considerados independentes. Neste caso pode haver uma estrutura natural de

correlação entre os sujeitos. O primeiro caso é conhecido como medidas repetidas, e o segundo caso, como dados agrupados (*clustered data*). A correlação, nestes casos, pode ocorrer, já que as observações feitas em um mesmo indivíduo ou em um mesmo grupo tendem a ser mais semelhantes do que as observações de indivíduos diferentes ou de diferentes grupos (Agranonik, 2009).

No caso do presente estudo, foram utilizadas amostras de dois tipos de tecido pareados (miotério normal e leiomioma) provenientes de cinco pacientes diferentes. No esquema experimental das culturas, miootério e leiomioma de cada paciente foram submetidos a cinco diferentes grupos de tratamento hormonal, de forma que a combinação tecido-tratamento totalizou 10 grupos por indivíduo. Desta forma, fica claro que cada um dos grupos não pode ser tratado de forma independente, havendo correlação tanto entre os dois tipos de tecido (provenientes da mesma paciente) e entre os tipos de tratamento. Ainda, as informações sobre a proliferação celular (contagem de células e MTT) foram coletadas duas vezes ao longo do esquema experimental: ao fim do período de tratamento com mifepristona e após um período de recuperação de 48 horas sem o tratamento, caracterizando uma relação de dependência entre as variáveis.

Os modelos tradicionais de regressão, como o *General Linear Model* (GLM), têm uso limitado devido à suposição de independência entre os sujeitos. Este modelo, se utilizado para dados correlacionados, pode levar a inferências estatísticas incorretas devido a distorções nas estimativas dos parâmetros e de seus erros padrão. Uma alternativa seria a utilização da Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas para avaliar mudanças

em um desfecho contínuo ao longo do tempo e comparar estas mudanças entre grupos. Entretanto, além deste método ser utilizado somente para desfechos com distribuição normal, não permite ajuste para exposições que se modifiquem ao longo do tempo, além de necessitar de balanceamento em relação ao número de repetições (Agranonik, 2009).

O GEE estima coeficientes de regressão e erros padrões com distribuições amostrais normais e não normais. Pode ser utilizado para testar efeitos principais e interações, permitindo avaliar variáveis independentes categóricas ou contínuas. Este método deve ser utilizado quando o objetivo da análise estatística é descrever a esperança da variável resposta em função de um conjunto de covariáveis considerando a correlação entre as observações (Agranonik, 2009).

Além disso, foi utilizado o teste de Correlação de Pearson, para verificar uma possível correlação entre as variáveis contagem de células e MTT.

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

RESULTADOS

1. Estabelecimento da cultura primária de mioma e miométrio

Os meios de cultivo foram testados em 6 culturas até que fossem identificadas as condições que proporcionassem adesão, diferenciação e proliferação adequadas das células, para ambos os tipos de tecido. A semeadura das células foi testado com os meios DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), F12 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), DMEM+F12 1:1 e soro bovino fetal (SBF) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou soro bovino fetal desteroídado (SBF-DT). Todos os meios de cultura foram suplementados com 1% de antibióticos (solução de penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL) e estradiol 10^{-5} M, exceto os testes feitos com SBF puro e desteroídado. A adesão das células foi avaliada nas primeiras 48 horas, e a diferenciação nas 48 horas subsequentes. A tabela 3 descreve as condições de cultivo testadas e a resposta observada para ambos os tipos de tecido.

Tabela 3. Condições de cultivo testadas e respostas observadas para cada tipo de tecido.

Teste	Tecido	Meio testado	Resposta	
1	Miométrio	DMEM + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.	
		F12 + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 30%, diferenciação inferior a 50%.	
		DMEM/F12 1:1 + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.	
	Leiomioma	DMEM + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.	
		F12 + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 30%, diferenciação inferior a 10%.	
		DMEM/F12 1:1 + SBF-DT 10%	Adesão celular inferior a 30%, sem diferenciação.	
	2	Miométrio	SBF	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.
			SBF-DT	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.
		Leiomioma	SBF	Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.
SBF-DT			Adesão celular inferior a 10%, sem diferenciação.	
3	Miométrio	DMEM + SBF 10%	Adesão celular em torno de 50%, diferenciação em torno de 10%.	
		F12 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 50%, característica de células musculares lisas.	
		DMEM/F12 1:1 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 50%, característica de células musculares lisas.	

	Leiomioma	DMEM + SBF 10%	Adesão celular em torno de 50%, diferenciação em torno de 10%.
		F12 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 50%, característica de células musculares lisas.
		DMEM/F12 1:1 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 70%, diferenciação em torno de 10%.
4	Miométrio	F12 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 70%, característica de células musculares lisas.
		DMEM/F12 1:1 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 70%, característica de células musculares lisas.
	Leiomioma	F12 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 90%, diferenciação maior que 70%, característica de células musculares lisas.
		DMEM/F12 1:1 + SBF 10%	Adesão celular em torno de 70%, diferenciação em torno de 30%.

Foram realizadas duas culturas para o teste 1, utilizando-se os meios de cultura: i) DMEM suplementado com SBF-DT 10%; ii) F12 suplementado com SBF-DT 10% e iii) DMEM/F12 1:1 suplementado com SBF-DT 10%. Para o teste 2, também foram realizadas duas culturas utilizando-se SBF e SBF-DT. Para o teste 3, foram realizadas duas culturas utilizando-se os meios de cultura: i) DMEM suplementado com SBF 10%; ii) F12 suplementado com SBF 10% e iii) DMEM/F12 1:1 suplementado com SBF 10%. Para o teste 4, em duas culturas, foram testados novamente os meios de cultura que no teste 3 proporcionaram boas condições de adesão e diferenciação: i) F12 suplementado com SBF 10% e ii) DMEM/F12 1:1 suplementado com SBF 10%.

Todos os testes foram feitos nos dois tipos de tecido e as respostas observadas estão descritas na tabela 3.

A condição que proporcionou maior adesão, diferenciação e proliferação das células para ambos os tipos de tecido foi o meio de cultura F12 suplementado com 10% de SBF.

Para a realização dos experimentos de proliferação, foi necessário padronizar o tempo do esquema experimental. Inicialmente, após a dissociação, as células foram semeadas em garrafas de 150 cm². A proliferação celular foi acompanhada diariamente, até que a monocamada de células atingisse aproximadamente 80% de confluência. Foi observado que, em média, as culturas atingiam a subconfluência em torno de 7 dias após a dissociação e a semeadura. Neste dia, considerado o dia 8, as garrafas foram tripsinizadas e a suspensão celular obtida foi distribuída em placas para a realização dos experimentos de proliferação e extração de RNA (Figura 7).

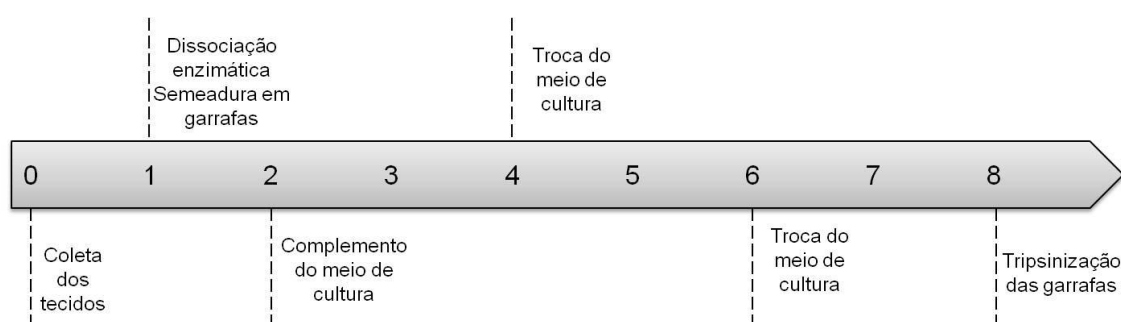


Figura 6. Esquema temporal das culturas em garrafas de 150 cm² (em dias).

As células foram semeadas na densidade de 10^4 células por poço para os experimentos de proliferação e extração de RNA, em placas de 6 poços, e na densidade de 10^2 para os experimentos de MTT, em placas de 96 poços. Inicialmente, as células foram tratadas somente com a combinação hormonal correspondente a cada grupo, sem o tratamento com mifepristona, durante as primeiras 72 horas após a semeadura (dia zero), para permitir a adesão e diferenciação das células. Nos dias 3 e 5, foram feitos os tratamentos correspondentes a cada grupo, sendo tratados com mifepristona os grupos 2 e 4, totalizando 96 horas de tratamento. No dia 7 foram feitos os experimentos de proliferação (contagem e MTT) e extração de RNA, para avaliar o efeito do tratamento com mifepristona sobre esses parâmetros. No mesmo dia, outro grupo de células permaneceu em cultura, recebendo tratamento hormonal correspondente a cada grupo, porém sem o tratamento com mifepristona. Este grupo de células foi avaliado quanto à proliferação no dia 9, para verificar o efeito da supressão do tratamento com mifepristona após 48 horas (Figura 7).



Figura 7. Esquema temporal das culturas em placas multiwell, para os experimentos de proliferação e extração de RNA (em dias).

2. Caracterização dos tecidos

Macroscopicamente, os leiomiomas coletados como amostra do presente estudo apresentaram-se como únicos ou múltiplos e de tamanho variável. Eram tumores redondos ou ovais, com ou sem lóbulos. Os nódulos eram circunscritos, apresentavam superfície de corte esbranquiçada e fasciculada com consistência firme. A periferia dos leiomiomas geralmente apresentava uma condensação de tecido conjuntivo, formando uma cápsula com pouca vascularização. Em secção eram observadas predominantemente fibras musculares lisas, dispostas em feixes em diferentes direções, permeadas por variável quantidade de colágeno e vasos sanguíneos. Os tumores eram facilmente enucleáveis do miométrio circunjacente, o qual apresentava características macroscópicas bem distintas: coloração rósea, consistência frouxa, ausência de cápsula e maior vascularização, fibras em feixes que geralmente se apresentavam na mesma direção.

Após a dissociação do tecido, ao serem atingidas as condições ideais de cultivo, as células foram observadas ao microscópio óptico a cada 24 horas. Observou-se que, microscopicamente, as células dos dois tipos de tecido assemelham-se e apresentam características típicas de células musculares lisas: células fusiformes, alongadas, medindo entre 50 e 100µm, mononucleadas, com núcleos uniformes de bordas regulares. Sete dias após a semeadura, as células já apresentavam diferenciação e subconfluência em garrafas de cultura (Figura 8).

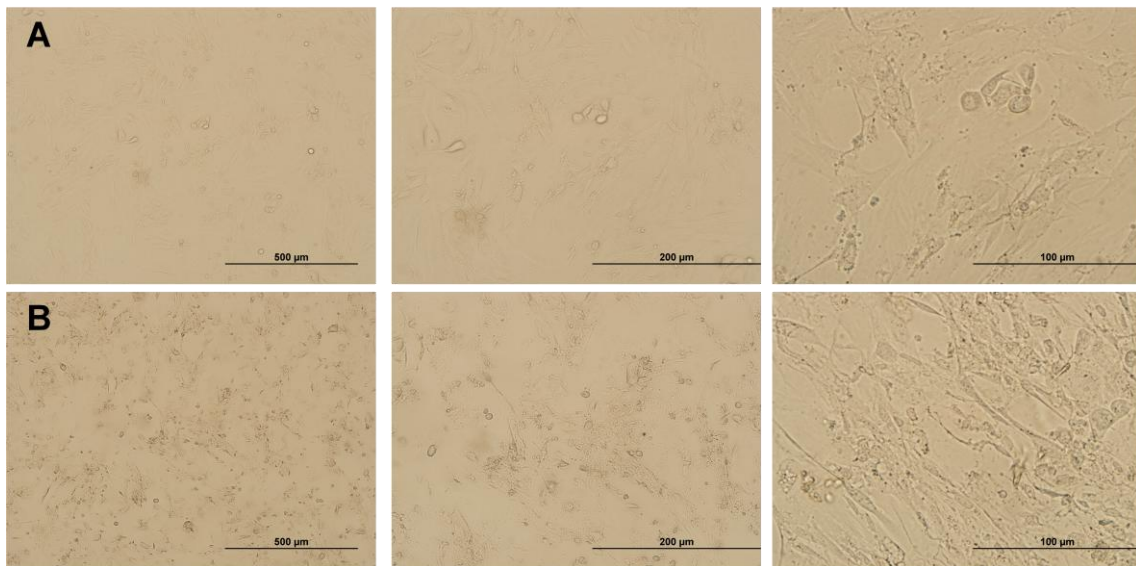


Figura 8. Células de cultura primária de miométrio normal (A) e leiomioma (B) em monocamada, após 7 dias de cultivo. Aumento 40 x.

As células de miométrio e leiomioma foram acompanhadas durante 15 dias, com trocas de meio de cultura a cada 48 horas. Observou-se que ao fim do período as células de miométrio formaram feixes na mesma direção (Figura 9), enquanto as células de leiomioma formaram feixes difusos (Figura 10).

Todas as culturas foram positivas para a proteína α -actina pela técnica de imunocitoquímica de fluorescência (Figura 11).

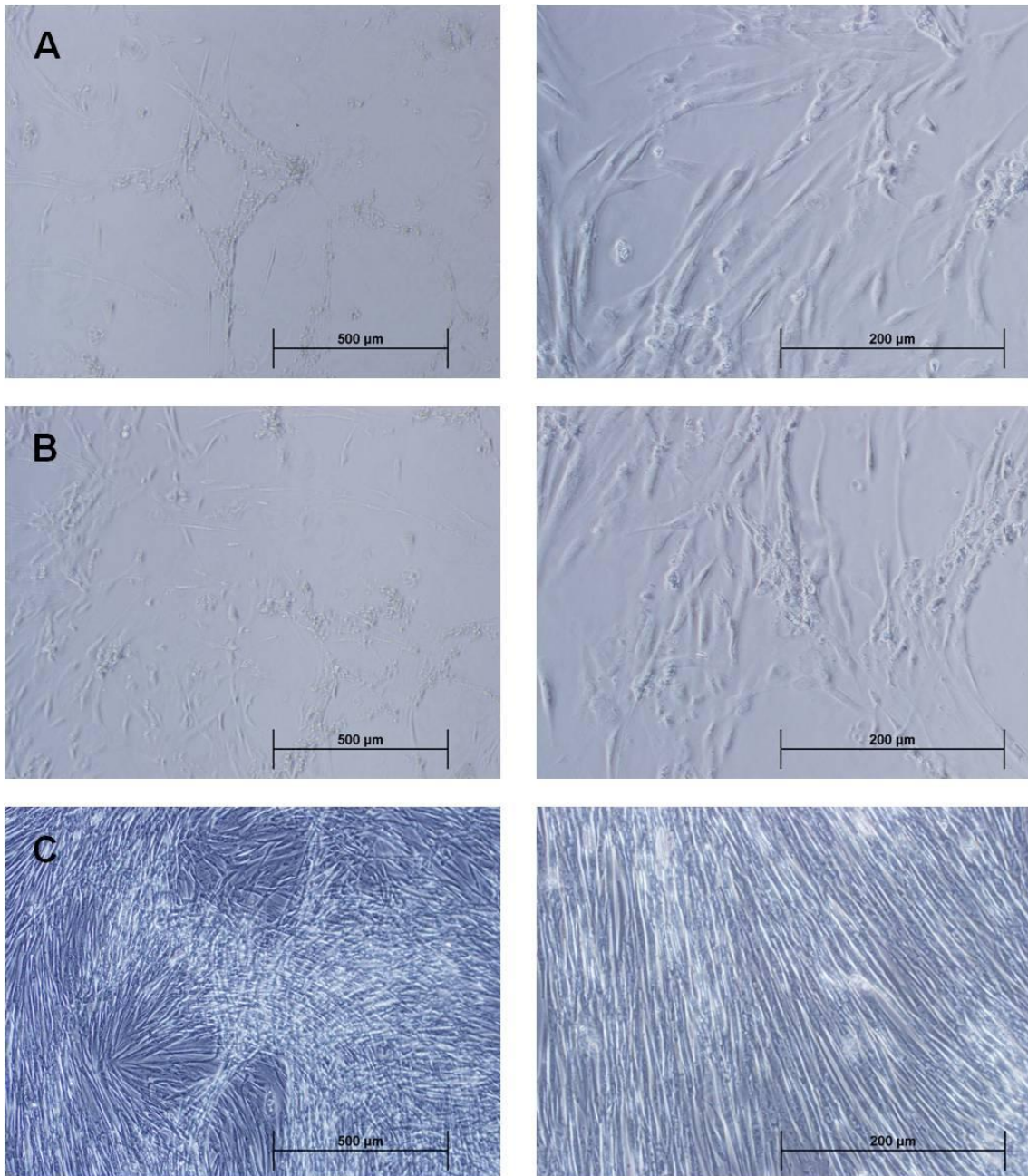


Figura 9. Células de cultura primária de miométrio em monocamada após 5 dias de cultivo (A), 10 dias de cultivo (B) e 15 dias de cultivo (C).

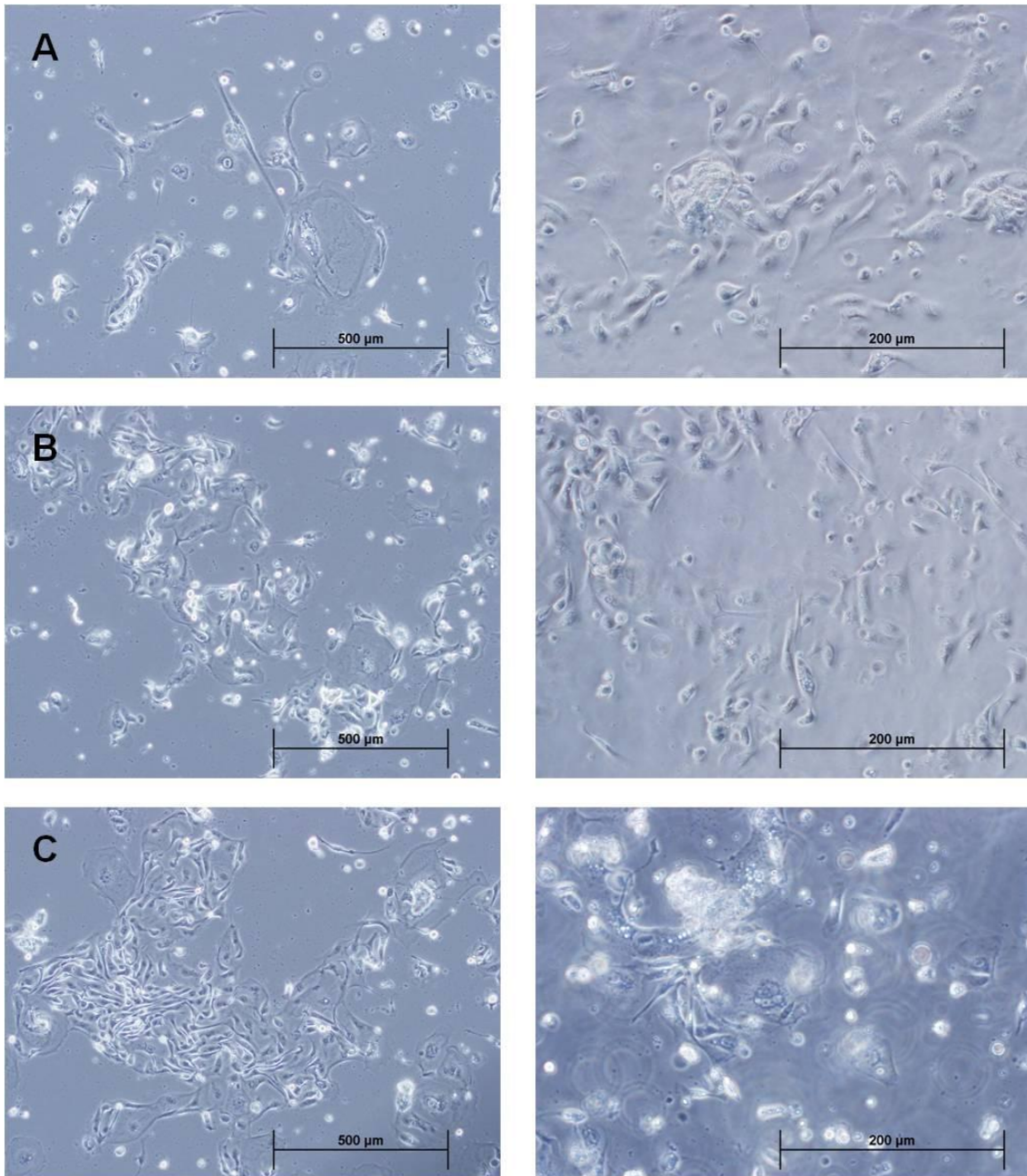


Figura 10. Células de cultura primária de leiomioma em monocamada após 5 dias de cultivo (A), 10 dias de cultivo (B) e 15 dias de cultivo (C).

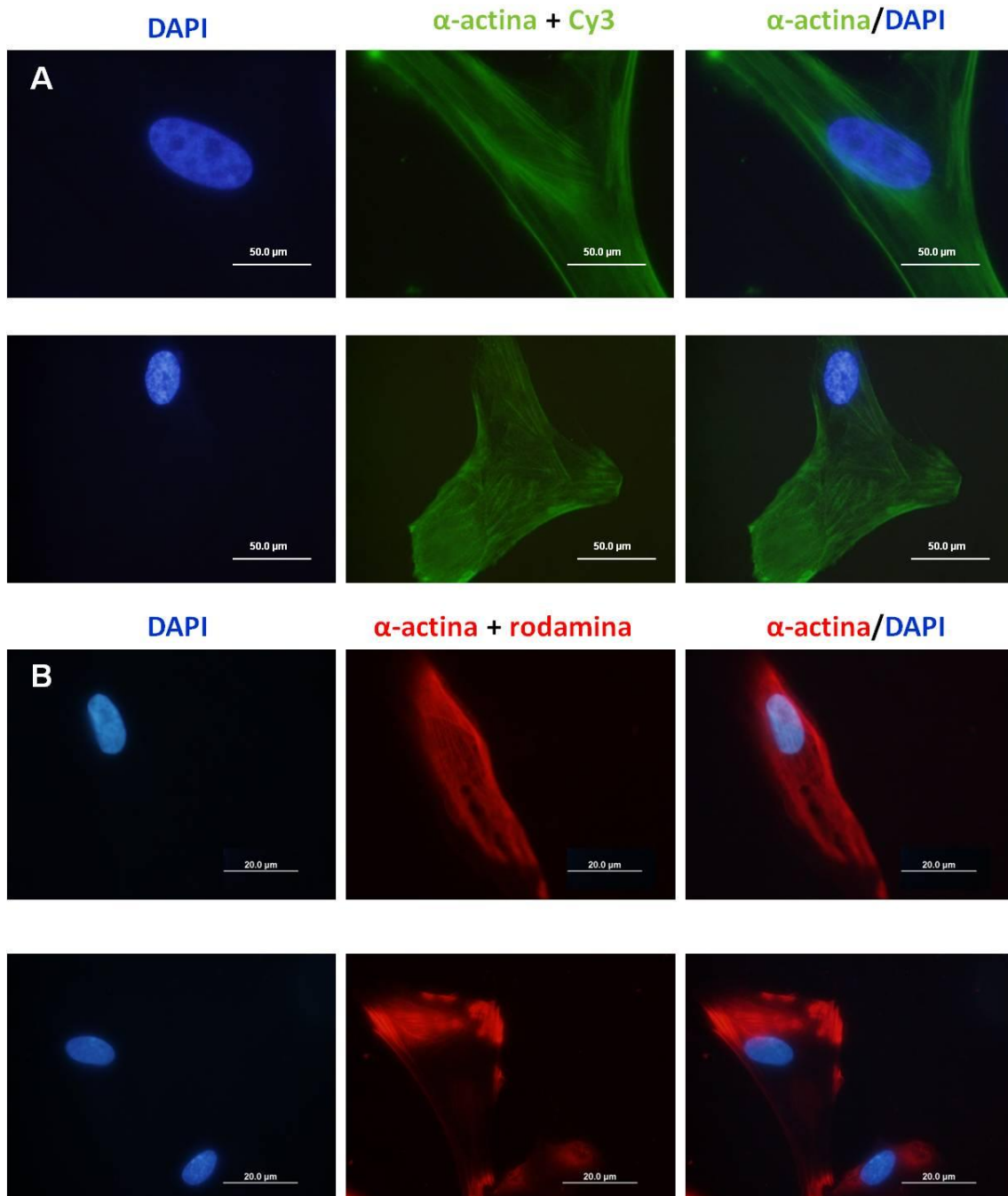


Figura 11. Imunocitoquímica de fluorescência. Células de cultura primária de miométrio normal (A) tratadas com anticorpo primário anti α -actina e anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo Cy3 (verde). Células de cultura primária de leiomioma (B) tratadas com anticorpo primário anti α -actina e anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo rodamina (vermelho). Os núcleos foram corados com DAPI (azul).

3. Avaliação da proliferação celular

Em culturas de amostras de tecidos obtidas de 5 pacientes, a proliferação celular dos diferentes grupos foi avaliada quantitativamente através das técnicas de contagem de células e MTT, em dois tempos durante o período de tratamento (tempos 7 e 9), nos quais as células receberam os tratamentos descritos na tabela 4.

Tabela 4. Descrição do esquema de tratamento dos grupos.

Grupo	Tempo 7	Tempo 9
Estradiol	7 dias de tratamento com estradiol	2 dias adicionais de tratamento com estradiol
Estradiol + Mifepristona	3 dias de tratamento com estradiol + 4 dias de tratamento com estradiol e mifepristona	2 dias adicionais de tratamento com estradiol, sem mifepristona
Estradiol + Progesterona	7 dias de tratamento com estradiol e progesterona	2 dias adicionais de tratamento com estradiol e progesterona
Estradiol + Progesterona + Mifepristona	3 dias de tratamento com estradiol e progesterona + 4 dias de tratamento com estradiol, progesterona e mifepristona	2 dias adicionais de tratamento com estradiol e progesterona, sem mifepristona
Controle	7 dias em meio controle	2 dias adicionais em meio controle

Os resultados da proliferação celular obtidos por contagem de células nos tempos 7 e 9 para ambos os tipos de tecido estão descritos na tabela 5, e os resultados obtidos através do MTT nos tempos 7 e 9 para ambos os tipos de tecido estão descritos na tabela 6.

Tabela 5. Análise da proliferação celular de miométrio e leiomioma avaliada por contagem de células nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

Grupo	Miométrio		Leiomioma	
	Contagem, tempo 7	Contagem, tempo 9	Contagem, tempo 7	Contagem, tempo 9
Estradiol	74,29 \pm 4,61	86,95 \pm 3,94	89,95 \pm 6,80	114,05 \pm 7,68
Estradiol+ Mifepristona	63,59 \pm 6,28	76,99 \pm 5,61	70,08 \pm 5,92	76,70 \pm 5,13
Estradiol + Progesterona	106,10 \pm 6,04	130,30 \pm 7,06	126,05 \pm 9,21	147,95 \pm 11,66
Estradiol+ Progesterona +Mifepristona	80,00 \pm 8,95	101,03 \pm 12,88	76,40 \pm 6,81	85,38 \pm 6,70
Controle	48,85 \pm 2,30	56,53 \pm 3,70	48,30 \pm 4,44	51,98 \pm 4,63

Tabela 6. Análise da proliferação celular de miométrio e leiomioma avaliada por MTT nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

Grupo	Miométrio		Leiomioma	
	MTT, tempo 7	MTT, tempo 9	MTT, tempo 7	MTT, tempo 9
Estradiol	0,325 \pm 0,040	0,399 \pm 0,040	0,415 \pm 0,044	0,533 \pm 0,054
Estradiol + Mifepristona	0,275 \pm 0,053	0,330 \pm 0,049	0,333 \pm 0,035	0,381 \pm 0,037
Estradiol + Progesterona	0,455 \pm 0,017	0,549 \pm 0,033	0,664 \pm 0,061	0,798 \pm 0,071
Estradiol + Progesterona +Mifepristona	0,299 \pm 0,029	0,367 \pm 0,039	0,366 \pm 0,033	0,418 \pm 0,031
Controle	0,231 \pm 0,034	0,286 \pm 0,047	0,213 \pm 0,027	0,252 \pm 0,042

Para todos os grupos, observou-se um aumento significativo na proliferação celular no tempo 9 em relação ao tempo 7 pelos dois métodos utilizados (tabelas 5 e 6). Os resultados para os dois tipos de tecido podem ser observados nas figuras 12 a 15.

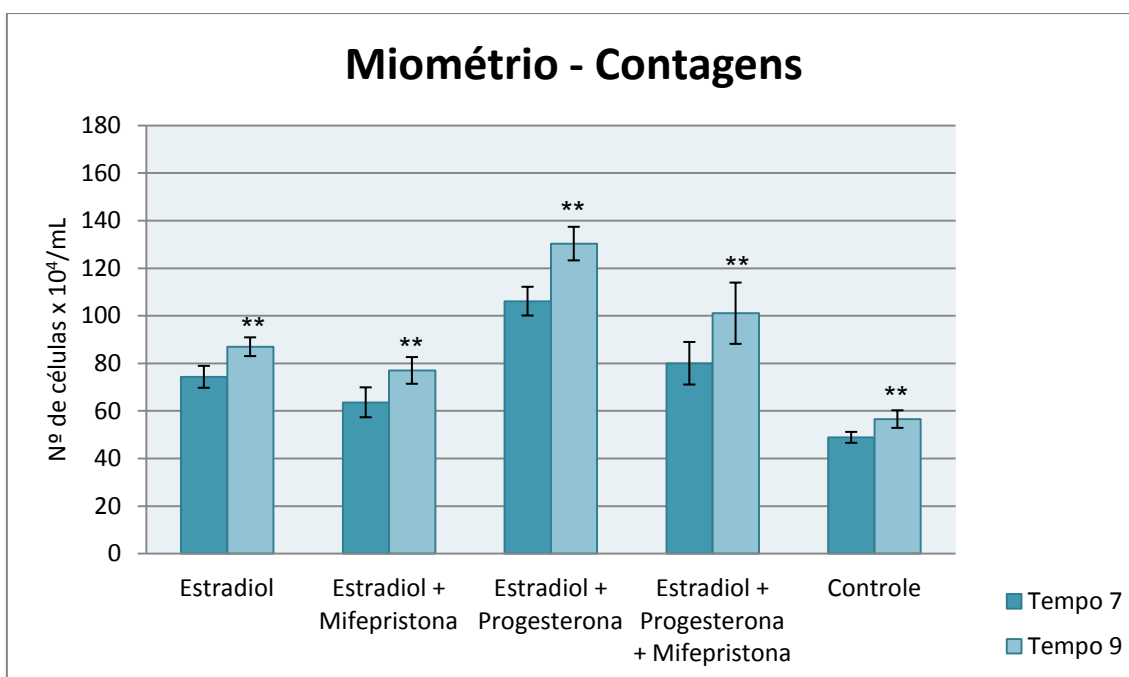


Figura 12. Análise da proliferação celular de miométrio por contagem de células nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre as contagens no tempo 7 e no tempo 9, Teste de GEE, $p < 0,01$).

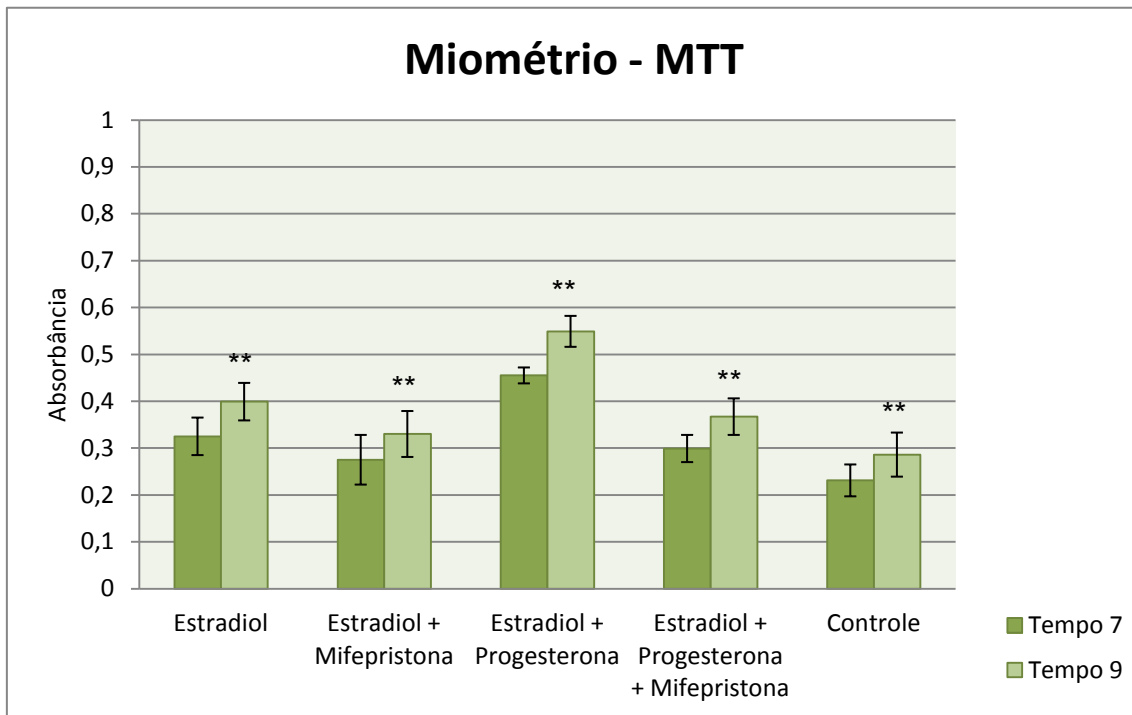


Figura 13. Análise da proliferação celular de miométrio por MTT nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre o MTT no tempo 7 e no tempo 9, Teste de GEE, $p < 0,01$).

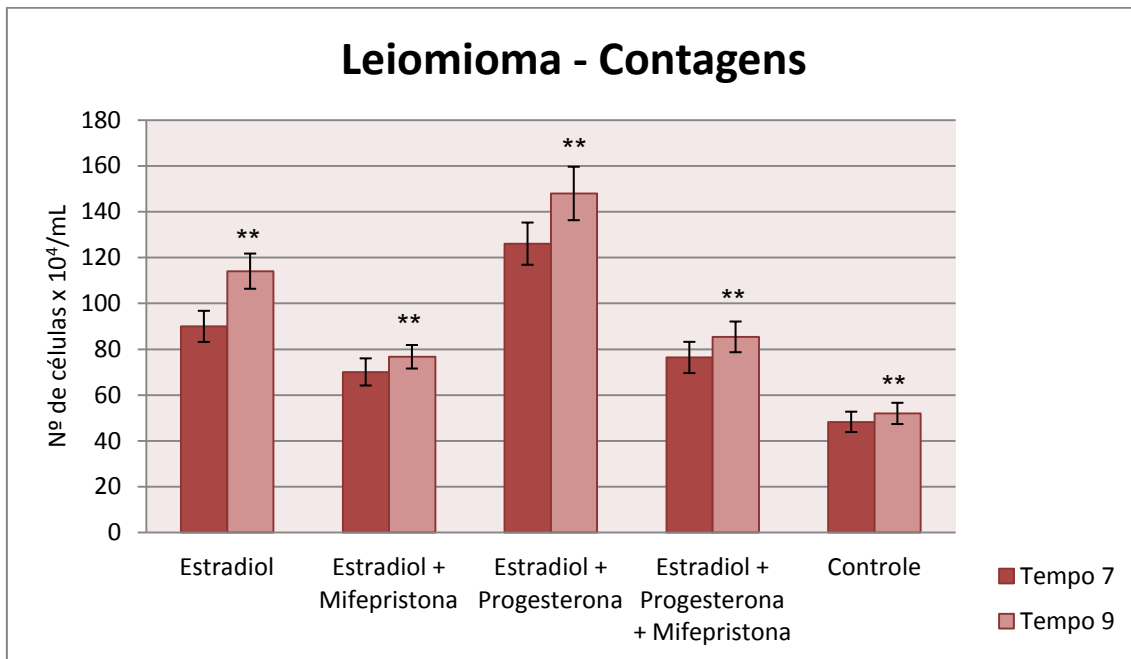


Figura 14. Análise da proliferação celular de leiomioma por contagem de células nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre as contagens no tempo 7 e no tempo 9, Teste de GEE, $p < 0,01$).

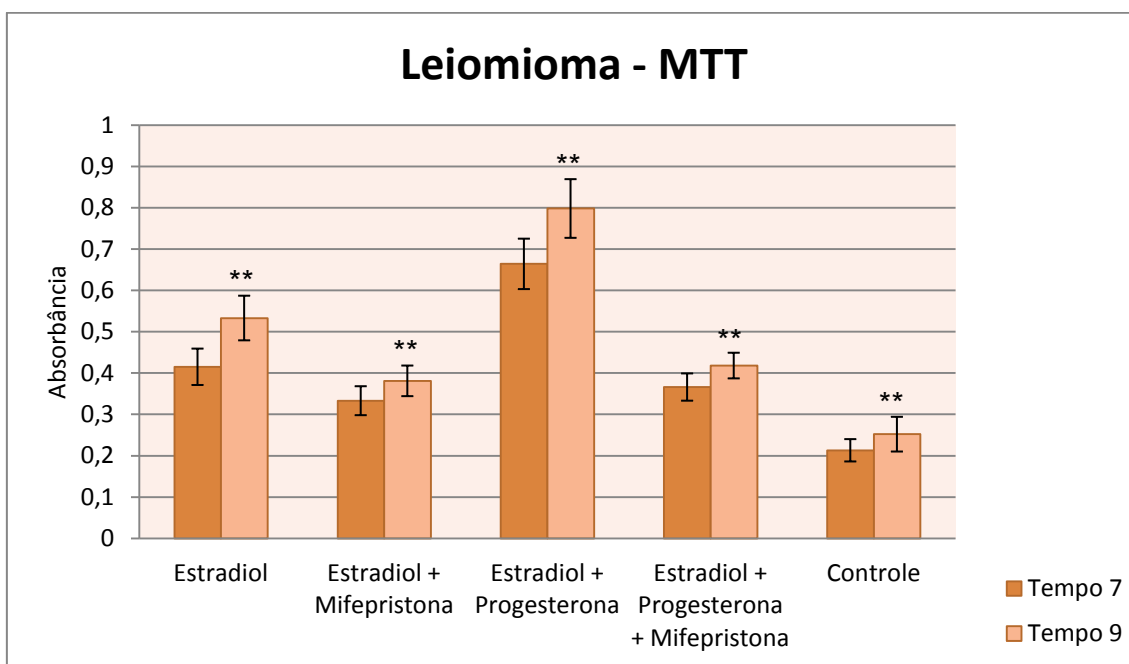


Figura 15. Análise da proliferação celular de leiomioma por MTT nos tempos 7 e 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre o MTT no tempo 7 e no tempo 9, Teste de GEE, $p < 0,01$).

Em cada um dos dias de avaliação, e para os dois tipos de tecido estudados, foram observadas diferenças significativas na proliferação celular entre os grupos, pelos dois métodos utilizados. Estas diferenças estão representadas por letras minúsculas nas tabelas 5 e 6 e serão descritas detalhadamente a seguir.

Considerando a análise da proliferação celular pela contagem de células no tempo 7, os grupos de leiomioma tratados com **estradiol**, **estradiol e mifepristona** e **estradiol e progesterona** tiveram maior proliferação do que os mesmos grupos de miométrio. Em relação aos grupos tratados com **estradiol**, **progesterona e mifepristona** e **controle**, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de tecido (Figura 16).

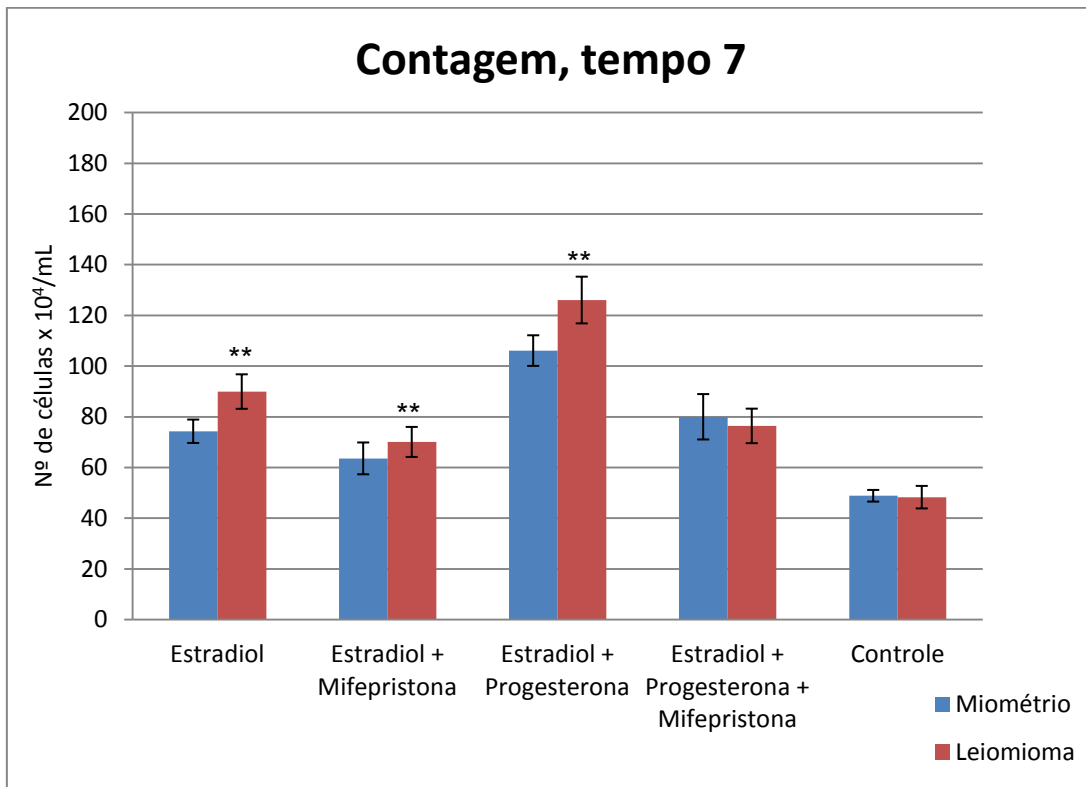


Figura 16. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 7. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, $p < 0,01$).

Considerando a análise da proliferação celular através da contagem de células no tempo 9, os grupos de leiomioma tratados com **estradiol** e **estradiol e progesterona** tiveram maior proliferação do que os mesmos grupos de miométrio. No grupo tratado com **estradiol, progesterona e mifepristona**, o oposto foi observado: maior proliferação do miométrio em relação ao leiomioma. Em relação aos grupos tratado com **estradiol e mifepristona** e **controle**, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de tecido (Figura 17).

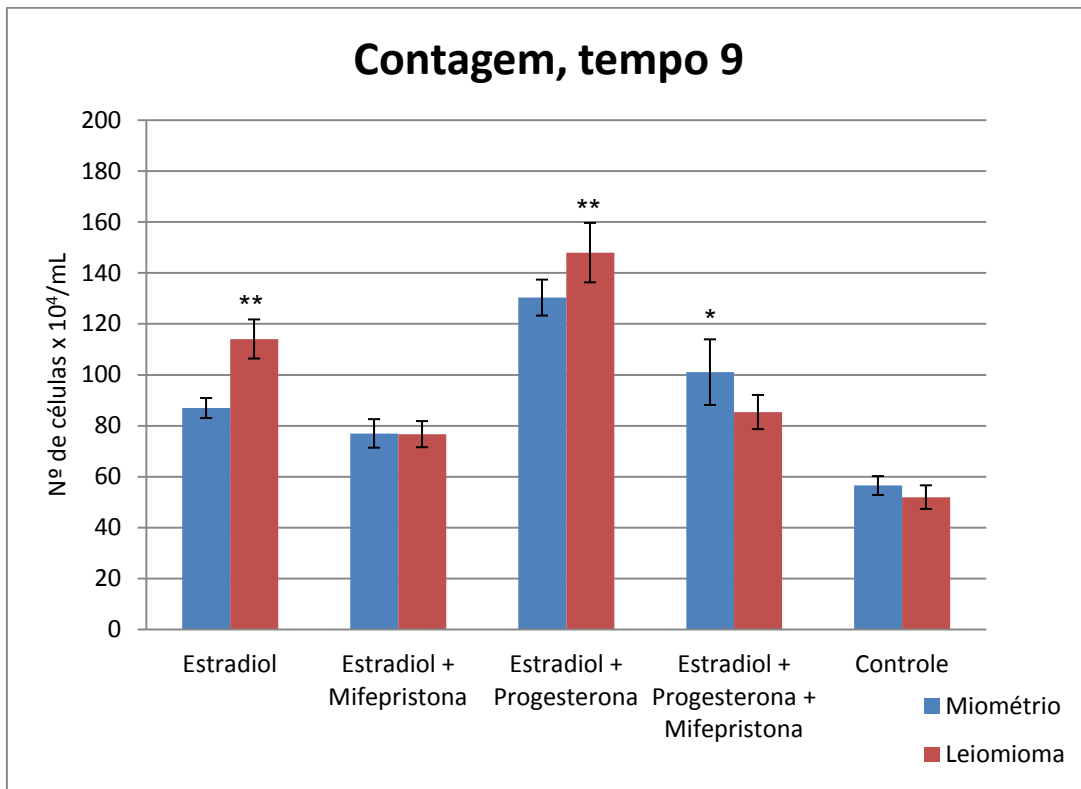


Figura 17. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (* e ** representam diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Considerando a análise da proliferação celular através do MTT no tempo 7, os grupos de leiomioma tratados com **estradiol**, **estradiol e progesterona**, e **estradiol, progesterona e mifepristona** tiveram maior proliferação do que os mesmos grupos de miométrio. Em relação aos grupos tratado com **estradiol e mifepristona** e **controle**, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de tecido (Figura 18).

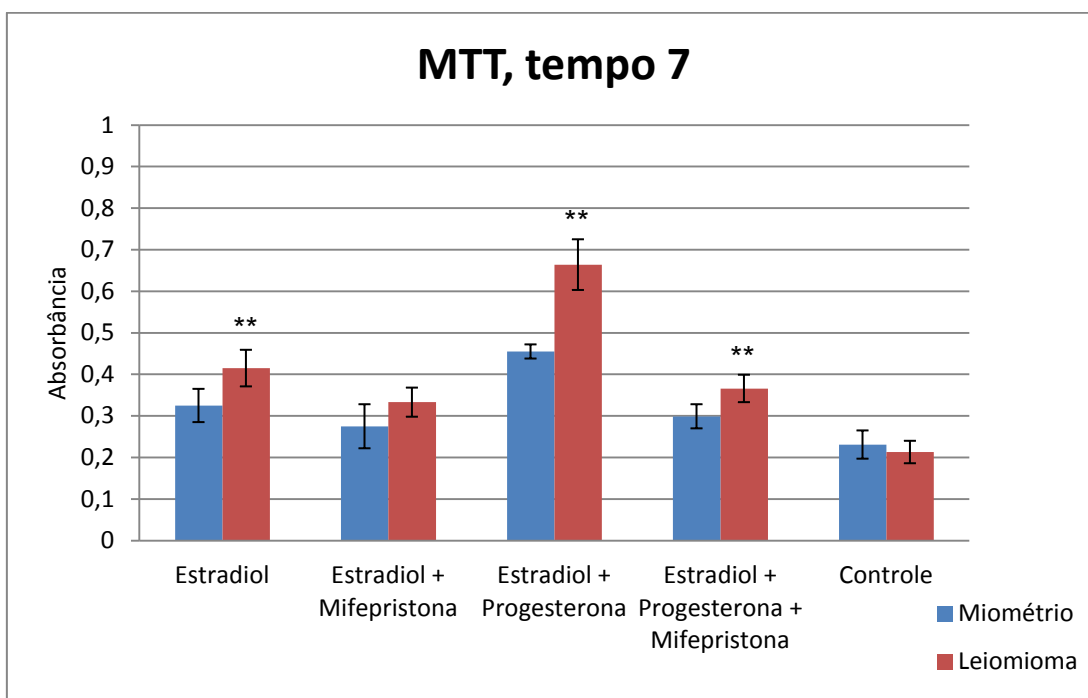


Figura 18. Análise da proliferação celular através de MTT em mioma e miométrio no tempo 7. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, $p < 0,01$).

Considerando a análise da proliferação celular através do MTT no tempo 9, os grupos de leiomioma tratados com **estradiol**, **estradiol e progesterona**, e **estradiol, progesterona e mifepristona** tiveram maior proliferação do que os mesmos grupos de miométrio. Em relação ao grupo tratado com **estradiol e mifepristona**, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de tecido. No grupo **controle**, o miométrio apresentou maior proliferação que o leiomioma (Figura 19).

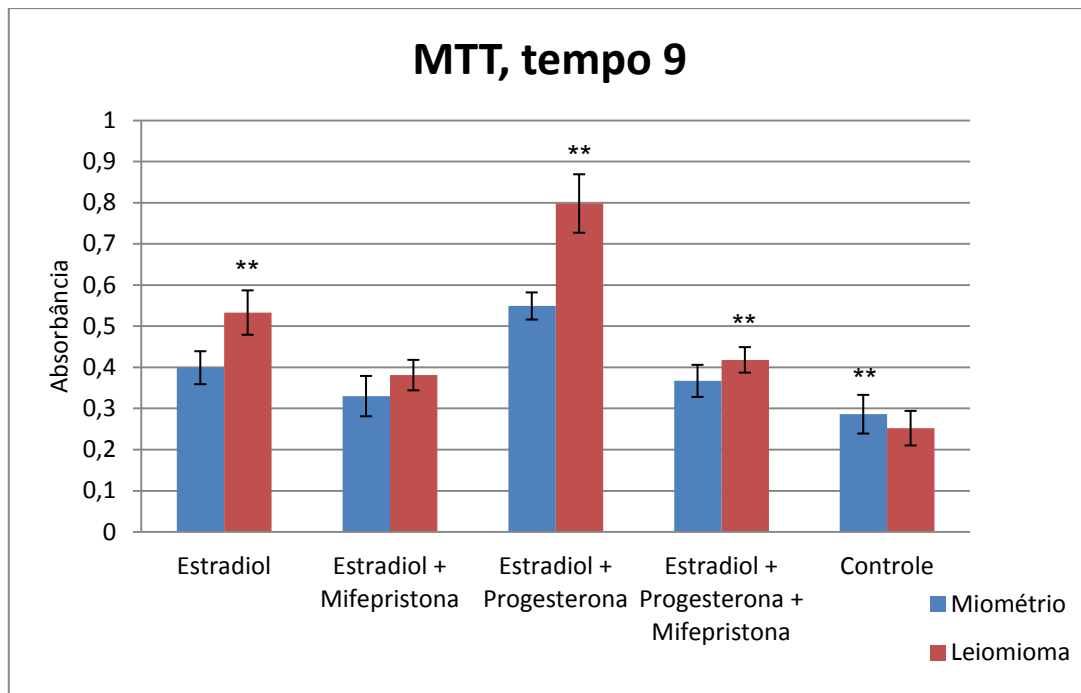


Figura 19. Análise da proliferação celular através de MTT em mioma e miométrio no tempo 9. Dados apresentados como média \pm erro padrão (** representa diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, $p < 0,01$).

Foi testado se havia correlação entre as variáveis contagem e MTT, em cada tempo, para os diferentes grupos de tratamento e tecidos.

Em relação ao miométrio no tempo 7, foram observadas correlações fortes e significativas em todos os grupos, com exceção do grupo tratado com **estradiol e progesterona** (Figura 20).

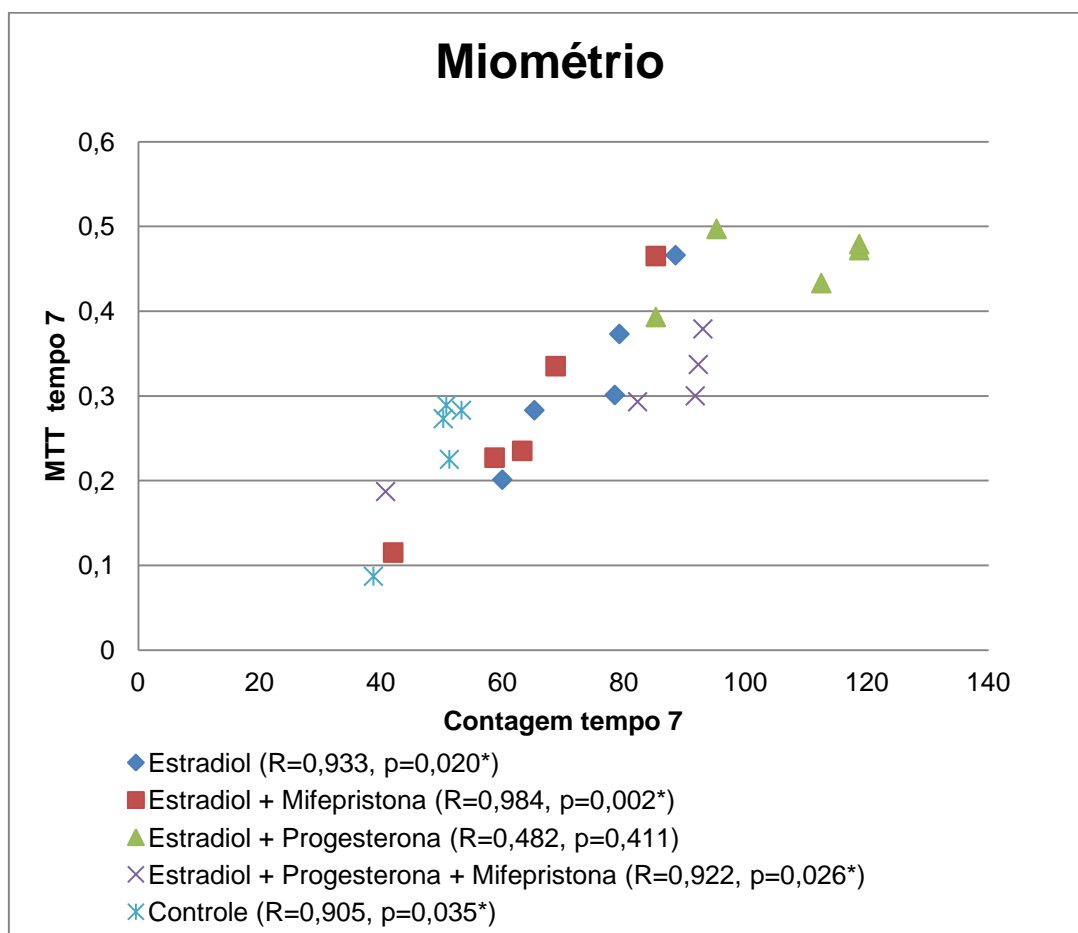


Figura 20. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 7 em miométrio.

Em relação ao leiomioma no tempo 7, foram observadas correlações fortes e significativas em todos os grupos (Figura 21).

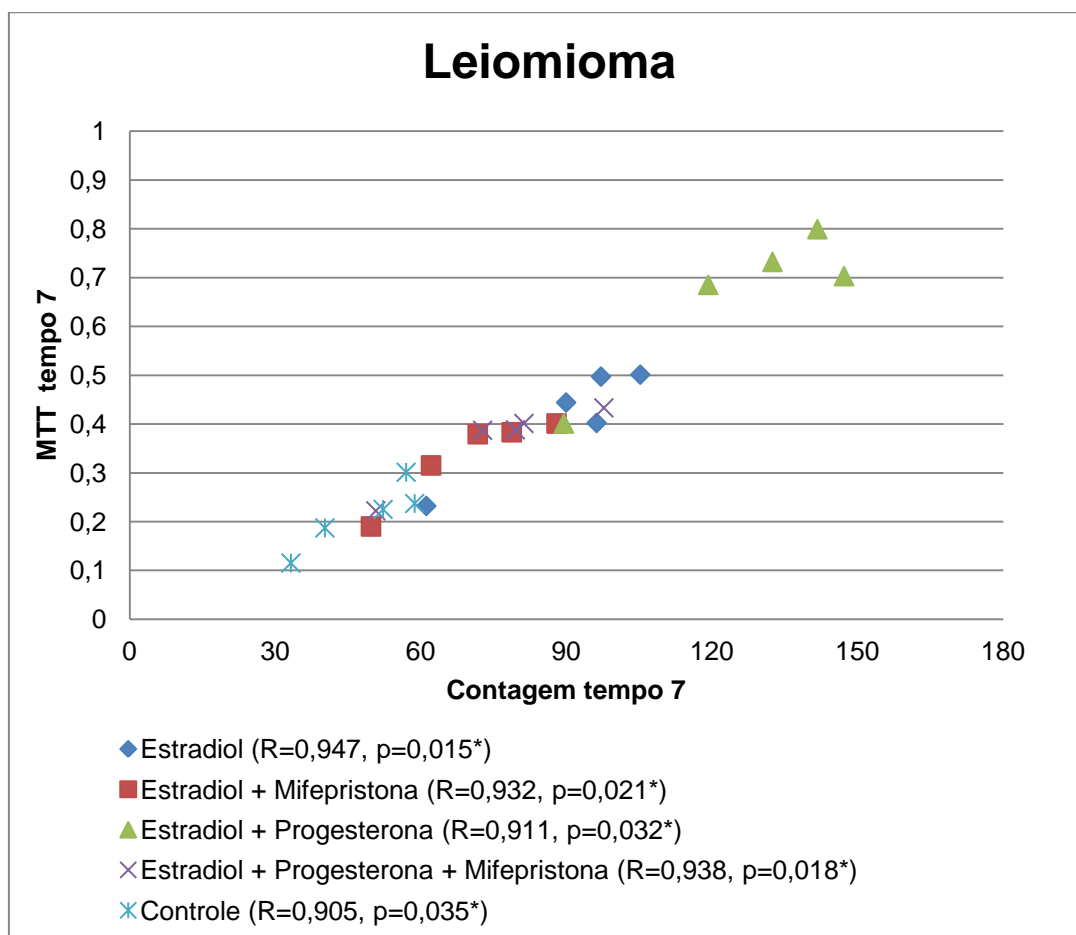


Figura 21. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 7 em leiomioma.

Em relação ao miométrio no tempo 9, foram observadas correlações fortes e significativas em todos os grupos, com exceção dos grupos tratados com **estradiol e mifepristona** e **controle** (Figura 22).

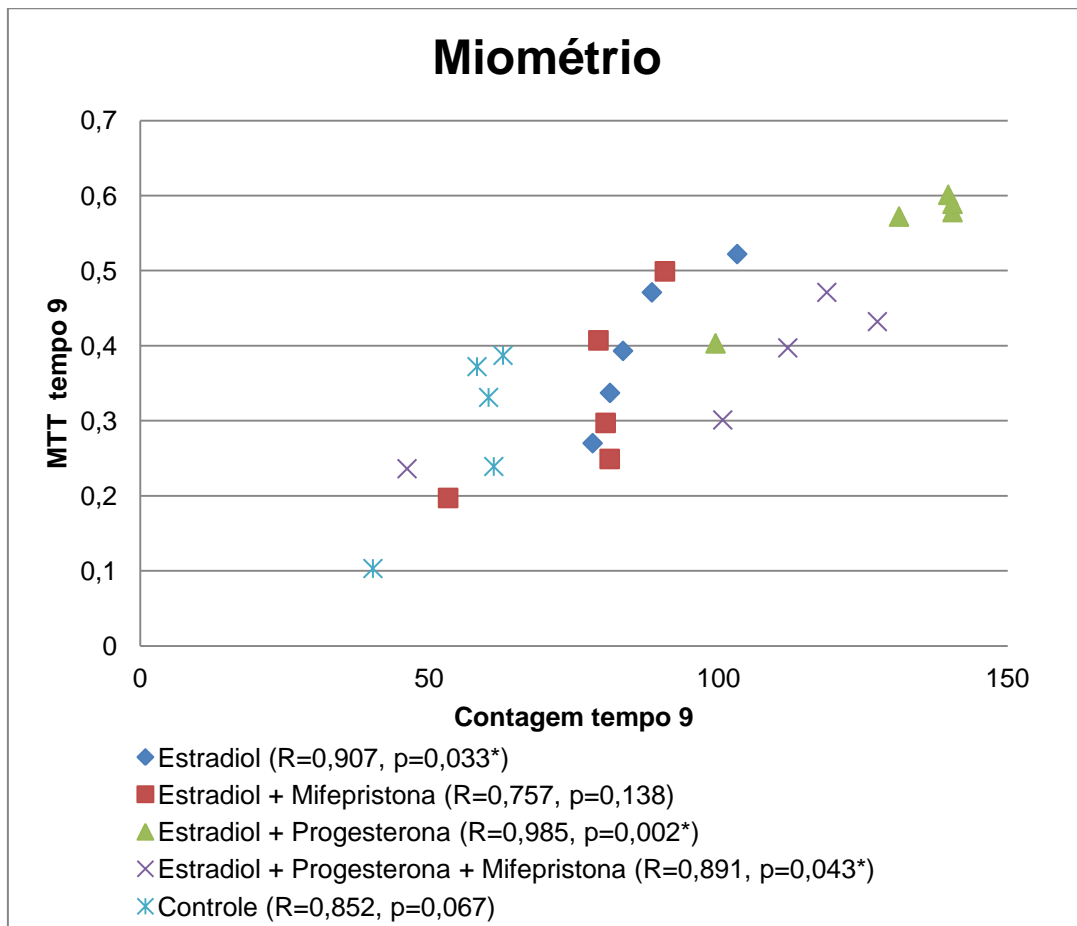


Figura 22. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 9 em miométrio.

Em relação ao leiomioma no tempo 7, foram observadas correlações fortes e significativas em todos os grupos (Figura 23).

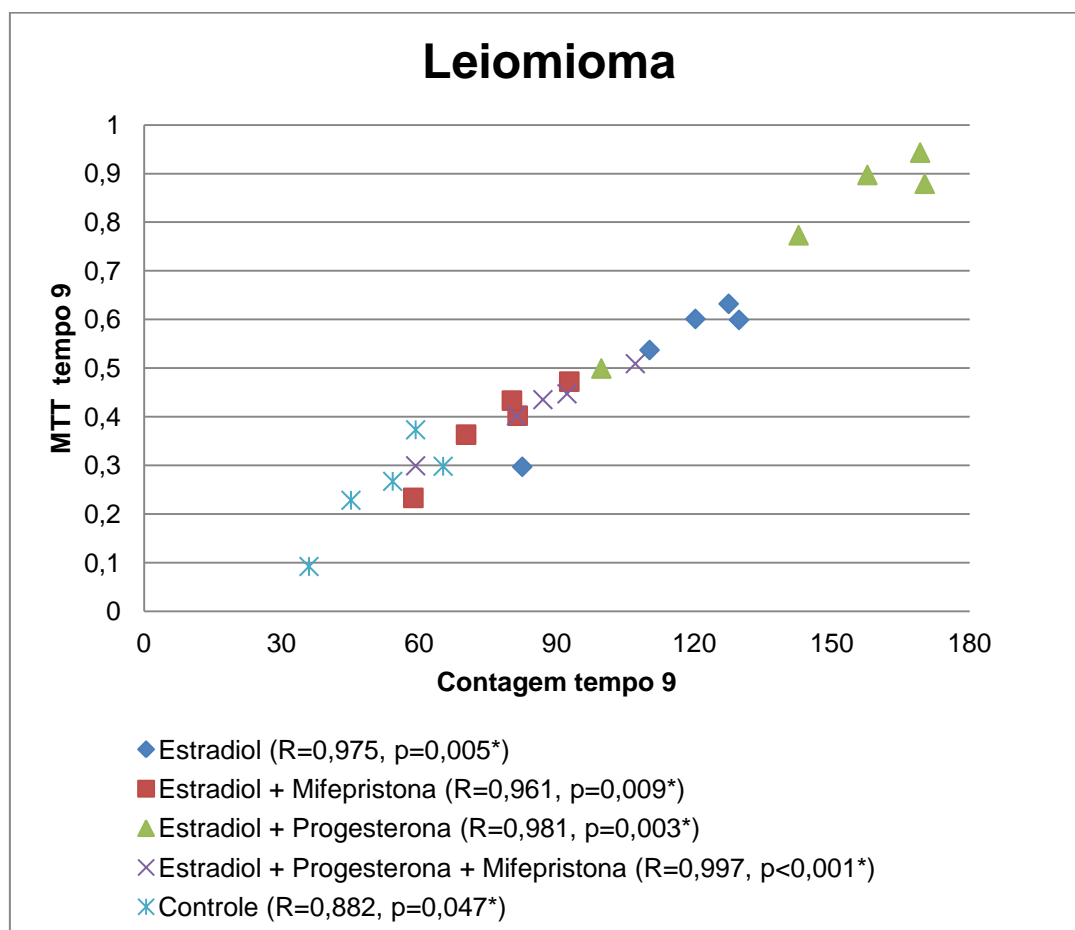


Figura 23. Correlação de Pearson da proliferação celular avaliada através de contagem de células e MTT no tempo 9 em leiomioma.

A análise da proliferação celular por contagem de células no tempo 7, após o período de tratamento dos grupos com mifepristona, mostrou que as células de leiomioma apresentaram um aumento de proliferação maior do que as células de miométrio quando expostas aos tratamentos com **estradiol** (36%), **estradiol e mifepristona** (17%) e **estradiol e progesterona** (47%) (Figura 24).

Para os grupos tratados com **estradiol** e **estradiol e progesterona**, observou-se que a ação anti-proliferativa da mifepristona foi proporcionalmente mais efetiva nas células de leiomioma (Figura 24).

Nos grupos tratados com **estradiol**, o tratamento com mifepristona nas células de miométrio inibiu em 23% a proliferação celular em relação ao grupo não tratado com mifepristona, e nas células de leiomioma a inibição foi de 42% em relação ao grupo não tratado com mifepristona.

Nos grupos tratados com **estradiol e progesterona**, o tratamento com mifepristona nas células de miométrio inibiu em 56% a proliferação celular em relação ao grupo não tratado com mifepristona, e nas células de leiomioma a inibição foi de 105% em relação ao grupo não tratado com mifepristona.

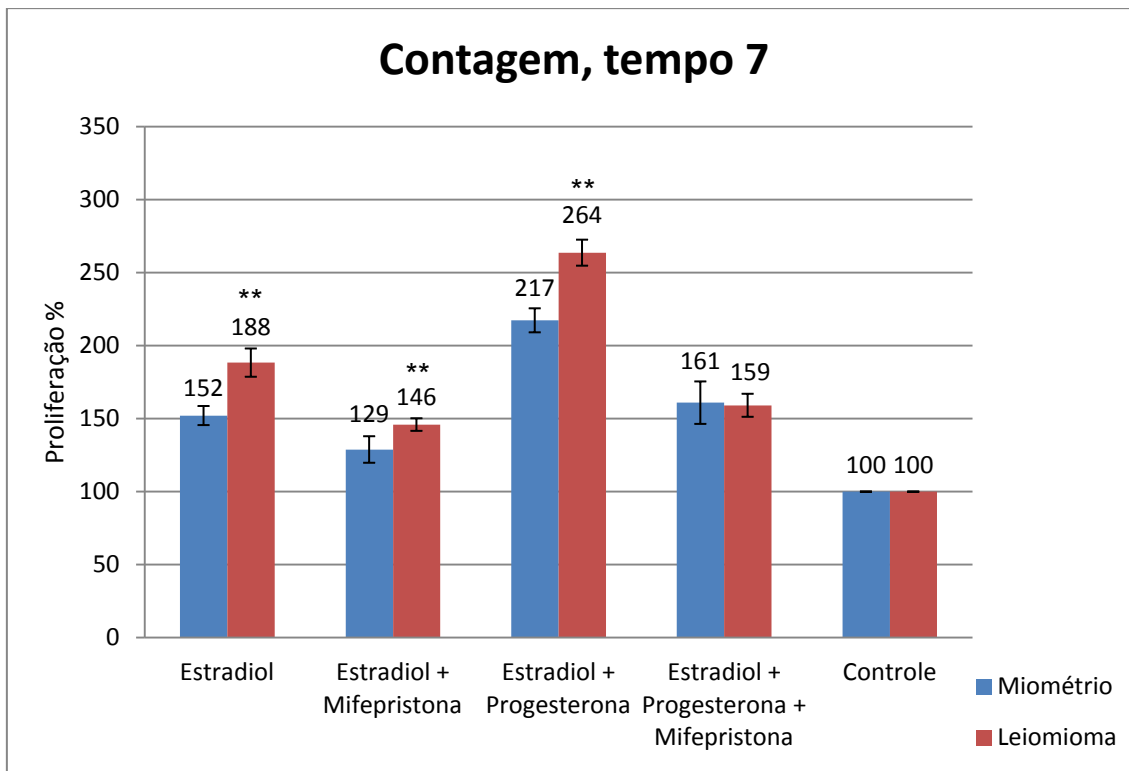


Figura 24. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 7. Dados apresentados como percentual em relação ao grupo controle (** representa diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, $p < 0,01$).

A análise da proliferação celular por contagem de células no tempo 9, período de recuperação dos grupos anteriormente tratados com mifepristona (48 horas sem tratamento), mostrou que as células de leiomioma apresentaram um aumento de proliferação maior do que as células de miométrio apenas quando expostas aos tratamentos com **estradiol e estradiol e progesterona**, ou seja, nos grupos que não receberam tratamento prévio com mifepristona (Figura 25).

Nos grupos tratados com **estradiol**, a inibição da proliferação celular das células de miométrio que receberam o tratamento com mifepristona foi de 21% em relação ao grupo não tratado com mifepristona, e a inibição da proliferação das células de leiomioma tratadas com mifepristona foi de 67% em relação ao grupo não tratado com mifepristona.

Nos grupos tratados com **estradiol e progesterona**, a inibição da proliferação celular das células de miométrio que receberam o tratamento com mifepristona foi de 58% em relação ao grupo não tratado com mifepristona, e a inibição da proliferação das células de leiomioma tratadas com mifepristona foi de 111% em relação ao grupo não tratado com mifepristona.

Para ambos os tratamentos hormonais, observou-se que a recuperação proporcional da proliferação celular após a interrupção do tratamento hormonal foi maior nas células de miométrio do que nas de leiomioma (Figura 25).

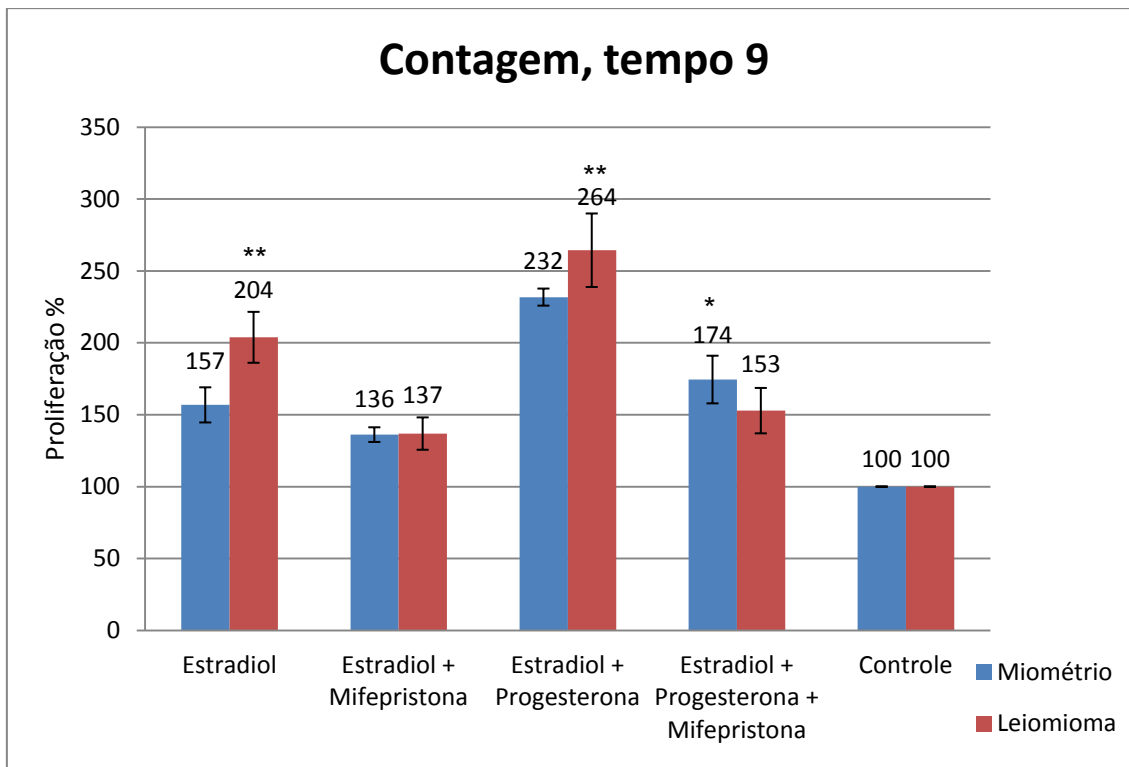


Figura 25. Análise da proliferação celular através de contagem de células em mioma e miométrio no tempo 9. Dados apresentados como percentual em relação ao grupo controle (* e ** representam diferença significativa entre miométrio e leiomioma, Teste de GEE, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A análise da proliferação celular por MTT nos tempos 7 e 9 mostrou um padrão semelhante aos resultados obtidos através da contagem de células. Os dados estão representados na tabela 6.

4. Análise da expressão gênica dos receptores de progesterona

Os resultados da expressão de RNAm dos receptores de progesterona foram obtidos por reação de PCR em tempo real a partir de transcrição reversa. Os genes em estudo e o gene constitutivo da β 2-microglobulina foram quantificados em ng e os resultados expressos como mediana e valor máximo e mínimo, em unidades arbitrárias como a relação PRAB/ β 2-microglobulina, PRB/ β 2-microglobulina e relação PRAB:PRB. O termo PRAB se refere à análise do RNAm de ambos receptores, PRA e PRB, através do fragmento comum das isoformas, devido à impossibilidade de se analisar os níveis de RNAm do PRA isoladamente. Os resultados são apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Análise da expressão gênica de receptores de progesterona em miométrio através de PCR em tempo real. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo (n=3).

Miométrio			
	<i>PRAB:BMG</i>	<i>PRB:BMG</i>	<i>PRA:PRB</i>
Estradiol	1,3224 (0,28-5,52)	2,7708 (1,11-21,99)	0,2517 (0,25-0,48)
Estradiol + Mifepristona	0,6603 (0,52-1,37)	2,8722 (0,97-838,11)	0,4768 (0,00-0,54)
Estradiol + Progesterona	1,1877 (0,11-21,12)	1,4701 (1,23-52,03)	0,4060 (0,08-0,97)
Estradiol + Progesterona + Mifepristona	1,0836 (0,78-1,39)	2,7162 (1,79-3,65)	0,4087 (0,38-0,44)
Controle	0,9178 (0,36-2,02)	0,9551 (0,19-1,77)	1,14 (0,96-1,92)

Tabela 8. Análise da expressão gênica de receptores de progesterona em leiomioma através de PCR em tempo real. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo (n=3).

Leiomioma			
	<i>PRAB:BMG</i>	<i>PRB:BMG</i>	<i>PRA:PRB</i>
Estradiol	0,4786 (0,35-1,21)	0,3369 (0,03-1,92)	3,5776 (0,25-11,69)
Estradiol + Mifepristona	0,6299 (0,29-93,10)	1,7453 (1,46-493,61)	0,1959 (0,19-0,36)
Estradiol + Progesterona	0,6845 (0,68-080)	0,64 (0,08-0,75)	1,0659 (1,06-8,57)
Estradiol + Progesterona + Mifepristona	0,5171 (0,22-13,34)	2,3681 (0,24-121,43)	0,1098 (0,09-2,17)
Controle	1,4186 (0,31-4,79)	27,0331 (0,38-29,85)	0,1771 (0,05-0,92)

A figura 26 representa a expressão do RNAm do PRAB em miométrio. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

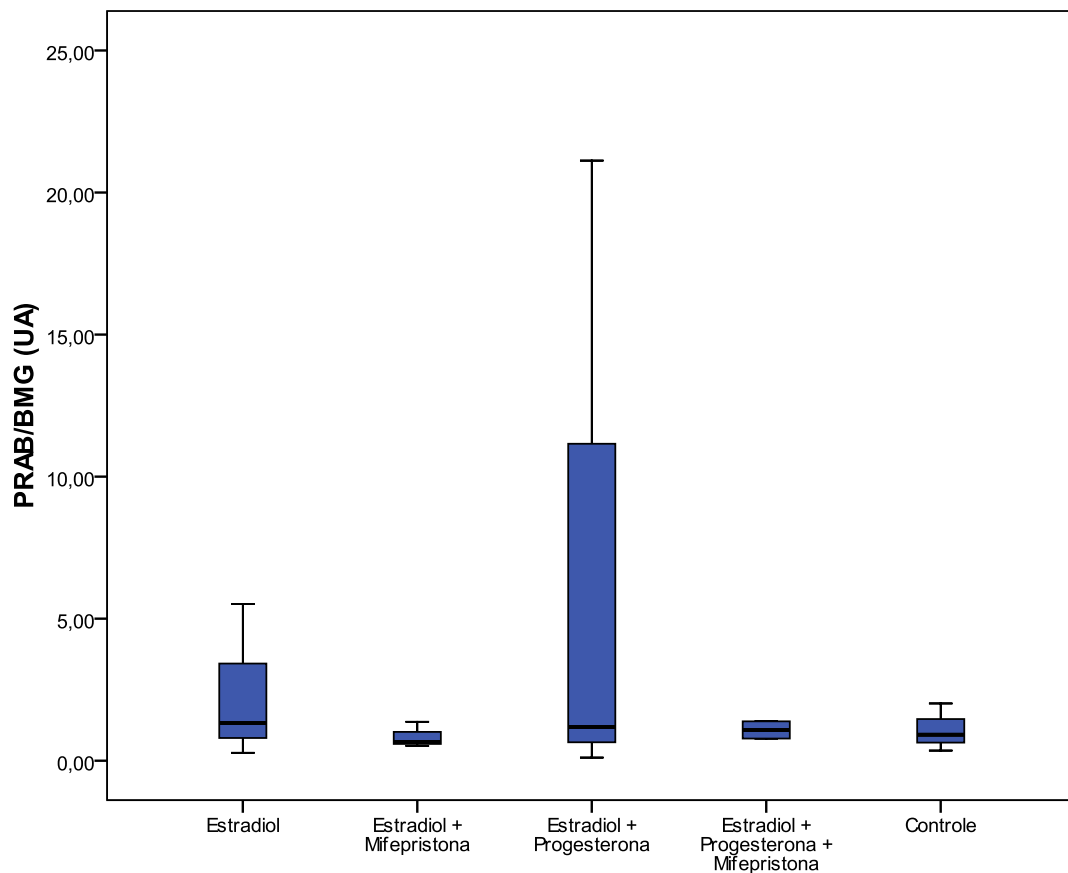


Figura 26. Expressão gênica de PRAB em miométrio. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

A figura 27 representa a expressão do RNAm do PRB em miométrio. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

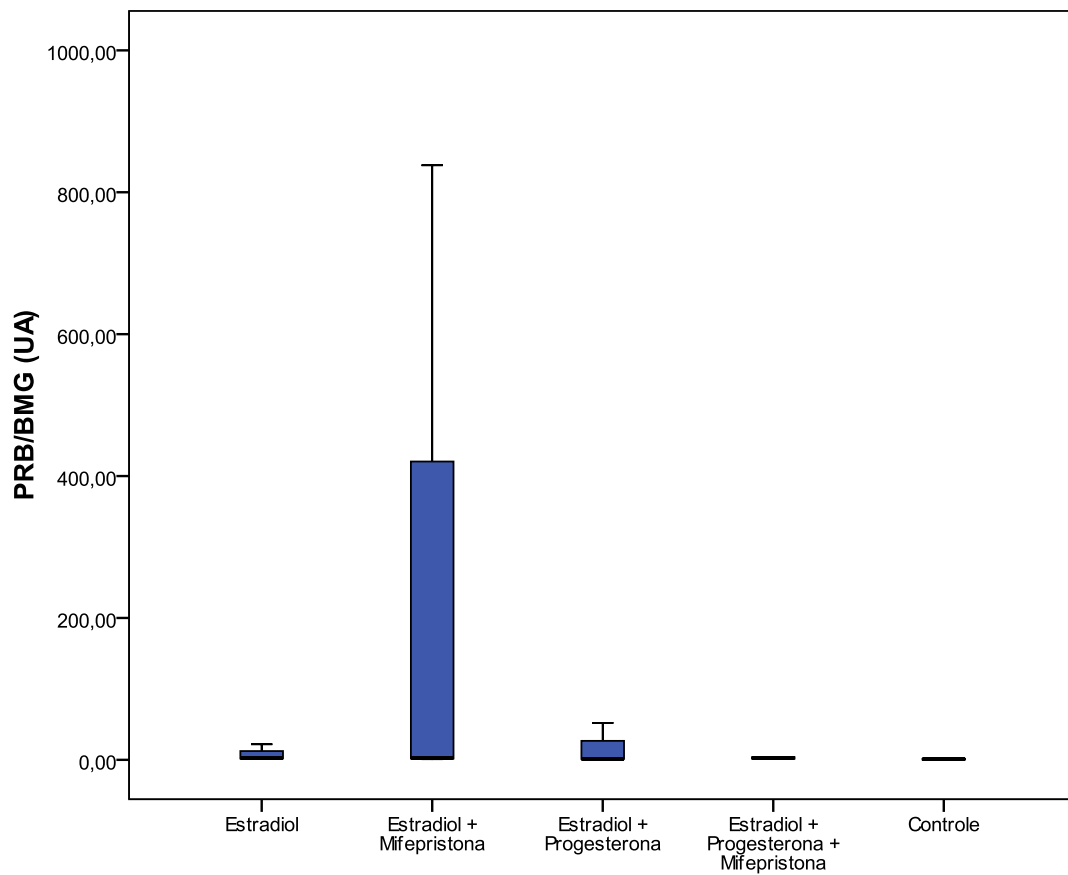


Figura 27. Expressão gênica de PRB em miométrio. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

A figura 28 representa a relação entre a expressão do RNAm do PRAB e do PRB em miométrio. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

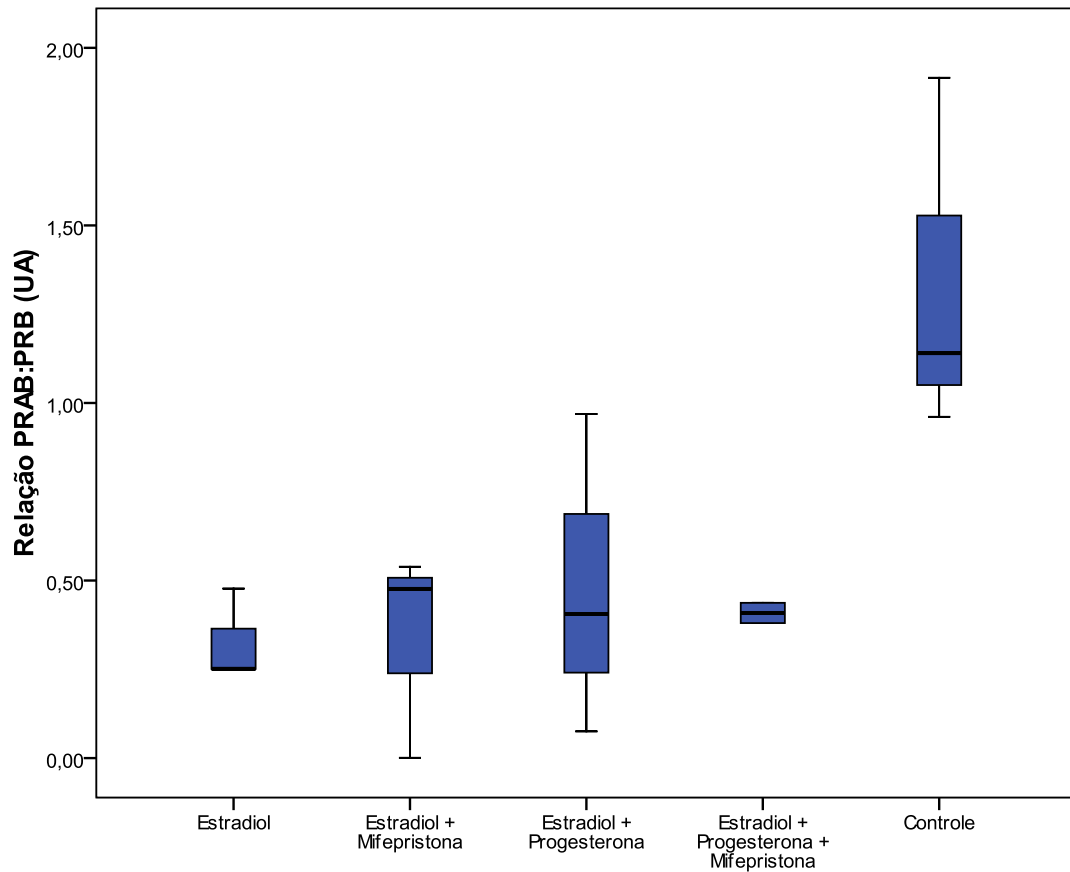


Figura 28. Relação entre a expressão gênica de PRAB e PRB em miométrio. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

A figura 29 representa a expressão do RNAm do PRAB no em leiomioma. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

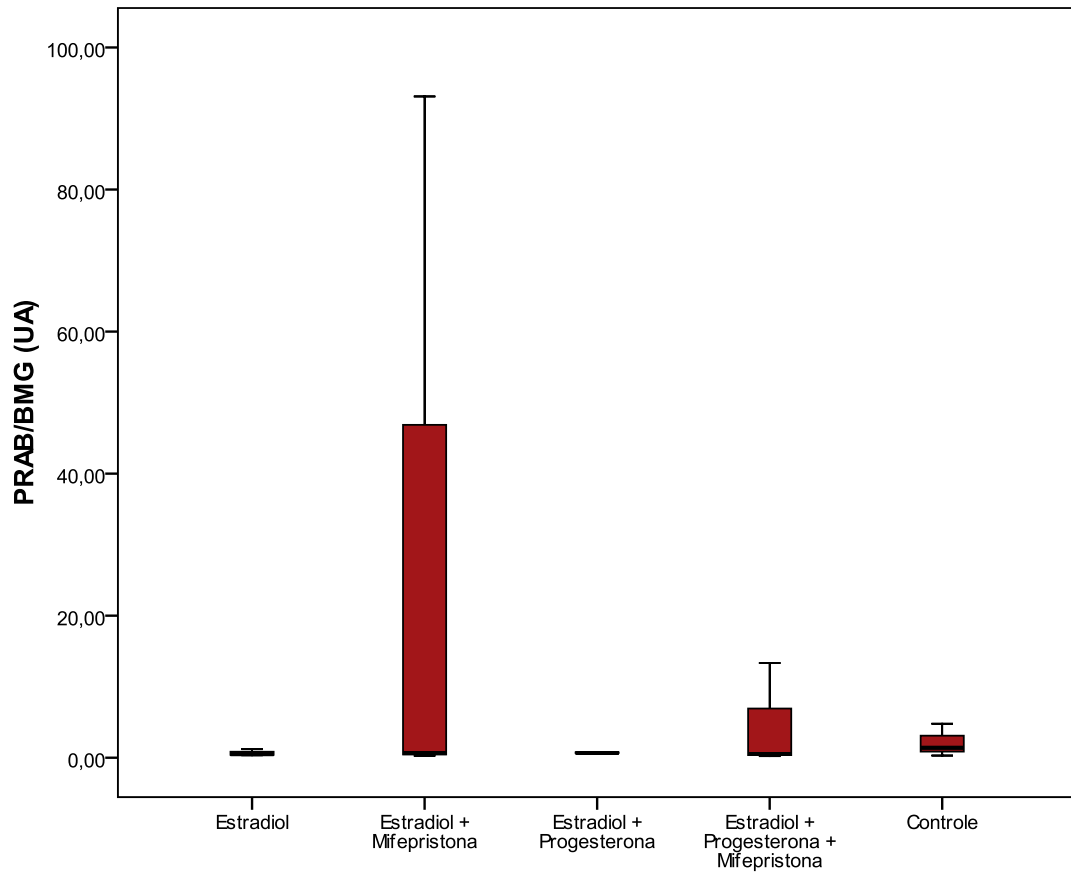


Figura 29. Expressão gênica de PRAB em leiomioma. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

A figura 30 representa a expressão do RNAm do PRB em leiomioma. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

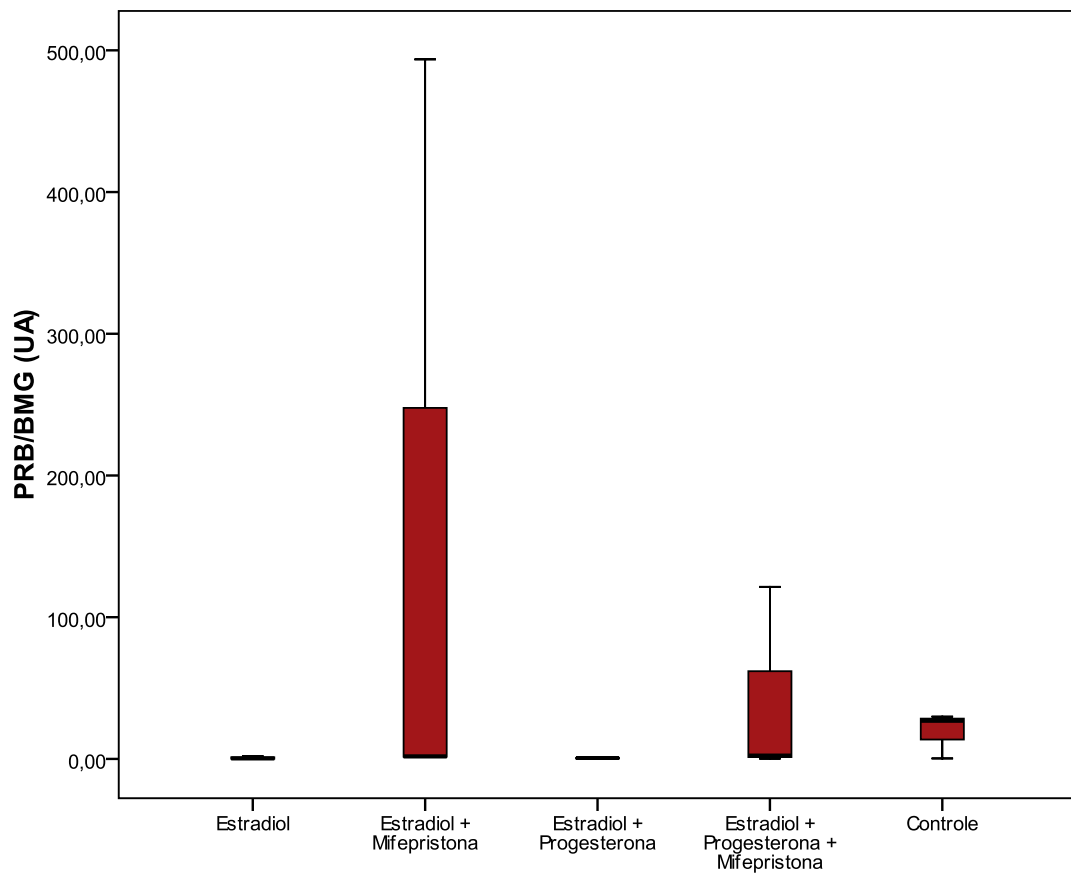


Figura 30. Expressão gênica de PRB em leiomioma. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

A figura 31 representa a relação entre a expressão do RNAm do PRAB e do PRB em leiomioma. Os dados são apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

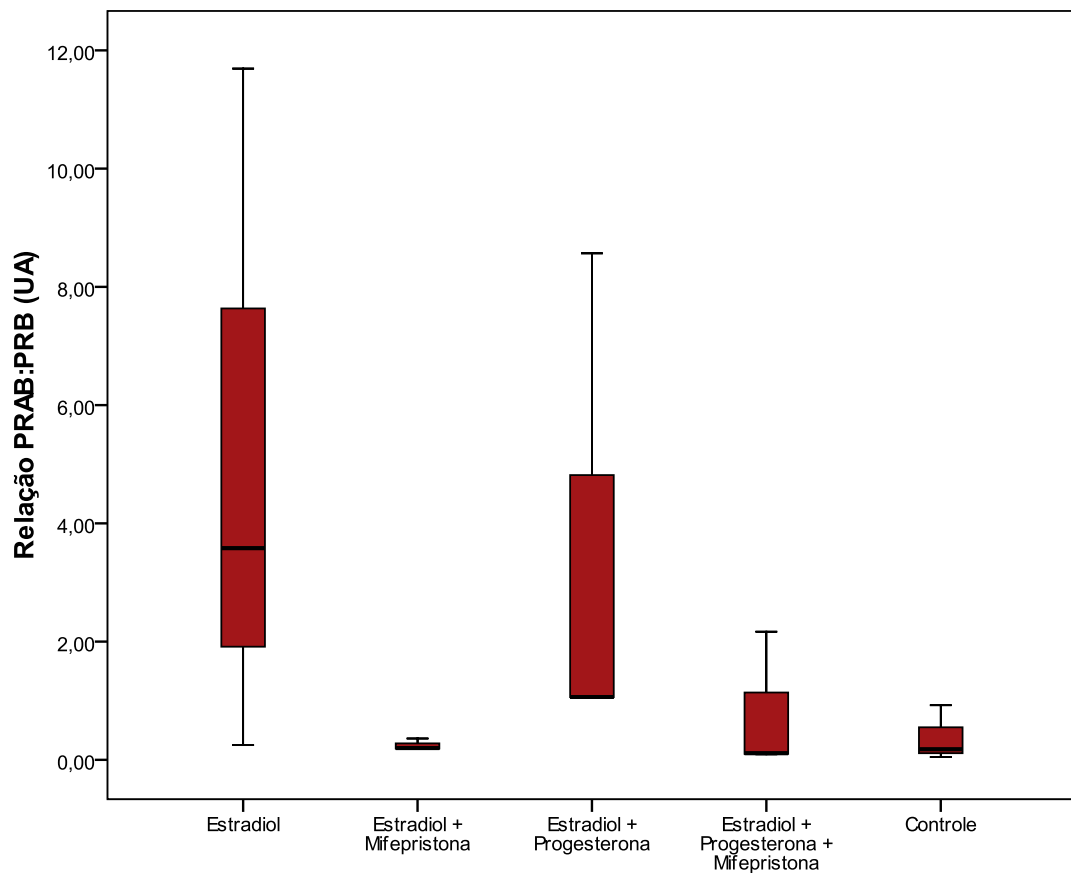


Figura 31. Relação entre a expressão gênica de PRAB e PRB em leiomioma. Dados apresentados como mediana e valor máximo e mínimo.

DISCUSSÃO

Leiomiomas uterinos continuam sendo os tumores ginecológicos mais frequentes e a principal indicação para histerectomia, sendo esta, até o momento, o único tratamento definitivo. Apesar da etiologia dos leiomiomas ainda não ter sido bem esclarecida, estudos têm evidenciado a dependência hormonal do crescimento destes tumores (Ishikawa et al., 2010; Rein, 2000a; Walker & Stewart, 2005).

Culturas primárias de leiomioma e miométrio normal adjacente podem constituir um bom modelo para o estudo da proliferação celular, por fornecerem dados representativos da variabilidade tumoral individual e da resposta a diferentes tratamentos hormonais e anti-hormonais. No presente estudo, foi estabelecido um modelo de cultura primária de células de leiomioma e miométrio humanos. A visualização no microscópio óptico permitiu identificar características típicas de células musculares lisas, conforme já descrito por outros autores (Kawaguchi et al., 1985; Konishi et al., 1983) (Figuras 8-10).

Através da técnica de imunocitoquímica de fluorescência utilizando-se o anticorpo primário anti α -actina, proteína que compõe o citoesqueleto de células musculares lisas, foi possível confirmar que as células em cultivo eram provenientes de miométrio e de leiomioma (Figura 11). A α -actina tem sido utilizada como marcador de músculo liso em diversos estudos em culturas de células de leiomioma e miométrio (Ishikawa et al., 2010; Shushan et al., 2007; Shushan et al., 2004; Shveiky et al., 2009).

A avaliação da proliferação celular mostrou que as células de todos os grupos mantiveram a proliferação e a viabilidade até o fim dos experimentos, no tempo 9 (Figuras 12-15). Os dois métodos utilizados, contagem em hemocitômetro e MTT, avaliam de maneiras diferentes a proliferação celular. A contagem em hemocitômetro é um método direto e manual, no qual as células são avaliadas visualmente após tripsinização, sendo o método padrão de avaliação de muitos tipos celulares (Knoll & Rowell, 1996). A técnica do MTT, por sua vez, é um método indireto baseado no metabolismo celular e que avalia a atividade mitocondrial das células, de forma que o produto da reação de redução (azul de Formazan) é proporcional à respiração celular e, indiretamente, ao número de células viáveis em cultura. A limitação desta técnica em avaliar o número de células é que em situações de alteração metabólica celular podem haver variações na atividade mitocondrial, e conseqüentemente na formação do azul de Formazan, sem que haja modificação na quantidade de células viáveis. Portanto, este método deve ser utilizado com cautela, especialmente quando for o único método aplicado para avaliar a proliferação celular (Cory et al., 1991).

No presente estudo, foram observadas correlações fortes e positivas entre as análises através das técnicas de contagem e MTT, para a maioria dos grupos (Figuras 20-23), o que indica que o ensaio de MTT também pode ser um bom método para avaliar a proliferação celular neste modelo de cultura de células.

A importância dos esteroides ovarianos no desenvolvimento dos leiomiomas está bem estabelecida, no entanto, as contribuições relativas e funções dos estrógenos e da progesterona na patogênese dos leiomiomas ainda é controversa. Estudos em tecido e *in vivo* oferecem limitações quanto à possibilidade de se avaliar os efeitos de cada hormônio isoladamente, sendo que a principal controvérsia diz respeito aos efeitos mitogênicos dos estrógenos. Alguns autores observaram que o tratamento com 17 β -estradiol isoladamente não exerce efeitos mitogênicos em leiomioma humano *in vitro* (Ishikawa et al., 2010; Severino et al., 1996). No presente estudo, foi observado aumento na proliferação celular nos grupos tratados somente com estradiol, para ambos os tipos de tecido, em relação ao grupo controle. O tratamento com progesterona associada ao estradiol aumentou significativamente a resposta proliferativa nas células provenientes de ambos tecidos, em relação ao tratamento apenas com estradiol e ao controle (tabelas 5 e 6).

Para elucidar as funções dos esteroides ovarianos sobre os leiomiomas uterinos, Ishikawa e colaboradores (2010) estabeleceram um modelo xenográfico a partir de culturas de miométrio e leiomioma humanos implantados na cápsula renal de camundongos imunodeprimidos. Após o implante, os leiomiomas aumentaram de tamanho em resposta ao tratamento com estradiol e progesterona, pelo aumento da proliferação celular e aumento

de volume de componentes extracelulares. O crescimento induzido pelos hormônios foi inibido pelo tratamento com mifepristona, de forma que o volume dos tumores foi igual entre os grupos: tratado com estradiol, progesterona e mifepristona, tratado somente com estradiol ou somente com progesterona e controle. Tal observação levou à conclusão de que os dois hormônios, estradiol e progesterona, são essenciais para o crescimento dos leiomiomas. No grupo tratado somente com estradiol não foi verificado aumento no tamanho do tumor, mesmo com a administração de uma dose hormonal suprafisiológica. Além disso, o volume dos tumores diminuiu significativamente quando foi interrompido o tratamento com estradiol e/ou progesterona (Ishikawa et al., 2010). Foi identificada expressão de ER α em todos os tumores analisados. Em contraste, a expressão de PRs só foi detectada nos grupos tratados com estradiol, e não nos grupos controle e tratado somente com progesterona, o que confirma que o tratamento com estradiol é essencial para a ação da progesterona, modulando a expressão dos PRs. No entanto, neste estudo, foi observado que o estradiol por si só não é um mitógeno para células de leiomioma *in vitro*; sua importância no crescimento destes tumores seria somente regular a expressão dos PRs (Ishikawa et al., 2010). Outros estudos prévios demonstraram que células de leiomiomas sofrem alterações de expressão gênica *in vitro* e podem perder a expressão de ER α e PRs rapidamente (Severino et al., 1996).

De forma semelhante ao presente estudo, outros estudos utilizando culturas de células e modelos animais foram capazes de demonstrar efeitos mitogênicos dos estrógenos em células de leiomiomas (Andersen et al., 1995; Barbarisi et al., 2001; Park et al., 2008; Porter et al., 1995). Alguns

autores identificaram concentrações significativamente mais elevadas de estrógenos (Otubu et al., 1982) e também maior concentração de receptores de estrógenos em tecido de leiomioma em relação ao miométrio normal (Rein et al., 1990). Além disso, alguns autores já identificaram expressão elevada em leiomiomas de genes regulados por estrógenos, todos relacionados com aumento da proliferação celular, como IGF-I e IGF-IR, conexina 43, EGF e PDGF, além dos PRs (Andersen et al., 1995; Kovacs et al., 2001). Um mecanismo proposto para a ação mitogênica dos estrógenos em leiomiomas é através da ativação da via das MAP-kinases, com consequente fosforilação de proteínas intracelulares como a GAP (growth associated protein), PI-3-K (fosfatidilinositol 3-kinase) e PLC (fosfolipase C) (Barbarisi et al., 2001).

Muitas evidências *in vivo* e *in vitro* sugerem um papel crítico da progesterona no desenvolvimento de leiomiomas, como o aumento da proliferação dos tumores na fase secretória do ciclo (Kawaguchi et al., 1989) e após a administração de acetato de medroxiprogesterona, um progestágeno sintético (Tiltman, 1985). De fato, há um consenso entre a maioria dos autores de que a progesterona é o principal estímulo hormonal para a proliferação de leiomiomas, apesar de os mecanismos moleculares ainda não serem bem esclarecidos. Foi sugerido que a progesterona induziria um aumento na expressão da proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) (Maruo et al., 2004) e uma diminuição na expressão da proteína TNF- α (pró-apoptótica) (Kurachi et al., 2001).

Nos grupos tratados com **estradiol e estradiol e progesterona** observou-se que as células de leiomioma proliferaram significativamente mais do que as de miométrio (Figuras 16-19). No modelo estabelecido por Ishikawa

e colaboradores (2010) as culturas de miométrio não mostraram crescimento em resposta aos tratamentos hormonais, indicando a existência de um mecanismo antiproliferativo intrínseco no miométrio normal (Ishikawa et al., 2010). Shimomura e colaboradores (1998) demonstraram que a marcação do PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) é significativamente maior em leiomiomas em relação ao miométrio adjacente (Shimomura et al., 1998). O que alguns autores sugerem é que a tumorigênese dos leiomiomas envolve mutações somáticas no miométrio normal, que levam a um fenótipo alterado, mais responsivo a estímulos hormonais e fatores de crescimento, e conseqüentemente, maior atividade mitótica, estimulada principalmente pela progesterona (Rein et al., 1995; Sozen & Arici, 2002).

Evidências do envolvimento da progesterona na patogênese de leiomiomas trazem a possibilidade de novos alvos terapêuticos, de forma que o tratamento anti-hormonal pode ser uma alternativa não-cirúrgica, conservadora e de menor custo. Alguns estudos e já foram realizados para avaliar a efetividade deste tipo de tratamento (Schlaff et al., 1989; Shozu et al., 2001). Ensaios clínicos têm demonstrado que o antagonista dos receptores de progesterona RU486, ou mifepristona, é efetivo no tratamento de leiomiomas, causando diminuição dos sintomas e redução no tamanho dos tumores (Bagaria et al., 2009; Fiscella et al., 2006; Murphy et al., 1993a).

No presente estudo, a proliferação celular de leiomiomas e miométrio normal adjacente foi avaliada em dois momentos: após um período de tratamento com mifepristona (tempo 7) e após um período de recuperação do tratamento (tempo 9).

No tempo 7, observou-se que a mifepristona teve efeito antiproliferativo nos dois tecidos quando combinada ao estradiol. O efeito foi proporcionalmente maior nas células de leiomioma (42%) do que nas células de miométrio (23%), em relação ao mesmo tecido tratado apenas com estradiol. Quando combinada ao tratamento com estradiol e progesterona, a mifepristona também teve efeito anti-proliferativo proporcionalmente maior nas células de leiomioma (105%) do que nas células de miométrio (56%), em relação ao mesmo tecido tratado apenas com estradiol e progesterona (Figura 24).

Bagaria e colaboradores (2009) (Bagaria et al., 2009) realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo em 40 pacientes com leiomiomas sintomáticos, no qual as pacientes receberam 10 mg de mifepristona diariamente durante três meses. No grupo tratado, mas não no grupo placebo, foi observada uma redução no volume uterino e no volume dos leiomiomas de cerca de 30%.

Em um ensaio clínico utilizando análogos do GnRH foi demonstrado que o efeito deste tratamento é maior na redução do volume do miométrio normal (42,7%) do que no volume dos leiomiomas (30,4%) (Schlaff et al., 1989). Os resultados do presente estudo indicam que o efeito anti-proliferativo da mifepristona pode ser mais pronunciado em leiomiomas do que em miométrio. Bagaria e colaboradores verificaram que o tratamento com mifepristona foi mais efetivo em reduzir o volume dos leiomiomas (32%) do que o volume do miométrio normal (26%), sugerindo que o tratamento com mifepristona reduz o volume uterino total predominantemente através da redução do volume dos tumores (Bagaria et al., 2009). Em outros estudos,

utilizando doses variáveis entre 5-25 mg por períodos entre 3 e 12 meses, também foi observada redução no volume uterino total de até 53% (Eisinger et al., 2005; Eisinger et al., 2003; Fiscella et al., 2006; Reinsch et al., 1994; Yang et al., 1996)

Existem poucos estudos sobre os efeitos da mifepristona *in vitro*. Li e colaboradores (2004) verificaram que a mifepristona inibiu de forma dose-dependente a adesão e a migração de células da linhagem MKN-45 de adenocarcinoma gástrico. A dose máxima testada foi de 20 $\mu\text{mol/L}$ e o período de tratamento foi de 96 horas, protocolo semelhante ao do presente estudo. Os autores sugerem que a mifepristona é capaz de inibir a adesão e a migração de células tumorais e também a angiogênese, tendo potencial terapêutico para vários tipos de tumores (Li et al., 2004). Steinauer e colaboradores sustentam que existem evidências de que a mifepristona diminui diretamente o número de receptores de progesterona em leiomiomas e miométrio normal, e contribui para manter a concentração hormonal similar à fase folicular inicial, inibindo o crescimento dos leiomiomas induzido pelos esteroides. A mifepristona também pode exercer um efeito vascular direto de alterar o fluxo sanguíneo para os leiomiomas (Steinauer et al., 2004).

No tempo 9, observou-se que a recuperação proporcional da proliferação celular após a interrupção do tratamento hormonal foi maior nas células de miométrio do que nas de leiomioma, tanto nos grupos tratados com estradiol quanto nos grupos tratados com estradiol e progesterona (Figura 25). No entanto, neste protocolo de tratamento, a mifepristona não foi capaz de inibir completamente a proliferação celular, visto que os grupos tratados mostraram aumento de proliferação do tempo 7 até o tempo 9 (tabelas 5 e 6).

Os ensaios clínicos publicados até o momento não esclarecem os efeitos da mifepristona sobre o volume dos leiomiomas e do miométrio normal após cessado o tratamento, visto que não há seguimento a longo prazo. Nossos resultados sugerem que as células de leiomiomas podem ser mais sensíveis ao tratamento com mifepristona *in vitro*, visto que a capacidade de recuperação da proliferação das mesmas foi menor do que das células de miométrio normal. Uma questão a ser elucidada é se este efeito se observa *in vivo*.

No presente estudo, foi avaliada a expressão do RNAm dos receptores de progesterona A e B em culturas de miométrio e leiomioma, após o período de tratamento dos grupos com os diferentes tratamentos hormonais em associação ou não com a mifepristona (tempo 7).

Em duas culturas, não foi possível obter RNAm de boa qualidade para a reação de RT-PCR, de forma que o tamanho amostral reduzido (n=3) prejudicou o poder da análise estatística para comparação da expressão entre os tecidos e os grupos.

No entanto, foi identificada a expressão das duas isoformas dos receptores de progesterona nas culturas de miométrio e leiomioma, em todos os grupos de tratamento. De fato, a resposta proliferativa observada nos grupos tratados com progesterona indica que os tecidos expressam os receptores específicos para este hormônio. O fato de todos os grupos expressarem os PRs justifica-se pelo período de tratamento prévio com estradiol, antes da semeadura em placas para a definição dos grupos experimentais. Conforme já foi descrito por diversos autores, a expressão do

gene dos receptores de progesterona é induzida por estrógenos (Hodges et al., 2002; Sadovsky et al., 1993).

Diversos autores têm analisado a expressão dos PRs em miométrio e leiomioma, e os resultados observados ainda permanecem controversos. Brandon e colaboradores demonstraram aumento do conteúdo de RNAm de PRs em leiomiomas em relação ao miométrio normal, associado a um aumento no antígeno de proliferação Ki-67, sugerindo associação da via de sinalização da progesterona com o aumento da proliferação celular (Brandon et al., 1993b). Fujimoto e colaboradores identificaram maior expressão de RNAm de PRB em leiomiomas, sugerindo um fenótipo ativado para a proliferação celular (Fujimoto et al., 1998). Viville e colaboradores não encontraram diferença de expressão das duas isoformas em tecido de leiomioma e miométrio (Viville et al., 1997a). Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a expressão gênica dos PRs não foi diferente entre amostras de tecido de leiomioma e miométrio (Lora et al., 2012).

Todavia, a expressão de RNAm de PRs em tecido pode diferir significativamente de modelos *in vitro*. Severino e colaboradores analisaram a expressão gênica e proteica de receptores de progesterona em culturas de miométrio e leiomioma tratadas com estradiol e progesterona, e verificaram que 24 horas após a semeadura das células houve perda da expressão de PRs e ERs. Os autores sugerem que estes resultados podem ser causados pela heterogeneidade genética encontrada em leiomiomas (Severino et al., 1996). No presente estudo, observamos que mesmo após 15 dias em cultura (dia da extração de RNA), as células de miométrio e leiomioma expressaram RNAm de PRs.

Jiang e colaboradores (2002) avaliaram a expressão de ERs e PRs em culturas de endométrio tratadas com mifepristona, e verificaram que houve uma diminuição da expressão de ambos os tipos de receptores em relação ao grupo não tratado. Este estudo avaliou somente a expressão proteica dos receptores, mas os resultados possivelmente refletem a expressão gênica. Os autores sugerem que este seja um dos mecanismos de ação da mifepristona, inibindo a ação dos hormônios através da contrarregulação dos receptores de estrógenos e progesterona (Jiang et al., 2002).

O presente estudo tem como perspectivas a análise da expressão gênica e proteica dos receptores de progesterona em um tamanho amostral suficiente para que sejam detectadas possíveis diferenças de expressão entre os grupos de tratamento, com o objetivo de verificar um possível mecanismo de ação da mifepristona em miométrio e leiomiomas.

CONCLUSÕES

Este trabalho estabeleceu um novo modelo experimental para o estudo da fisiologia de células de leiomioma e miométrio, a partir de culturas de células primárias dos tumores e do tecido normal adjacente. O modelo experimental é adequado para o estudo da proliferação celular sob diferentes tratamentos hormonais.

O ensaio de MTT pode ser um bom método para avaliar a proliferação celular neste modelo de cultura de células.

Foi demonstrado que o 17β -estradiol isoladamente exerce efeito proliferativo em células de leiomioma e miométrio *in vitro*, e que a associação da progesterona ao 17β -estradiol potencializa o efeito proliferativo.

O tratamento com mifepristona exerceu efeito anti-proliferativo em células de leiomioma e miométrio, de forma mais pronunciada nos grupos em

que a progesterona estava associada ao estradiol em relação ao tratamento somente com estradiol.

Células de leiomioma *in vitro* proliferam menos quando tratadas com mifepristona do que células de miométrio.

Células de miométrio e leiomioma expressam receptores de progesterona *in vitro* sob os diferentes tratamentos hormonais avaliados. É necessário ampliar o tamanho amostral para que possam ser avaliados quantitativamente os efeitos dos tratamentos hormonais e da mifepristona sobre a expressão gênica e proteica dos receptores de progesterona.

REFERÊNCIAS

- Agranonik, M. (2009) Equações de estimação generalizadas (GEE) : aplicação em estudo sobre mortalidade neonatal em gemelares de Porto Alegre, RS (1995-2007), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Andersen, J., and Barbieri, R. L. (1995). Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Investig* 2, 663-672.
- Andersen, J., DyReyes, V. M., Barbieri, R. L., Coachman, D. M., and Miksicek, R. J. (1995). Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures. *J Soc Gynecol Investig* 2, 542-551.
- Bagaria, M., Suneja, A., Vaid, N. B., Guleria, K., and Mishra, K. (2009). Low-dose mifepristone in treatment of uterine leiomyoma: a randomised

double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 49, 77-83.

Barbarisi, A., Petillo, O., Di Lieto, A., Melone, M. A., Margarucci, S., Cannas, M., and 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, 414-424.

Barengolts, E. I., Lathon, P. V., and Lindh, F. G. (1995). Progesterone Antagonist Ru-486 Has Bone-Sparing Effects in Ovariectomized Rats. *Bone* 17, 21-25.

Benassayag, C., Leroy, M. J., Rigourd, V., Robert, B., Honore, J. C., Mignot, T. M., Vacher-Lavenu, M. C., Chapron, C., and Ferre, F. (1999). Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am J Physiol* 276, E1112-1118.

Brandon, D. D., Bethea, C. L., Strawn, E. Y., Novy, M. J., Burry, K. A., Harrington, M. S., Erickson, T. E., Warner, C., Keenan, E. J., and Clinton, G. M. (1993a). Progesterone-Receptor Messenger-Ribonucleic-Acid and Protein Are Overexpressed in Human Uterine Leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 169, 78-85.

Brandon, D. D., Bethea, C. L., Strawn, E. Y., Novy, M. J., Burry, K. A., Harrington, M. S., Erickson, T. E., Warner, C., Keenan, E. J., and Clinton, G. M. (1993b). Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 169, 78-85.

- Bulun, S. E., Simpson, E. R., and Word, R. A. (1994). Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 736-743.
- Candiani, G. B., Fedele, L., Parazzini, F., and Villa, L. (1991). Risk of recurrence after myomectomy. *Br J Obstet Gynaecol* 98, 385-389.
- Cesen-Cummings, K., Copland, J. A., Barrett, J. C., Walker, C. L., and Davis, B. J. (2000). Pregnancy, parturition, and prostaglandins: defining uterine leiomyomas. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 5, 817-820.
- Cha, P. C., Takahashi, A., Hosono, N., Low, S. K., Kamatani, N., Kubo, M., and Nakamura, Y. (2011). A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nat Genet* 43, 447-450.
- Chavez, N. F., and Stewart, E. A. (2001). Medical treatment of uterine fibroids. *Clin Obstet Gynecol* 44, 372-384.
- Chwalisz, K., Perez, M. C., DeManno, D., Winkel, C., Schubert, G., and Elger, W. (2005). Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocrine Reviews* 26, 423-438.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., and Lydon, J. P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68, 771-778.
- Corleta, H. v. E., Chaves, E. B. M., Krause, M. S., and Capp, E. (2007). Tratamento atual dos miomas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 29, 324-328.

- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., and Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3, 207-212.
- DeCherney, A. H., and Nathan, L. (2007). *Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology*, 10th edn (Los Angeles: McGraw-Hill Companies, Inc.).
- Doridot, V., Dubuisson, J. B., Chapron, C., Fauconnier, A., and Babaki-Fard, K. (2001). Recurrence of leiomyomata after laparoscopic myomectomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 8, 495-500.
- Eisinger, S. H., Bonfiglio, T., Fiscella, K., Meldrum, S., and Guzick, D. S. (2005). Twelve-month safety and efficacy of low-dose mifepristone for uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol* 12, 227-233.
- Eisinger, S. H., Meldrum, S., Fiscella, K., le Roux, H. D., and Guzick, D. S. (2003). Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 101, 243-250.
- Elger, W., Bartley, J., Schneider, B., Kaufmann, G., Schubert, G., and Chwalisz, K. (2000). Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. *Steroids* 65, 713-723.
- Enmark, E., and Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 246, 133-138.
- Fedele, L., Vercellini, P., Bianchi, S., Brioschi, D., and Dorta, M. (1990). Treatment with GnRh Agonists before Myomectomy and the Risk of Short-Term Myoma Recurrence. *Brit J Obstet Gynaec* 97, 393-396.

- Fiscella, K., Eisinger, S. H., Meldrum, S., Feng, C., Fisher, S. G., and Guzick, D. S. (2006). Effect of mifepristone for symptomatic leiomyomata on quality of life and uterine size: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 108, 1381-1387.
- Flake, G. P., Andersen, J., and Dixon, D. (2003). Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 111, 1037-1054.
- Fujimoto, J., Hirose, R., Ichigo, S., Sakaguchi, H., Li, Y., and Tamaya, T. (1998). Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma. *Tumour Biol* 19, 126-131.
- Graham, J. D., and Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502-519.
- Gronemeyer, H., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Kastner, P., Turcotte, B., and Chambon, P. (1991). Progesterone Receptors - Isoforms and Antihormone Action. *J Steroid Biochem* 40, 271-278.
- Grow, D. R., Williams, R. F., Hsiu, J. G., and Hodgen, G. D. (1996). Antiprogestin and/or gonadotropin-releasing hormone agonist for endometriosis treatment and bone maintenance: a 1-year primate study. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1933-1939.
- Guarnaccia, M. M., and Rein, M. S. (2001). Traditional surgical approaches to uterine fibroids: abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol* 44, 385-400.
- Herrmann, W., Wyss, R., Riondel, A., Philibert, D., Teutsch, G., Sakiz, E., and Baulieu, E. E. (1982). [The effects of an antiprogestosterone steroid in women: interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy]. *C R Seances Acad Sci III* 294, 933-938.

- Hodges, L. C., Houston, K. D., Hunter, D. S., Fuchs-Young, R., Zhang, Z., Wineker, R. C., and Walker, C. L. (2002). Transdominant suppression of estrogen receptor signaling by progesterone receptor ligands in uterine leiomyoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 196, 11-20.
- Hutchins, F. L., Worthington-Kirsch, R., and Berkowitz, R. P. (1999). Selective uterine artery embolization as primary treatment for symptomatic leiomyomata uteri. *J Am Assoc Gyn Lap* 6, 279-284.
- Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V. A., Kakazu, R., Bulun, S. E., and Kurita, T. (2010). Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* 151, 2433-2442.
- Jiang, J., Wu, R. F., Wang, Z. H., Sun, H. C., Xu, Z., and Xiu, H. M. (2002). Effect of mifepristone on estrogen and progesterone receptors in human endometrial and endometriotic cells in vitro. *Fertil Steril* 77, 995-1000.
- Jourdain, O., Descamps, P., Abusada, N., Ventrillon, E., Dallay, D., Lansac, J., and Body, G. (1996). Treatment of fibromas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 66, 99-107.
- Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randeva, H. S., and Thomas, P. (2006). Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20, 1519-1534.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and 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, 1603-1614.

- Kawaguchi, K., Fujii, S., Konishi, I., Nanbu, Y., Nonogaki, H., and Mori, T. (1989). Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 160, 637-641.
- Kawaguchi, K., Fujii, S., Konishi, I., Okamura, H., and Mori, T. (1985). Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. *Gynecol Oncol* 21, 32-41.
- Knoll, J. S., and Rowell, S. L. (1996). Clinical hematology. In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26, 981-1002.
- Konishi, I., Fujii, S., Ban, C., Okuda, Y., Okamura, H., and Tojo, S. (1983). Ultrastructural study of minute uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol* 2, 113-120.
- Kovacs, K. A., Oszter, A., Gocze, P. M., Kornyei, J. L., and Szabo, I. (2001). Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 7, 1085-1091.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., and Cotran, R. S. (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th edn (Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders).
- Kurachi, O., Matsuo, H., Samoto, T., and Maruo, T. (2001). Tumor necrosis factor-alpha expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2275-2280.

- Levy, B., Mukherjee, T., and Hirschhorn, K. (2000). Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 121, 1-8.
- Li, D. Q., Pan, L. H., and Shao, Z. M. (2004). Inhibitory effects of mifepristone on the growth of human gastric cancer cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *Chin Med Sci J* 19, 237-242.
- Lora, V., Grings, A. O., Capp, E., von Eye Corleta, H., and 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*.
- Losel, R., and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K., and Wehling, M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83, 965-1016.
- Loureiro, S. O., Romao, L., Alves, T., Fonseca, A., Heimfarth, L., Moura Neto, V., Wyse, A. T., and Pessoa-Pureur, R. (2010). Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 1355, 151-164.
- Martel, K. M., Ko, A. C., Christman, G. M., and Stribley, J. M. (2004). Apoptosis in human uterine leiomyomas. *Semin Reprod Med* 22, 91-103.
- Maruo, T., Matsuo, H., Samoto, T., Shimomura, Y., Kurachi, O., Gao, Z., Wang, Y., Spitz, I. M., and Johansson, E. (2000a). Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 65, 585-592.

- Maruo, T., Matsuo, H., Samoto, T., Shimomura, Y., Kurachi, O., Gao, Z. J., Wang, Y., Spitz, I. M., and Johansson, E. (2000b). Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 65, 585-592.
- Maruo, T., Ohara, N., Wang, J., and Matsuo, H. (2004). Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 10, 207-220.
- Matsuo, H., Maruo, T., and Samoto, T. (1997). Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocr Metab* 82, 293-299.
- Mayo (2010). Uterine Fibroids. In, (Mayo Foundation for Medical Education and Research).
- Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.
- Mote, P. A., Bartow, S., Tran, N., and Clarke, C. L. (2002). Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Tr* 72, 163-172.
- Mulac-Jericevic, B., and Conneely, O. M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128, 139-146.
- Murphy, A. A., and Castellano, P. Z. (1994). Ru486 - Pharmacology and Potential Use in the Treatment of Endometriosis and Leiomyomata Uteri. *Curr Opin Obstet Gyn* 6, 269-278.
- Murphy, A. A., Kettel, L. M., Morales, A. J., Roberts, V., Parmley, T., and Yen, S. S. C. (1995a). Endometrial Effects of Long-Term Low-Dose Administration of Ru486. *Fertil Steril* 63, 761-766.

- Murphy, A. A., Kettel, L. M., Morales, A. J., Roberts, V. J., and Yen, S. S. (1993a). Regression of uterine leiomyomata in response to the antiprogestone RU 486. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 513-517.
- Murphy, A. A., Kettel, L. M., Morales, A. J., Roberts, V. J., and Yen, S. S. C. (1993b). Regression of Uterine Leiomyomata in Response to the Antiprogestone Ru-486. *J Clin Endocr Metab* 76, 513-517.
- Murphy, A. A., Morales, A. J., Kettel, L. M., and Yen, S. S. C. (1995b). Regression of Uterine Leiomyomata to the Antiprogestone Ru486 - Dose-Response Effect. *Fertil Steril* 64, 187-190.
- Nelson, K. G., Takahashi, T., Lee, D. C., Luetke, N. C., Bossert, N. L., Ross, K., Eitzman, B. E., and Mclachlan, J. A. (1992). Transforming Growth Factor-Alpha Is a Potential Mediator of Estrogen Action in the Mouse Uterus. *Endocrinology* 131, 1657-1664.
- Nisolle, M., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Squifflet, J., Berliere, M., and Donnez, J. (1999). Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 14, 2844-2850.
- Nowak, R. A. (2001). Identification of new therapies for leiomyomas: What in vitro studies can tell us. *Clin Obstet Gynecol* 44, 327-334.
- Okolo, S. (2008). Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 22, 571-588.
- Olmos Grings, A., Lora, V., Dias Ferreira, G., Simoni Brum, I., von Eye Corleta, H., and Capp, E. (2012). Protein Expression of Estrogen Receptors α and

β and Aromatase in Myometrium and Uterine Leiomyoma. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 73, 113-117.

Otubu, J. A., Buttram, V. C., Besch, N. F., and Besch, P. K. (1982). Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 143, 130-133.

Park, S. H., Ramachandran, S., Kwon, S. H., Cha, S. D., Seo, E. W., Bae, I., Cho, C., and Song, D. K. (2008). Upregulation of ATP-sensitive potassium channels for estrogen-mediated cell proliferation in human uterine leiomyoma cells. *Gynecol Endocrinol* 24, 250-256.

Parker, W. H. (2007). Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 87, 725-736.

Pedeutour, F., Quade, B. J., Weremowicz, S., Dal Cin, P., Ali, S., and Morton, C. C. (1998). Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 23, 361-366.

Pelage, J. P., Le Dref, O., Soyer, P., Kardache, M., Dahan, H., Abitbol, M., Merland, J. J., Ravina, J. H., and Rymer, R. (2000). Fibroid-related menorrhagia: treatment with superselective embolization of the uterine arteries and midterm follow-up. *Radiology* 215, 428-431.

Porter, K. B., Tsibris, J. C., Nicosia, S. V., Murphy, J. M., O'Brien, W. F., Rao, P. S., and Spellacy, W. N. (1995). Estrogen-induced guinea pig model for uterine leiomyomas: do the ovaries protect? *Biol Reprod* 52, 824-832.

Pozzobon, A. (2006) Modulação androgênica da proliferação celular : expressão do receptor de androgênios, co-reguladores e genes-alvo em

células epiteliais prostáticas humanas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., and Levin, E. R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16, 100-115.

Rein, M. S. (2000a). Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 5, 791-793.

Rein, M. S. (2000b). Advances in uterine leiomyoma research: The progesterone hypothesis. *Environ Health Persp* 108, 791-793.

Rein, M. S., Barbieri, R. L., and Friedman, A. J. (1995). Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol* 172, 14-18.

Rein, M. S., Friedman, A. J., Stuart, J. M., and MacLaughlin, D. T. (1990). Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate. *Fertil Steril* 53, 1018-1023.

Reinsch, R. C., Murphy, A. A., Morales, A. J., and Yen, S. S. (1994). The effects of RU 486 and leuprolide acetate on uterine artery blood flow in the fibroid uterus: a prospective, randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1623-1627; discussion 1627-1628.

Sachdeva, G., Shah, C. A., Kholkute, S. D., and Puri, C. P. (2000). Detection of progesterone receptor transcript in human spermatozoa. *Biol Reprod* 62, 1610-1614.

- Sadovsky, Y., Kushner, P. J., Roberts, J. M., and Riemer, R. K. (1993). Restoration of estrogen-dependent progesterone receptor expression in a uterine myocyte cell line. *Endocrinology* 132, 1609-1613.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Aoki, I., and Tamaya, T. (2003). Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 68, 11-19.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Hong, B. L., Nakagawa, Y., and Tamaya, T. (2004). Drastic decrease of progesterone receptor form B but not A mRNA reflects poor patient prognosis in endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 93, 394-399.
- Schlaff, W. D., Zerhouni, E. A., Huth, J. A., Chen, J., Damewood, M. D., and Rock, J. A. (1989). A placebo-controlled trial of a depot gonadotropin-releasing hormone analogue (leuprolide) in the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 74, 856-862.
- Schuchard, M., Landers, J. P., Sandhu, N. P., and Spelsberg, T. C. (1993). Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 14, 659-669.
- Severino, M. F., Murray, M. J., Brandon, D. D., Clinton, G. M., Burry, K. A., and Novy, M. J. (1996). Rapid loss of oestrogen and progesterone receptors in human leiomyoma and myometrial explant cultures. *Mol Hum Reprod* 2, 823-828.
- Sheridan, P. L., Evans, R. M., and Horwitz, K. B. (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem* 264, 6520-6528.

- Shimomura, Y., Matsuo, H., Samoto, T., and Maruo, T. (1998). Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2192-2198.
- Shozu, M., Sumitani, H., Segawa, T., Yang, H. J., Murakami, K., and Inoue, M. (2001). Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5405-5411.
- Shozu, M., Sumitani, H., Segawa, T., Yang, H. J., Murakami, K., Kasai, T., and Inoue, M. (2002). Overexpression of aromatase P450 in leiomyoma tissue is driven primarily through promoter I.4 of the aromatase P450 gene (CYP19). *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2540-2548.
- Shushan, A., Ben-Bassat, H., Mishani, E., Laufer, N., Klein, B. Y., and Rojansky, N. (2007). Inhibition of leiomyoma cell proliferation in vitro by genistein and the protein tyrosine kinase inhibitor TKS050. *Fertil Steril* 87, 127-135.
- Shushan, A., Rojansky, N., Laufer, N., Klein, B. Y., Shlomai, Z., Levitzki, R., Hartzstark, Z., and Ben-Bassat, H. (2004). The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. *Hum Reprod* 19, 1957-1967.
- Shveiky, D., Shushan, A., Ben Bassat, H., Klein, B. Y., Ben Meir, A., Levitzky, R., and Rojansky, N. (2009). Acetaldehyde differentially affects the growth of uterine leiomyomata and myometrial cells in tissue cultures. *Fertil Steril* 91, 575-579.

- Skafar, D. F. (1991). Differences in the Binding Mechanism of Ru486 and Progesterone to the Progesterone-Receptor. *Biochemistry-Us* 30, 10829-10832.
- Sozen, I., and Arici, A. (2002). Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 78, 1-12.
- Spitz, I. M., and Chwalisz, K. (2000). Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids* 65, 807-815.
- Standring, S., and Gray, H. (2008). *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*, 40th edn ([Edinburgh]: Churchill Livingstone/Elsevier).
- Steinauer, J., Pritts, E. A., Jackson, R., and Jacoby, A. F. (2004). Systematic review of mifepristone for the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 103, 1331-1336.
- Stewart, E. A. (2001). Uterine fibroids. *Lancet* 357, 293-298.
- Takimoto, G. S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M. G., Sartorius, C. A., Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Bain, D. L., and Horwitz, K. B. (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 209-219.
- Tiltman, A. J. (1985). The effect of progestins on the mitotic activity of uterine fibromyomas. *Int J Gynecol Pathol* 4, 89-96.
- Twisk, J. W. (2004). Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis. *Eur J Epidemiol* 19, 769-776.

- Viville, B., Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Wetzka, B., and Smith, S. K. (1997a). Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 12, 815-822.
- Viville, B., Charnock-Jones, D., Sharkey, A., Wetzka, B., and Smith, S. K. (1997b). Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 12, 815-822.
- Walker, C. L., and Stewart, E. A. (2005). Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 308, 1589-1592.
- Wilson, E. A., Yang, F., and Rees, E. D. (1980). Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol* 55, 20-24.
- Wise, L. A., Palmer, J. R., Harlow, B. L., Spiegelman, D., Stewart, E. A., Adams-Campbell, L. L., and Rosenberg, L. (2004). Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study. *Am J Epidemiol* 159, 113-123.
- Yang, Y., Zheng, S., and Li, K. (1996). [Treatment of uterine leiomyoma by two different doses of mifepristone]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 31, 624-626.
- Zeger, S. L., and Liang, K. Y. (1986). Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 42, 121-130.

ANEXOS

ANEXO 1 **Termo de Consentimento Livre e esclarecido**

Projeto: EFEITO DA MIFEPRISTONA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DAS ISOFORMAS A E B DO RECEPTOR DE PROGESTERONA EM MIOMÉTRIO E LEIOMIOMA

Pesquisadores responsáveis: Aline Amaral, Ilma S. B. Silva, Helena Corleta

Telefones para contato: (051) 3308-3559, 3311-5699

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 em idade reprodutiva. Como a Sra. tem o diagnóstico de leiomioma uterino e foi recomendada cirurgia para retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-la para 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 (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). 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. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informada dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetida e 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: _____

Pesquisador: _____