

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

Ana Paula de Bortoli Silveira

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PRT, PGRMC1 E PGRMC2 EM
LEIOMIOMAS UTERINOS**

Porto Alegre

2019

Ana Paula de Bortoli Silveira

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PRT, PGRMC1 E PGRMC2 EM
LEIOMIOMAS UTERINOS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum

Coorientadora: Dr.^a Gabriela dos Santos Sant'Anna

Porto Alegre

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira, Ana Paula de Bortoli
Análise de expressão gênica de PRT, PGRMC1 e PGRMC2
em leiomiomas uterinos / Ana Paula de Bortoli
Silveira. -- 2019.
55 f.
Orientadora: Ilma Simoni Brum.

Coorientadora: Gabriela dos Santos Sant'Anna.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Leiomiomas Uterinos. 2. Progesterona. 3.
Receptores de progesterona. I. Brum, Ilma Simoni,
orient. II. Sant'Anna, Gabriela dos Santos, coorient.
III. Título.

Ana Paula de Bortoli Silveira

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PRT, PGRMC1 E PGRMC2 EM
LEIOMIOMAS UTERINOS**

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

Aprovado em 05 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Letícia Viçosa Pires - UFCSPA

Dr.^a Lolita Schneider Pizzolato - UFRGS

Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum - UFRGS (orientadora)

Dr.^a Gabriela dos Santos Sant'Anna - UFRGS (coorientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum, pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, pela confiança e todo o conhecimento que adquiri durante o período de iniciação científica no LaBiMET.

A minha coorientadora, Gabriela dos Santos Sant'Anna, por todo o auxílio, paciência e confiança durante o período de realização deste trabalho. Teu auxílio foi essencial durante esta etapa.

Agradeço aos colegas e amigos de laboratório que de alguma forma, sempre procuraram me auxiliar na condução deste projeto, principalmente frente as adversidades. Agradeço especialmente ao meu grande amigo Jeferson Dalmago por todo o apoio, paciência, companheirismo e puxões de orelha durante todo o período da graduação. Sabemos que não foi fácil.

Por fim, agradeço a minha família, meus amigos e meu namorado, João Marcelo, que estiveram sempre presentes. Obrigada por todo o carinho, confiança e paciência. Vocês foram essenciais para o meu crescimento durante esta etapa.

RESUMO

Leiomiomas uterinos ou miomas são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio e acometem uma parcela considerável da população feminina. Têm como principais sintomas associados sangramentos excessivos e dor pélvica inespecífica. Atualmente nos EUA são realizadas cerca de 600 mil histerectomias por ano – com custos extremamente excessivos – para o tratamento de leiomiomas uterinos, considerando esta doença um problema de saúde pública. Frente a estes dados é imprescindível o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de leiomiomas uterinos e a busca por tratamentos menos invasivos. A literatura estabelece o importante papel da progesterona – através de sua ligação a receptores nucleares específicos – como um dos responsáveis pelo início da proliferação tumoral uma vez que pode mediar processos transcricionais. Além dos receptores nucleares, a progesterona também possui receptores nas membranas celulares, responsáveis pelas funções não-genômicas do hormônio, porém poucos são os estudos que avaliam o papel destes receptores no desenvolvimento tumoral, não tendo sido estudados, até o momento, em leiomiomas uterinos e miométrio. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de mRNA dos receptores de progesterona PRT, PGRMC1 e PGRMC2 e verificar se sua expressão é maior em leiomiomas uterinos quando comparada ao miométrio. Para a realização das análises, selecionamos 25 pacientes com diagnóstico de leiomiomas uterino submetidas a histerectomia abdominal pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia no bloco cirúrgico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A avaliação da expressão de mRNA destes receptores foi realizada através da técnica de RT-qPCR. De acordo com os resultados obtidos, os genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 foram expressos em ambos os tecidos, sem apresentar diferenças estatísticas significativas entre os mesmos. Estes resultados demonstram pela primeira vez, segundo busca recente na literatura, a expressão dos receptores de membrana para progesterona no miométrio e no leiomioma uterino. Estes são resultados preliminares onde avaliamos somente a expressão gênica dos receptores, que podem sofrer regulação pós-transcricional e induzir alterações na expressão proteica dos mesmos. A análise proteica será necessária para um melhor entendimento da função que os receptores de progesterona possivelmente desempenham sobre a proliferação tumoral.

Palavras-chave: Leiomiomas Uterinos. Progesterona. Receptores nucleares. Receptores de membrana.

ABSTRACT

Uterine leiomyomas or myomas are benign tumors that develop in the myometrium and affect a considerable portion of the female population. The main symptoms are excessive bleeding and nonspecific pelvic pain. About 600,000 hysterectomies per year – with extremely excessive costs – are currently being performed in the USA for the treatment of myomas, making this disease a public health problem. Faced with these data, it is essential to understand the molecular mechanisms involved in the development of uterine leiomyomas and the search for less invasive treatments. The literature establishes the important role of progesterone – through its binding to specific nuclear receptors – as one of the factors responsible for the onset of tumor proliferation since it can mediate transcriptional processes. In addition to nuclear receptors, progesterone also has receptors on cell membranes responsible for the non-genomic functions of the hormone, but few studies have evaluated the role of these receptors in tumor development and have not been studied to date in leiomyomas and myometrium. The objective of this study was to evaluate the mRNA expression of the progesterone receptors PRT, PGRMC1 and PGRMC2 and to verify if its expression is higher in uterine leiomyomas when compared to the myometrium. For the analysis, we selected 25 patients with uterine leiomyomas submitted to abdominal hysterectomy by the Gynecology and Obstetrics Service in the surgical block of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA). Evaluation of the mRNA expression of these receptors was performed by the RT-qPCR technique. According to the results, the PRT, PGRMC1 and PGRMC2 genes were expressed in both tissues, without significant statistical differences between them. These results demonstrate for the first time, according to a recent literature search, the expression of membrane receptors for progesterone in the myometrium and leiomyoma. These are preliminary results where we evaluate only the gene expression of the receptors, which can undergo post-transcriptional regulation and induce alterations in protein expression. Protein analysis will be required for a better understanding of the role that progesterone receptors may play in tumor proliferation.

Keywords: Uterine leiomyoma. Progesterone. Nuclear receptors. Membrane receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Útero e suas camadas	08
Figura 2 – Histologia uterina	09
Figura 3 – Útero retirado em histerectomia abdominal	09
Figura 4 – Tipos de leiomiomas uterino	10
Figura 5 – Vias de ação da progesterona	14
Figura 6 – Receptor de progesterona nuclear	16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1 ÚTERO E MIOMÉTRIO	7
1.2 LEIOMIOMAS UTERINOS	8
1.3 DESENVOLVIMENTO DOS LEIOMIOMAS UTERINOS	12
1.3.1 Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de leiomiomas uterinos.	13
1.3.2 Progesterona	13
1.3.2.1 Via clássica de ação da progesterona	14
1.3.2.2 Via não clássica de ação da progesterona	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	44
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA Gynecological endocrinology	46

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 ÚTERO E MIOMÉTRIO

O útero é um órgão situado na pelve que faz parte do sistema genital feminino e apresenta formato piriforme (Figura 1). Suas paredes são espessas e capazes de sofrer deformações em diversas ocasiões como por exemplo em processos de adaptação ao crescimento do feto e para sua posterior expulsão no momento do parto. Este órgão pode ser dividido em duas porções: o corpo (porção superior e intra-abdominal) e colo (porção inferior e vaginal). Suas paredes são formada por três camadas: perimétrio (camada serosa externa), miométrio (camada muscular) e endométrio (camada mucosa interna). O miométrio é a camada média da parede do corpo uterino, formada por células musculares lisas. Essa camada é responsável pela distensão do órgão em casos de gravidez e durante o parto é responsável pelas contrações do mesmo (MOORE, 2014). É no miométrio que se desenvolvem os tumores denominados leiomiomas uterinos.

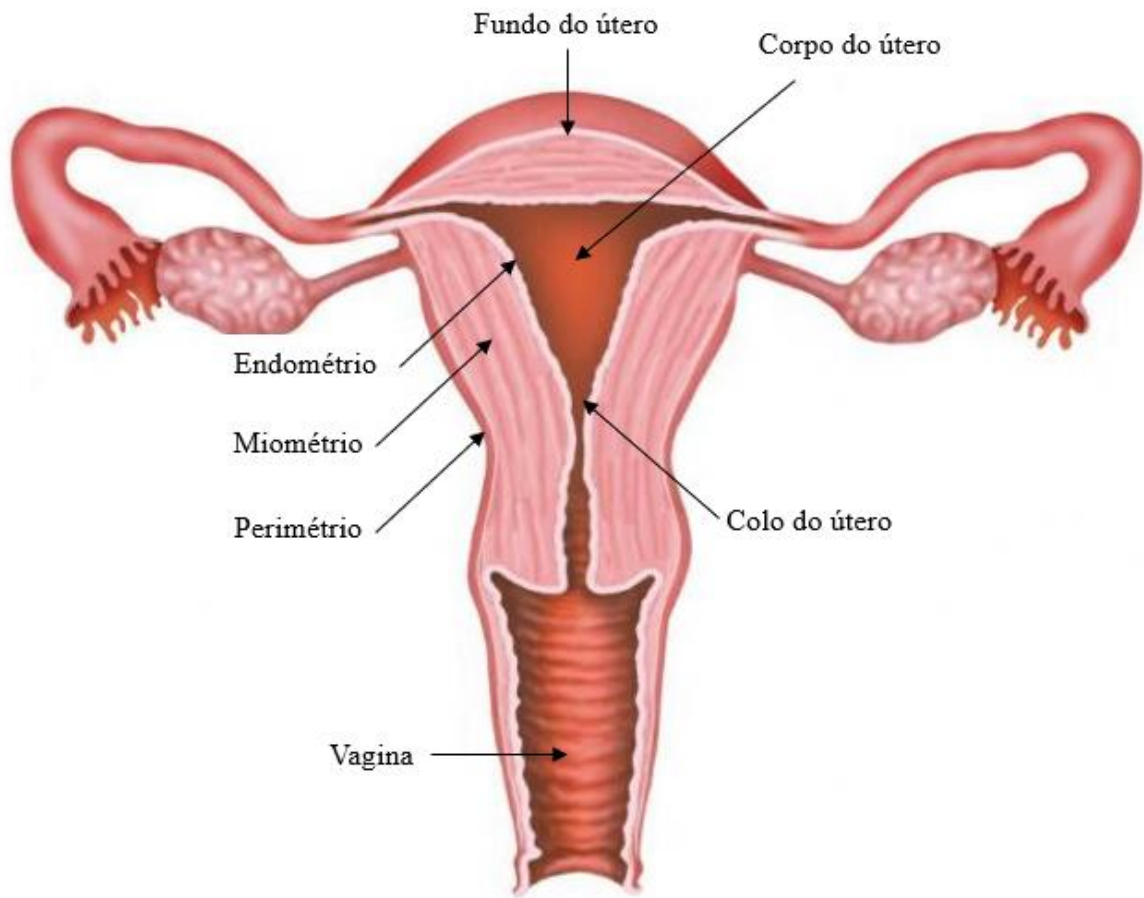


Figura 1. Útero e suas camadas. Adaptado de: <https://www.md-health.com/> (2019). Acesso em: 26 de junho de 2019.

1.2 LEIOMIOMAS UTERINOS

Leiomiomas uterinos ou miomas são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio, a camada muscular da parede uterina, e constituem a neoplasia benigna mais comum do sistema genital feminino (FIEBITZ et al., 2012). Esses tumores benignos apresentam como característica o aumento desordenado de tecido fibroso rico em matriz extracelular constituída por colágeno, proteoglicanos e fibronectina (Figura 2), que respondem aos hormônios esteroides femininos estrogênio e progesterona. O útero pode conter diversos desses tumores, além de ainda apresentarem diversos tamanhos, o que pode resultar no aumento do órgão (Figura 3) (KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014; STEWART et al., 2016). Dados da literatura sugerem que esses hormônios atuam localmente e medeiam o crescimento dos leiomiomas uterinos pela ligação com seus receptores e subsequente ativação de proto-oncogenes e fatores

de crescimento (SABRY; AL-HENDY, 2012).

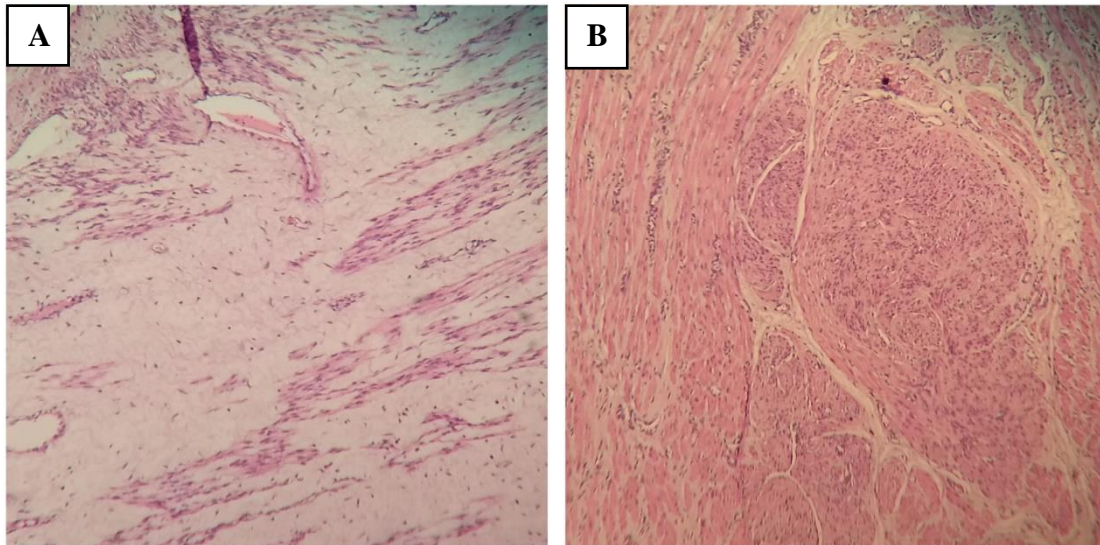


Figura 2. Histologia uterina. Coloração de hematoxilina e eosina (HE) (40x). A) Leiomioma uterino. B) Miométrio.

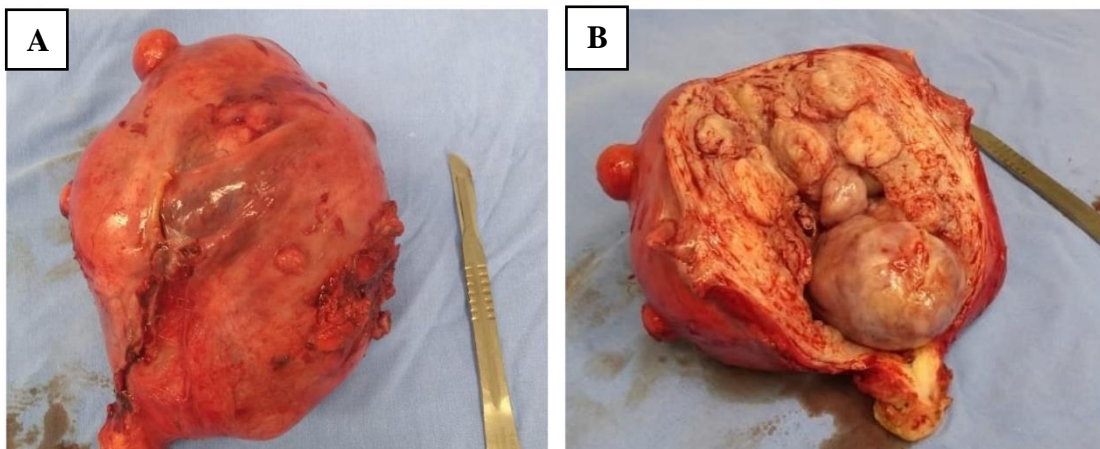


Figura 3. Útero retirado em histerectomia abdominal. A) Útero íntegro logo após a remoção cirúrgica. B) Órgão dissecado, evidenciando a quantidade de leiomiomas uterinos presentes.

Os leiomiomas uterinos podem estar presentes em diferentes porções do miométrio, apresentando assim, uma classificação de acordo com sua localização (Figura 4). Estes tumores são classificados de quatro formas, submucoso; subseroso; intramural e pediculado, e seguem uma subclassificação de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Segundo a FIGO, estes tumores podem ser classificados de 8 diferentes formas onde todas elas dependem da localização e contato com outras camadas do corpo uterino, como o endométrio e outras regiões do útero (STEWART et al., 2016). Os tumores submucosos formam

uma protrusão em direção a cavidade endometrial, os tumores subserosos formam uma protrusão em direção a cavidade serosa do útero, já os tumores intramurais são localizados totalmente ou parcialmente dentro do miométrio. Além disso, os tumores submucosos e subserosos podem crescer para além da superfície uterina, ficando presos por pedículos. Estes tumores podem ser chamados de pediculados (KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; ASTER, 2013).

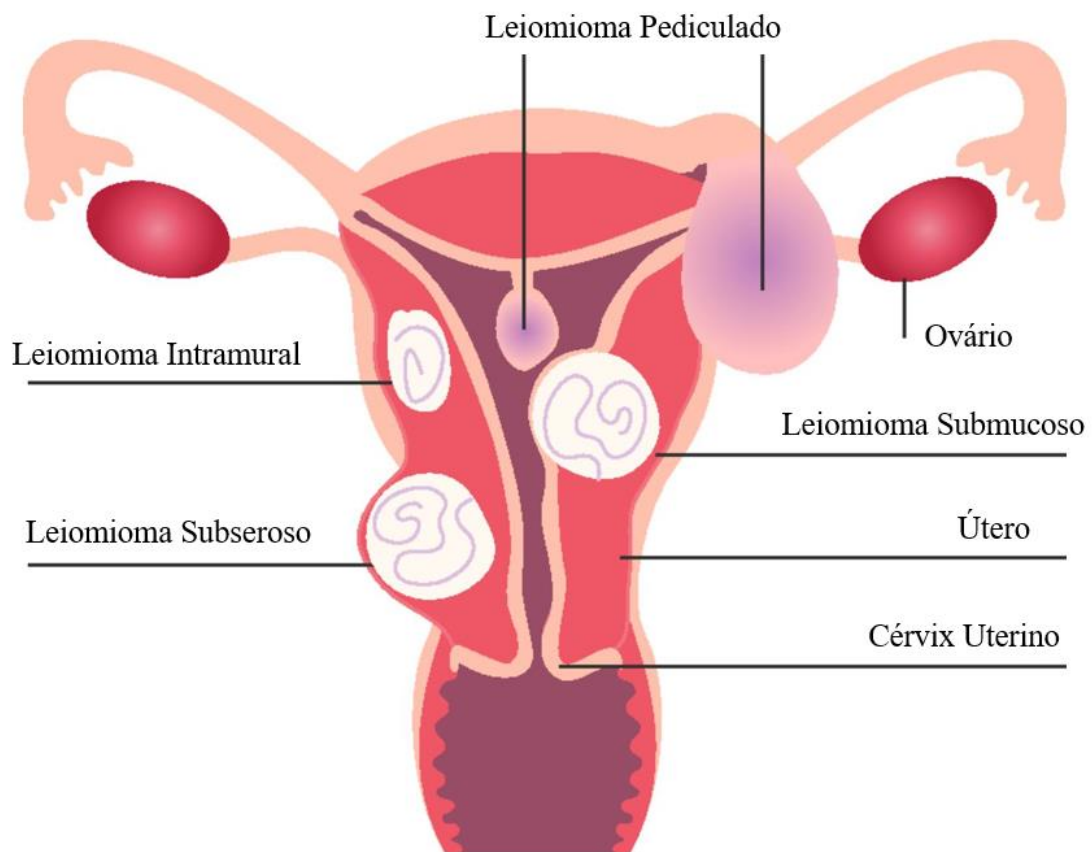


Figura 4. Tipos de leiomiomas uterinos. Adaptado de Lumsden (2015).

Os sintomas mais comuns apresentados por pacientes diagnosticadas com leiomiomas uterinos são sangramentos irregulares – o que é preocupante uma vez que podem levar ao desenvolvimento de anemia – e pressão seguida de dores pélvicas. Outro sintoma apresentado menos frequentemente é o aumento da duração da menstruação. Em casos menos comuns pode ocorrer a obstrução de ureteres podendo gerar problemas renais. Além disso, essas pacientes também podem apresentar sintomas gastrointestinais como constipação e mal estar (STEWART et al., 2016; VON EYE CORLETA et al., 2007).

A incidência desses tumores é alta e pode atingir cerca de 70% das mulheres da população, sendo que seu desenvolvimento pode ser influenciado por diversos fatores (STEWART et al., 2017; STYER; RUEDA, 2016). Ao passo que a ocorrência de leiomiomas uterinos aumenta principalmente nos períodos que antecedem a menopausa, ela diminui em mulheres que se encontram em um período pós-menopausa (MCWILLIAMS; CHENNATHUKUZZHI, 2017). Além dos sintomas mais comumente apresentados, estas pacientes podem ainda sofrer abortos recorrentes (VON EYE CORLETA et al., 2007). Em casos de gestantes que não sofrem abortos, os leiomiomas uterinos podem estar envolvidos com o desenvolvimento de hemorragias, inércia uterina e má apresentação fetal (SEGARS et al., 2014; STEWART, 2001).

Atualmente, os tratamentos disponíveis visam a diminuição dos sintomas e do tamanho do tumor, porém nenhum até o momento se mostrou totalmente efetivo como a remoção total do órgão. Em casos de pacientes com sangramentos irregulares, pode ser indicado o uso de anti-inflamatórios não esteroidais ou anti-progestágenos. Esses medicamentos podem diminuir os sangramentos, diminuindo os sintomas. Entretanto, algumas pacientes não respondem bem a esses fármacos e nessas circunstâncias é indicada a intervenção cirúrgica (SABRY; AL-HENDY, 2012). O tratamento cirúrgico é realizado tanto em pacientes que não respondem aos medicamentos quanto em pacientes que apresentam sintomas como dor/pressão pélvica e tumores com mais de 7 centímetros. Nestes casos, o método escolhido depende da vontade que a paciente possui de engravidar, podendo ser realizada a miomectomia, a embolização do tumor ou a histerectomia (KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014). A miomectomia consiste na remoção apenas dos tumores, preservando o útero da paciente, porém, não impede o desenvolvimento de novas lesões. A embolização do tumor tem como intuito obstruir o fluxo sanguíneo que mantém a oxigenação do tecido. Nestas condições, o tumor não é capaz de se recuperar da lesão causada, o que acaba levando a morte das células tumorais. Entretanto, complicações que sucedem a embolização podem inviabilizar a utilização desta prática. Já a histerectomia consiste na remoção completa do útero da paciente, resultando na infertilidade da mesma. Análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas são utilizados no preparo para as cirurgias. Esses medicamentos promovem a diminuição do tamanho do tumor, porém, seu uso prolongado não é recomendado uma vez que apresentam muitos efeitos colaterais. Quando seu uso é interrompido, é normal que ocorra o retorno do crescimento tumoral (KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014; VON EYE CORLETA et al., 2007). Após a miomectomia ou embolização,

existem grandes chances de que haja a recidiva da doença, resultando no crescimento de novos tumores, por isso o tratamento mais indicado hoje é a histerectomia (KIM; SEFTON, 2012).

Estudos realizados nos Estados Unidos demonstram que a cada ano o serviço de saúde do país realiza cerca de 600 mil histerectomias, sendo 40% delas relacionadas a leiomiomas uterinos. Estes gastos podem chegar a 2 bilhões de dólares a cada ano. Frente a estes dados, podemos assumir que os leiomiomas uterinos são um problema de saúde pública, tornando imprescindível a busca por prevenção, diagnóstico precoce e tratamento desta doença (NAVARRO et al., 2012). Até o momento, o Brasil ainda não possui nenhum levantamento relacionando o número de histerectomias realizadas a cada ano e seus custos para o serviço de saúde.

1.3 DESENVOLVIMENTO DOS LEIOMIOMAS UTERINOS

Existem diversos fatores atrelados a etiologia de leiomiomas uterinos, o que dificulta o entendimento acerca dos mecanismos que influenciam o crescimento desses tumores. Sabe-se que vários fatores de risco podem estar envolvidos, como por exemplo etnia, obesidade, hipertensão, menarca precoce, nuliparidade, stress e até mesmo o consumo de álcool e cafeína (DVORSKÁ et al., 2017; FLAKE; ANDERSEN; DIXON, 2003).

A etnia parece ser um fator predominante no desenvolvimento de leiomiomas uterinos. É documentado que mulheres de origem africana apresentam uma maior probabilidade de desenvolverem estes tumores quando comparadas a mulheres caucasianas. Além disso, os sintomas que estas mulheres apresentam parecem se manifestar de uma maneira mais agressiva, tornando o diagnóstico mais prematuro (MCWILLIAMS; CHENNATHUKUZZHI, 2017).

A menarca precoce, assim como a nuliparidade e gravidez estão envolvidas com fatores hormonais e configuram fatores de risco para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Existem alterações hormonais que ocorrem normalmente nestes casos o que já é documentado por estar relacionado ao crescimento destes tumores, principalmente através da ação de hormônios como estrogênio e progesterona. Apesar disso, pouco se sabe ainda sobre quais mecanismos podem influenciar estes fatores de risco bem como seus resultados (KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014).

O consumo de álcool e cafeína também parece estar relacionado com o desenvolvimento e crescimento de leiomiomas uterinos. Existe uma correlação entre o consumo dessas bebidas com a idade e etnia de pacientes diagnosticadas com esses tumores (KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014). Estes fatores são dependentes da quantidade de consumo sendo que, cafeína configura um fator de risco para mulheres que consomem mais de 500 mg/dia (DVORSKÁ et al., 2017; KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014).

Obesidade, hipertensão e stress também parecem ter relação com leiomiomas uterinos. Não se sabe ao certo qual papel essas condições podem desempenhar como fatores de risco mas sabe-se que as mesmas devem estar relacionadas a alterações hormonais, o que consolida a hipótese da influência de hormônios como o estrogênio e a progesterona sobre o desenvolvimento destes tumores (DVORSKÁ et al., 2017; VINES; TA; ESSERMAN, 2010).

1.3.1 Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de leiomiomas uterinos

Evidências sugerem que alguns leiomiomas uterinos podem se desenvolver a partir de alterações cromossômicas e mutações gênicas. A transformação neoplásica desses tumores parece ocorrer em etapas, nas quais as células adquirem um novo fenótipo decorrente de alterações genômicas (YANG et al., 2016). Além disso, são descritos na literatura mais de 100 genes desregulados nesses tumores, incluindo receptores de estrogênio (α e β), receptores de progesterona (total e B), genes relacionados com a produção de matriz extracelular, genes supressores tumorais, entre outros (LEE et al., 2005; LORA et al., 2012; ROTH; KLETT; COWAN, 2007). Entretanto, devido à heterogenicidade da doença, é possível que outras vias de sinalização também se apresentem desreguladas.

1.3.2 Progesterona

A progesterona, um dos hormônios esteroides ovarianos, é responsável por desempenhar um papel chave no desenvolvimento e função do sistema genital feminino. Ela atua, por exemplo, sobre a manutenção do ciclo ovariano. Seu principal local de síntese e secreção, juntamente com o estrogênio, é o ovário e sua liberação é influenciada por diversos estímulos como em resposta ao LH (hormônio luteinizante); FSH (hormônio folículo-estimulante); prolactina; prostaglandinas e agentes β -adrenérgicos (AIRES, 2012; GRAHAM;

CLARKE, 1997). Seus efeitos fisiológicos são mediados através de sua interação com seus receptores, os quais podem ser desencadeados por duas vias: a via clássica de ação da progesterona e a via não clássica (Figura 5) (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013).

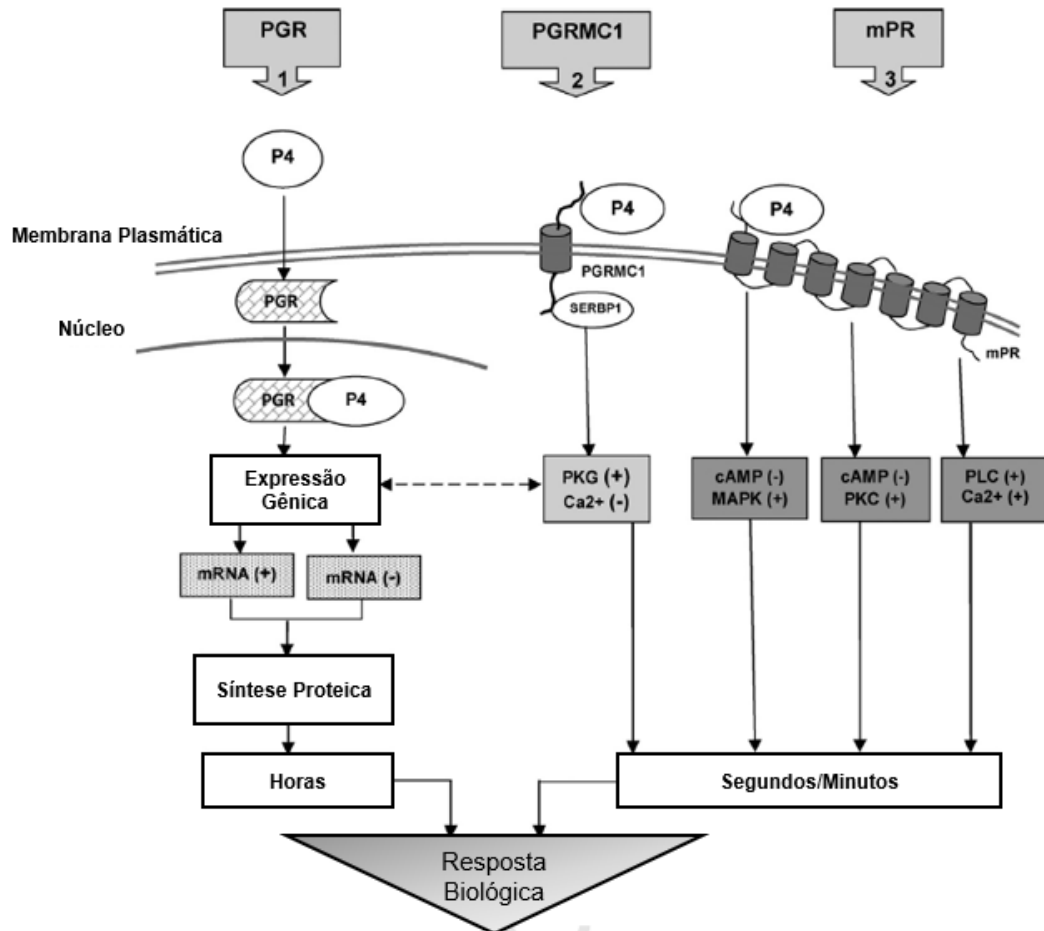


Figura 5. Vias de ação da progesterona. Representação dos efeitos da progesterona de acordo com a sua via de atuação. Adaptado de Kowalik *et al* (2013).

1.3.2.1 Via clássica de ação da progesterona

Sabe-se que esses tumores possuem desenvolvimento e manutenção dependentes da ação dos hormônios esteroides sexuais. O modelo proposto por Schuchard e colaboradores (1993) descreve a ação nuclear dos receptores hormonais. Os hormônios esteroides possuem características lipofílicas, o que os confere a capacidade de difusão através da membrana plasmática. Uma vez dentro das células, esses hormônios formam complexos de alta afinidade com seus receptores específicos, resultado na ativação do complexo. Essa ativação envolve mudanças conformacionais e associações entre proteínas, possibilitando uma ligação de alta

afinidade entre o complexo hormônio-receptor (HR) e regiões do DNA chamadas Elementos Responsivos a Esteroides (EREs). Esses EREs correspondem a sequências de DNA que possuem entre 15 a 20 pares de bases localizados anteriormente ao sítio de transcrição do gene responsivo ao esteroide. Uma vez ligado a essa sequência, o complexo HR atua como fator de transcrição, modulando a taxa de transcrição do gene alvo.

Os receptores de progesterona (PR) são proteínas intracelulares específicas que integram a superfamília de receptores nucleares para hormônios esteroides e são responsáveis pela transmissão de sinais provenientes da ligação da progesterona com seu receptor (complexo HR), como proliferação e diferenciação celular (CONNEELY; LYDON, 2000; GRIMM; HARTIG; EDWARDS, 2016; RICHER et al., 2002). Estes receptores apresentam diversas isoformas, porém duas são as predominantes: receptor de progesterona A (PRA) e receptor de progesterona B (PRB) (PATEL et al., 2015). Estas isoformas são produtos de um único gene, resultado da transcrição de dois promotores alternativos – que podem ser induzidos por fatores hormonais – e também como resultado da tradução de dois diferentes códon de iniciação (AUG) localizados no mRNA de PGR (Figura 6) (CONNEELY; LYDON, 2000; KASTNER et al., 1990; PATEL et al., 2015). Quando ativados pela progesterona, os receptores são encontrados em diversas regiões uterinas, como nas células estromais do endométrio e nas células musculares do miométrio (PATEL et al., 2015).

PRB é a maior isoforma, apresentando peso molecular de 116 KDa e uma região de 164 aminoácidos na extremidade N-terminal, a qual não está presente em PRA (Figura 6) (MOTE et al., 2001). Estudos demonstram que PRA e PRB possuem funções distintas no útero. Enquanto PRA é responsável pelo equilíbrio da fisiologia uterina, PRB parece desempenhar funções relacionadas a hiperplasia e inflamação das células uterinas, sendo PRA capaz de reprimir os efeitos de PRB (PATEL et al., 2015).

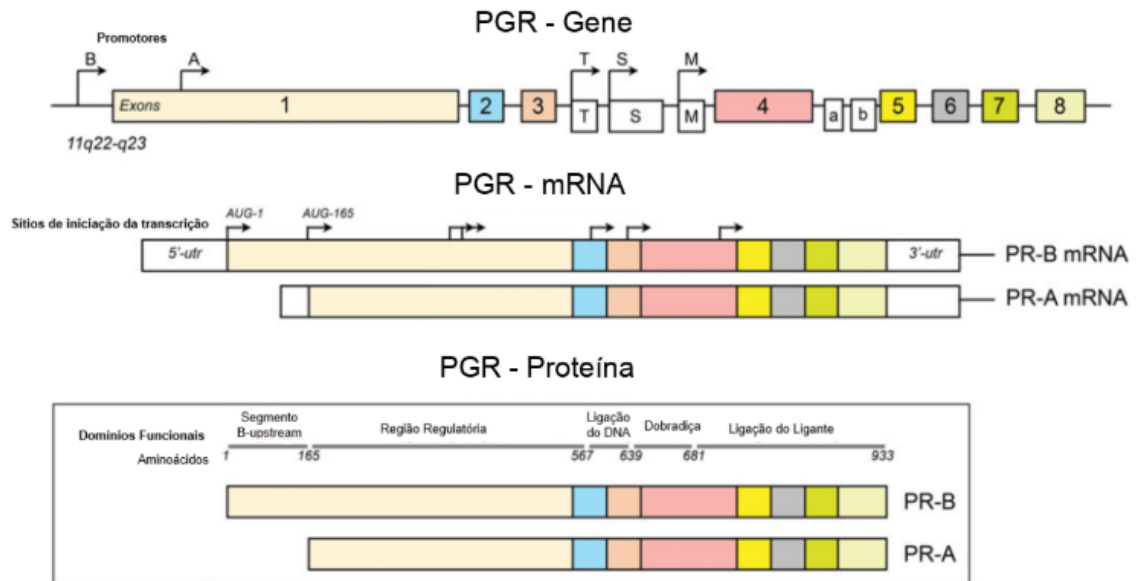


Figura 6. Receptor de progesterona nuclear. Estrutura das isoformas A e B produzidas a partir do gene PGR. Adaptado de Patel *et al.* (2015).

É sugerido na literatura um aumento da expressão de PRA e PRB em leiomiomas uterinos quando comparados ao miométrio. Além disso, sabe-se que os PR possuem ações extranucleares, como participação em vias relacionadas com a viabilidade celular e prevenção da apoptose, o que pode contribuir para o crescimento de leiomiomas uterinos (KIM; SEFTON, 2012; MOTE *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2015).

1.3.2.2 Via não clássica de ação da progesterona

A via não clássica de ação da progesterona é estabelecida através da ativação de receptores transmembrana específicos que respondem a seus estímulos (VALADEZ-COSMES *et al.*, 2016). Existem dois tipos de receptores de progesterona presentes nas membranas celulares, os receptores de progesterona de membrana (mPR) e os componentes de membrana do receptor de progesterona (PGRMCs) (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013; VALADEZ-COSMES *et al.*, 2016). Uma vez ligados a progesterona, esses receptores sofrem mudanças conformacionais que desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013). mPRs possuem sete domínios transmembrana, o que os torna semelhantes a receptores acoplados a proteínas G. São altamente distribuídos pelo organismo, porém a isoformas mPR α e mPR β são encontradas em abundância em tecidos reprodutivos. No miométrio, estas proteínas apresentam expressão de mRNA

alterada durante a gravidez, indicando sua associação com PRB na manutenção do tecido neste período. Além disso, estes receptores são capazes de ativar vias intracelulares de sinalização que atuam na atividade das células musculares lisas do miométrio e induzem o trabalho de parto (VALADEZ-COSMES et al., 2016). PGRMCs são proteínas altamente expressas em tecidos reprodutivos e apresentam apenas um domínio transmembrana. Duas isoformas destas proteínas são descritas na literatura – PGRMC1 e PGRMC2 – onde ambas parecem se originar de um gene comum porém podem apresentar funções distintas (PRU; CLARK, 2013; WENDLER; WEHLING, 2013).

Descrita em 1996, PGRMC1 é uma proteína que possui peso molecular de 28 kDa e 194 aminoácidos, cujo gene está localizado no cromossomo X e que parece desempenhar um papel importante na regulação do ciclo celular e apoptose uma vez que a expressão de seu mRNA é maior na fase proliferativa do ciclo menstrual (CAHILL et al., 2016; KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013; PELUSO et al., 2014; PELUSO; LODDE; LIU, 2012; PRU; CLARK, 2013). Sua localização é principalmente perinuclear porém, é possível que ocorra uma dinâmica de migração entre as membranas celulares, citoplasma e núcleo (PELUSO; LODDE; LIU, 2012). Muito se discutiu acerca do papel de PGRMC1 e sua ligação com a progesterona. A conclusão atualmente aceita é que, além de ser um receptor direto para a progesterona, PGRMC1 é capaz ainda de formar complexos com PGRMCs e mPRs para a ligação do hormônio (CAHILL et al., 2016).

Além de sua participação na ação da progesterona durante a regulação de processos como ciclo celular, PGRMC1 também participa do metabolismo do colesterol e apresenta domínios de ligação para membros da família CYP450 – complexo relacionado com a resistência a quimioterapia (CAHILL et al., 2016; KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013). Uma das ações de PGRMC1 pode ocorrer a partir de sua ligação a SERBP1 (proteína de ligação à serpina), que resulta na formação de um complexo que ativa a proteína quinase G (PKG) resultando na mudança dos níveis de Ca^{+} intracelulares e mediando possíveis efeitos antiapoptóticos da progesterona (Figura 5). Outras possibilidades são a ligação de PGRMC1 a membros de CYP450 e participação no metabolismo do colesterol, atuando na resistência à quimioterapia e alterando a produção de progesterona, respectivamente (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013).

Localizado no cromossomo 4, o gene de PGRMC2 codifica uma proteína

transmembrana ainda pouco caracterizada pela literatura. Assim como PGRMC1, PGRMC2 apresenta um domínio N-terminal extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que respondem à ligação da progesterona (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013; PRU; CLARK, 2013). Apesar da aparente homologia entre estes receptores, os domínios N-terminal e transmembrana diferem entre si evidenciando diferenças na funcionalidade de ambas (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013). Estudos indicam que PGRMC2 é capaz de inibir processos de migração celular, podendo indicar seu possível papel no controle da progressão tumoral (PRU; CLARK, 2013; WENDLER; WEHLING, 2013).

Evidências sugerem que PGRMC2 pode ser regulado positivamente pelo receptor de estrogênio α e pela progesterona em câncer de mama, porém, pouco se sabe acerca da influência deste gene em leiomiomas uterinos (PRU; CLARK, 2013; WENDLER; WEHLING, 2013). Apesar de expresso em tumores, a função de PGRMC2 parece estar relacionada com a supressão tumoral por meio da inibição de migração celular nestes casos (WENDLER; WEHLING, 2013). Além disso, é demonstrado que, assim como PGRMC1, esta proteína parece se ligar a membros da família de CYP450, sendo que esta relação é estável e parece estar relacionado à inibição destes membros de CYP450 (ALBRECHT et al., 2012; KLEIN et al., 2012; WENDLER; WEHLING, 2013).

Pouco se sabe acerca de quais influências estes receptores podem desempenhar sobre o crescimento de leiomiomas uterinos porém sabe-se que a progesterona é responsável pela manutenção do tumor (ISHIKAWA et al., 2010; PRU; CLARK, 2013). O estrogênio tem sido descrito como responsável pelo início do processo tumoral e a atuação conjunta destes dois hormônios parece desempenhar um papel fundamental na manutenção tumoral (ISHIKAWA et al., 2010; KIM; SEFTON, 2012). É necessário um melhor entendimento acerca dos mecanismos capazes de influenciar o crescimento tumoral pois só assim será possível o desenvolvimento de fármacos efetivos para o tratamento, possibilitando a preservação do útero de mulheres ainda em idade reprodutiva (CHILL et al., 2017; KHAN; SHEHMAR; GUPTA, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Os leiomiomas uterinos são tumores benignos que se desenvolvem no sistema genital feminino originando-se das células musculares lisas do miométrio e possuindo como característica principal o crescimento acelerado. Atingem uma grande parcela da população feminina e são indicação frequente de histerectomia. Atualmente nos Estados Unidos, são realizados anualmente cerca de 600 mil histerectomias, sendo 40% relacionadas com os leiomiomas uterinos, resultando em um gasto de aproximadamente 2 bilhões de dólares anuais, tornando esta doença um grande problema de saúde pública. Os mecanismos moleculares da patogênese dos leiomiomas uterinos ainda não estão completamente elucidados. É controverso se a ação dos esteroides sexuais inicia essa afecção ou se apenas promove o seu crescimento, que seria iniciado por outros processos, como por exemplo, mecanismos epigenéticos. Além disso, o crescimento dos leiomiomas uterinos é o resultado dinâmico entre a proliferação, a diferenciação e alteração dos mecanismos que promovem a morte celular. A compreensão acerca dos mecanismos moleculares que contribuem para o desenvolvimento desses tumores se torna necessária para que novas terapias venham a ser desenvolvidas com o intuito de melhorar a qualidade de vida das pacientes diagnosticadas com esta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo avaliar a expressão dos genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 – receptores de progesterona – em amostras de tecido de leiomiomas uterino e miométrio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 em amostras de tecido de leiomiomas uterino e miométrio.

- Comparar a expressão dos genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 entre amostras de tecido de leiomiomas uterino e miométrio.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Com intenção de publicação no periódico “GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY”, este artigo está formatado nos moldes exigidos pela revista (normas no anexo A).

Avaliação da expressão dos genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 em leiomiomas uterinos

Ana Paula de Bortoli Silveira^{1,*}, Gabriela dos Santos Sant'Anna¹ e Ilma Simoni Brum¹

¹Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – Departamento de Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande – Porto Alegre, Brasil.

* Autor correspondente: Ana Paula de Bortoli Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500.

CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS.

E-mail address: anapaulabstk@gmail.com

Tel: +55 51 3308-3559

Abstract

Uterine leiomyomas or fibroids are benign tumors that develop in the myometrium and involve a considerable portion of the female population, being a recurrent recommendation for hysterectomy. They have as main symptoms associated with excessive bleeding and nonspecific pelvic pain. Progesterone appears to play an important role in tumor proliferation, through its binding to specific nuclear receptors. In addition to the nuclear receptors, this hormone also has receptors on the cell membranes, responsible for the non-genomic functions of the hormone. However, there are few studies that evaluate the role of these receptors in the development of diseases. About 600,000 hysterectomies are carried out in the United States each year, with extremely high costs. Faced with these data, it is essential to understand the molecular mechanisms involved in tumor development and the search for less invasive treatments. The aim of this study is therefore to evaluate the mRNA expression of progesterone receptors PRT, PGRMC1 and PGRMC2 and to verify if its expression is higher in uterine leiomyomas when compared to the myometrium. In order to perform the study, we selected 25 patients with uterine leiomyomas submitted to abdominal hysterectomy by the Gynecology and Obstetrics Service in the surgical block of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Evaluation of the mRNA expression of these receptors was performed by the RT-qPCR technique. According to the results, the PRT, PGRMC1 and PGRMC2 genes were found expressed in both tissues, without presenting significant statistical differences among them, considering *P* values of 0.699; 0.505 and 0.293 respectively. As far as we know, this is the first time that was demonstrated de gene expression of progesterone membrane receptors in leiomyoma and myometrium. Although its gene expression does not present alterations, it is possible that there are alterations in the protein expression of these receptors, making necessary the accomplishment of further studies for a better understanding of the exact function that these genes play on the tumor proliferation.

Keywords: Progesterone. Uterine leiomyoma. Progesterone receptor. Membrane receptor.

Introdução

Leiomiomas uterinos são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio e se caracterizam pelo aumento de matriz extracelular rica em colágeno, proteoglicanos e fibronectina. O útero pode apresentar diversos desses tumores, o que usualmente acarreta no aumento do tamanho do órgão [1,2]. Existem diversos fatores capazes de contribuir para o crescimento tumoral, como fatores ambientais, hormonais, genéticos e epigenéticos [3–7].

Os sintomas mais comuns presentes nessa doença são dores pélvicas e sangramentos irregulares, que podem gerar quadros graves de anemia [1]. Além dos sintomas preocupantes, a incidência desses tumores é bastante alta, atingindo principalmente mulheres em idade reprodutiva [8]. Atualmente, a forma mais efetiva de tratamento é a histerectomia, que consiste na remoção total do útero das pacientes. Outros métodos de tratamento podem ser utilizados porém, na maioria das vezes ocorre a recidiva da doença [9,10]. A cada ano, são realizadas cerca de 600 mil histerectomias nos EUA, gerando custos de cerca de 2 bilhões de dólares a cada ano e tornando esta doença um problema de saúde pública [11].

Evidências sugerem que mecanismos moleculares possuem um papel importante no desenvolvimento de leiomiomas uterinos [12]. Dentre estes mecanismos, podemos citar mutações gênicas; translocações cromossômicas; alterações hormonais e alterações em mecanismos epigenéticos [3]. Hormônios esteroides como a progesterona são descritos como fortes influências neste desenvolvimento [13]. Sua ação pode ocorrer por duas vias: pela ligação a receptores nucleares (receptor de progesterona – PR) que posteriormente formam um complexo hormônio-receptor (HR) capaz de causar alterações na transcrição gênica – via clássica – e pela ligação a receptores de membrana (PGRMC 1 e 2) que sofrem modificações estruturais e resultam na transmissão de sinais intracelulares – via não clássica [14–17]. O objetivo deste estudo é avaliar a expressão de mRNA de PRT (receptor de progesterona total), PGRMC1 e PGRMC2 em leiomiomas uterinos a fim de entender melhor o desenvolvimento destes tumores.

Materiais e Métodos

Critérios de inclusão e exclusão

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo software WinPepi (JH Abramson, 2004), utilizando dados de estudos prévios deste grupo de pesquisa. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05. Foram utilizadas 25 pacientes por grupo, chegando a um poder estatístico de 68,85% considerando a diferença entre as médias de 0,8 unidades arbitrárias. As pacientes selecionadas possuíam diagnóstico de leiomioma uterino, em fase pré-menopausa (média de idade de 43 anos). Pacientes que realizavam quimioterapia ou possuíam diagnóstico de neoplasia concomitante foram excluídas do estudo. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de pacientes submetidas a histerectomia abdominal no Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA das amostras foi realizada utilizando o método do Trizol®, de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®, EUA), a partir 1µl de solução total de RNA. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando uma concentração de 2µg de RNA total, com o kit comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific®, EUA) seguindo protocolo do fabricante.

Desenho dos primers para expressão gênica

Os primers utilizados para a avaliação da expressão gênica de PRT, PGRMC1 e PGRMC2 estão contidos na Tabela 1.

Expressão gênica de PRT, PGRMC1 e PGRMC2

A análise de expressão gênica foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR) utilizando o kit comercial Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen™). As amostras foram amplificadas pelo aparelho Real Time 7500 Fast (Applied Biosystems) com um volume total de 12,5 µl por reação, sendo 7,5 µl de SYBR Green Master Mix, 0,2 µl de primer forward e reverse, 3,85 µl de H₂O com DEPC e 1 µl de amostra para os genes PRT, PGRMC1, PGRMC2 e β2-microglobulina (β₂m) – utilizado como controle endógeno. A amplificação das amostras foi realizada em duplicata em placas de 96 poços. As condições da reação foram: desnaturação a 95° C – 2 minutos, 40 ciclos de 95° C – 30 segundos e 60° C – 3 minutos, 95° C – 10 segundos; 60° C – 1 minuto; 95° C – 15 segundos e 60° C – 15 segundos.

Análise Estatística

Foi verificada a normalidade das amostras pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados seguiam a distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico análise de variância de uma via (ANOVA). Já para dados que não seguiam a distribuição normal foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS23.

Resultados

Para a análise da expressão dos genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2, o cDNA das amostras de tecido foi submetido a quantificação por RT-qPCR. Os dados de expressão gênica de PRT não apresentaram distribuição normal, utilizando teste não-paramétrico e representados como [mediana (percentil 25-75)]. Já os dados de PGRMC 1 e 2 apresentaram distribuição normal, utilizando teste paramétrico, representados como [média ± desvio padrão].

A expressão gênica de PRT no grupo leiomioma uterino foi de 0,64 (0,38-1,09) e no grupo miométrio foi de 1,19 (0,33-1,26), não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($P=0,669$). No caso de PGRMC1, a expressão gênica no grupo leiomioma uterino foi de $1,33 \pm 1,09$ e no grupo miométrio foi de $1,58 \pm 1,2$, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos ($P=0,505$). Já a expressão de PGRMC2 foi de $0,93 \pm 0,68$ no grupo leiomioma uterino e $1,21 \pm 0,88$ no grupo miométrio, sem apresentar diferenças estatísticas entre os grupos ($P=0,293$) (Tabela II). As figuras 1, 2 e 3 representam graficamente os resultados da expressão dos genes nos grupos leiomioma uterino e miométrio.

Discussão

Leiomiomas uterinos são tumores que se desenvolvem na presença dos hormônios esteroides estrogênio e progesterona [18,19]. O crescimento tumoral é regulado por diversas vias de sinalização celular ainda não elucidadas completamente onde há um aumento da matriz extracelular presente no tecido, aumentando o tamanho da lesão e acarretando em uma série de sintomas que afetam a qualidade de vida de mulheres nesta situação [1,2]. A utilização de tratamentos medicamentosos não parece ser uma alternativa efetiva uma vez que têm sido comum a recidiva da doença nestes casos [10]. Além dos medicamentos não apresentarem resultados satisfatórios, o fato de o mecanismo de desenvolvimento da doença não estar totalmente estabelecido dificulta ainda mais esta estratégia de tratamento [3].

O presente estudo avalia a expressão gênica de três receptores de progesterona que possuem localização e função diferente – PRT, PGRMC1 e PGRMC2. A participação da via clássica de ação da progesterona no crescimento tumoral é estudada em todo o mundo e a literatura mostra que, quando em complexo com seus receptores nucleares específicos, este hormônio é capaz de modular a proliferação e manutenção celular em leiomiomas uterinos [20,21]. Já os receptores de progesterona de membrana – PGRMC1 e PGRMC2 – parecem ter um papel controverso neste desenvolvimento e poucos são os estudos que abordam a relação deles no tecido uterino [17].

De acordo com os resultados obtidos, a expressão gênica de PRT, PGRMC1 e PGRMC2 não apresentou diferenças significativas entre os grupos, correspondendo a valores de P de 0,669; 0,505 e 0,293, respectivamente. Tendo em vista que o estudo avaliou apenas a expressão gênica destes receptores de progesterona e, mesmo com a expressão normal do gene, é possível que sua síntese proteica se apresente alterada. Além disso, existe a possibilidade de que estes complexos participem de diferentes vias de sinalização, indicando a possibilidade de sua influência sobre outras vias intranucleares de regulação transcricional.

É descrito na literatura que o complexo de PRT com a progesterona é capaz de se ligar a elementos responsivos em regiões promotoras de outros genes relacionados a inibição da apoptose e senescência celular, como por exemplo em Bcl2 e p21 [22,23]. Atuando na ativação de Bcl2, o complexo pode participar da promoção da tumorigênese, uma vez que Bcl2 é classificado como um oncogene inibidor de morte celular [24,25]. Estudos indicam que Bcl2 encontra-se desregulada em diversos tumores, como os leiomiomas uterinos, relacionando este desequilíbrio ao estresse oxidativo presente no crescimento tumoral [24,26]. Assim como Bcl2, p21 parece atuar sobre a progressão tumoral a partir do aumento de migração, crescimento e metástase em resposta a estímulos hormonais em outros tipos de câncer [22,27]. A interação destes genes com PRT, portanto, poderia influenciar o crescimento tumoral em leiomiomas uterinos.

Até o presente momento, não encontramos nenhum estudo na literatura que avalie a presença e a influência que PGRMC1 e PGRMC2 poderiam exercer sobre o miométrio e quais suas possíveis influências no desenvolvimento de leiomiomas uterinos. Evidências sugerem sua forte influência durante as fases do ciclo menstrual, principalmente sobre o desenvolvimento de células da granulosa [28]. Pru *et al* (2013) destacam a participação destes receptores sobre a fisiologia uterina. O estudo evidencia a ação de PGRMC 1 e 2 na manutenção da função reprodutiva, além de seu envolvimento na manifestação de doenças no sistema genital quando sua expressão se encontra desregulada (PRU; CLARK, 2013). Estes dados destacam a possível importância destes receptores no desenvolvimento tumoral no sistema, porém se faz necessária

a avaliação minuciosa de sua participação nas vias relacionadas ao crescimento de leiomiomas uterinos.

Cahill *et al* (2019) destacam a importância de PGRMC1 no desenvolvimento de vários tipos de câncer, principalmente através de sua ligação ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). A participação deste complexo na sinalização celular do câncer tem relação com a fosforilação das vias de sinalização AKT e ERK, importantes na manutenção do ciclo celular. Além disso, PGRMC1 – assim como PRT – parece ser dependente de ER α . O receptor de estrogênio α parece ser responsável pelo aumento da expressão proteica bem como a mobilização destes receptores para que então a progesterona possa realizar a ativação do complexo HR e desencadear sinalizações intracelulares [21,29].

PGRMC2 ainda é pouco caracterizado e possui poucos estudos relacionando sua função ao sistema genital feminino. Wendler *et al* (2013) descrevem seu papel na diminuição da migração celular e possível inibição de metástase. O trabalho de revisão ainda destaca o possível papel supressor desta proteína em casos de adenocarcinoma de útero e sua relação com a progesterona. Este estudo evidencia a relação da ação não-genômica da progesterona com o surgimento de doenças, demonstrando que a diminuição da proteína PGRMC2 pode atenuar ações do hormônio e promover doenças como a endometriose [30].

Atualmente sabe-se que a expressão de PRT é influenciada pelo receptor de estrogênio. Estudos tem destacado a influência que este receptor parece exercer sobre a expressão de PGRMC1, indicando uma possível relação entre PRT e PGRMC1 na manutenção de leiomiomas uterinos [21,29]. Além disso, é possível que o papel de PGRMC2 se relacione com a delimitação da área tumoral, influenciando o processo de migração celular e o perfil de benignidade de leiomiomas uterinos [30]. Com base nos resultados obtidos, é importante destacar que mais estudos são necessários a fim de caracterizar o papel desses receptores no desenvolvimento de leiomiomas uterinos e a avaliação da expressão proteica é necessária para a compreensão de sua influência na patogênese da doença.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu auxílio do Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflito de interesse

Todos os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

- [1] Stewart EA, Laughlin-Tommaso SK, Catherino WH, et al. Uterine fibroids. *Nat. Rev. Dis. Prim.* [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 18];2:16043.
- [2] Khan AT, Shehmar M, Gupta JK. Uterine fibroids: current perspectives. *Int. J. Womens. Health* [Internet]. 2014 [cited 2018 Mar 12];6:95–114.
- [3] Dvorská D, Braný D, Danková Z, et al. Molecular and clinical attributes of uterine leiomyomas. *Tumor Biol.* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 15];39:101042831771022.
- [4] Foley DL, Craig JM, Morley R, et al. Prospects for Epigenetic Epidemiology. *Am. J. Epidemiol.* [Internet]. 2008 [cited 2018 Mar 12];169:389–400.
- [5] Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* [Internet]. 2011 [cited 2018 Mar 12];3:503–518.
- [6] Irimie A, Ciocan C, Gulei D, et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 14];19:670.

- [7] Dagur G, Suh Y, Warren K, et al. Urological complications of uterine leiomyoma: a review of literature. *Int. Urol. Nephrol.* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 8];48:941–948.
- [8] Stewart E, Cookson C, Gandolfo R, et al. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 12];124:1501–1512.
- [9] Von Eye Corleta H, Beatriz E, Chaves M, et al. Tratamento atual dos miomas. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007 [cited 2018 Mar 12];
- [10] Kim JJ, Sefton EC. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* [Internet]. 2012 [cited 2019 Apr 9];358:223–231.
- [11] Navarro A, Yin P, Monsivais D, et al. Genome-Wide DNA Methylation Indicates Silencing of Tumor Suppressor Genes in Uterine Leiomyoma. Palit Deb S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2018 Feb 27];7:e33284.
- [12] Yang Q, Mas A, Diamond MP, et al. The Mechanism and Function of Epigenetics in Uterine Leiomyoma Development. *Reprod. Sci.* [Internet]. 2016 [cited 2018 Mar 15];23:163–175.
- [13] Patel B, Elguero S, Thakore S, et al. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum. Reprod. Update* [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 9];21:155–173.
- [14] Conneely OM, Lydon JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* [Internet]. 2000 [cited 2018 Mar 8];65:571–577.
- [15] Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J. Mol. Biol.* [Internet]. 2016 [cited 2018 Mar 8];428:3831–3849.
- [16] Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, et al. Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2002 [cited 2018 Mar 8];277:5209–5218.
- [17] Pru JK, Clark NC. PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. *Front. Neurosci.* [Internet]. 2013 [cited 2019 Jun 3];7:168.

- [18] Lee E -j., Kong G, Lee S -h., et al. Profiling of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas. *Int. J. Gynecol. Cancer* [Internet]. 2005 [cited 2018 Mar 12];15:146–154.
- [19] Lora V, Grings AO, Capp E, et al. Gene and protein expression of progesterone receptor isoforms A and B, p53 and p21 in myometrium and uterine leiomyoma. *Arch. Gynecol. Obstet.* [Internet]. 2012 [cited 2018 Mar 12];286:119–124.
- [20] Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A, et al. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review [Internet]. *Royan Inst. Int. J. Fertil. Steril.* 2016 [cited 2018 Dec 18].
- [21] Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, et al. Progesterone Is Essential for Maintenance and Growth of Uterine Leiomyoma. *Endocrinology* [Internet]. 2010 [cited 2019 Apr 9];151:2433.
- [22] Owen GI, Richer JK, Tung L, et al. Progesterone Regulates Transcription of the p21 WAF1 Cyclindependent Kinase Inhibitor Gene through Sp1 and CBP/p300. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 1998 [cited 2019 Apr 16];273:10696–10701.
- [23] Yin P, Lin Z, Cheng Y-H, et al. Progesterone Receptor Regulates Bcl-2 Gene Expression through Direct Binding to Its Promoter Region in Uterine Leiomyoma Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [Internet]. 2007 [cited 2019 Apr 12];92:4459–4466.
- [24] Delbridge ARD, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 23];16:99–109.
- [25] Derossi DR, Ito K, Oliveira JD', et al. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes Bcl-2 protein expression evaluation in breast cancer: study on fine needle [Internet]. 2003 [cited 2019 Apr 23].
- [26] Vidimar V, Chakravarti D, Bulun SE, et al. The AKT/BCL-2 Axis Mediates Survival of Uterine Leiomyoma in a Novel 3D Spheroid Model. *Endocrinology* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 16];159:1453–1462.
- [27] Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumourigenesis. *Curr. Opin. Oncol.* [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 24];25:52–58.

- [28] Peluso JJ, Griffin D, Liu X, et al. Progesterone Receptor Membrane Component-1 (PGRMC1) and PGRMC-2 Interact to Suppress Entry into the Cell Cycle in Spontaneously Immortalized Rat Granulosa Cells1. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 3];91:104.
- [29] Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, et al. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 3];1866:339–349.
- [30] Wendler A, Wehling M. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids* [Internet]. 2013 [cited 2019 Jun 4];78:555–558.

Tabelas

Tabela I. Sequências de primers utilizados no estudo.

Gene	Sequência 5' 3'
PRT	
Forward	ACCCGCCCTATCTCAACTACC
Reverse	AGGACACCATAATGACAGCCT
PGRMC1	
Forward	GGATTAAGCGCTGTCCAGTAA
Reverse	TGAGGGTGTCTGAGTGTCTAT
PGRMC2	
Forward	AGTCTTCGACGTGACCAAAG
Reverse	GGCATCCCTACCAGCAAATA
β2m	
Forward	CTATCCAGCGTACTCCAAAG
Reverse	ACAAGTCTGAATGCTCCACT

Tabela II. Resultado da expressão gênica de PRT, PGRMC1 e PGRMC2.

	Leiomioma Uterino	Miométrio	<i>P</i>
PRT	0,64 (0,38-1,09)	1,19 (0,33-1,26)	0,669
PGRMC1	1,33 ±1,09	1,58 ±1,2	0,505
PGRMC2	0,93 ±0,68	1,21 ±0,88	0,293

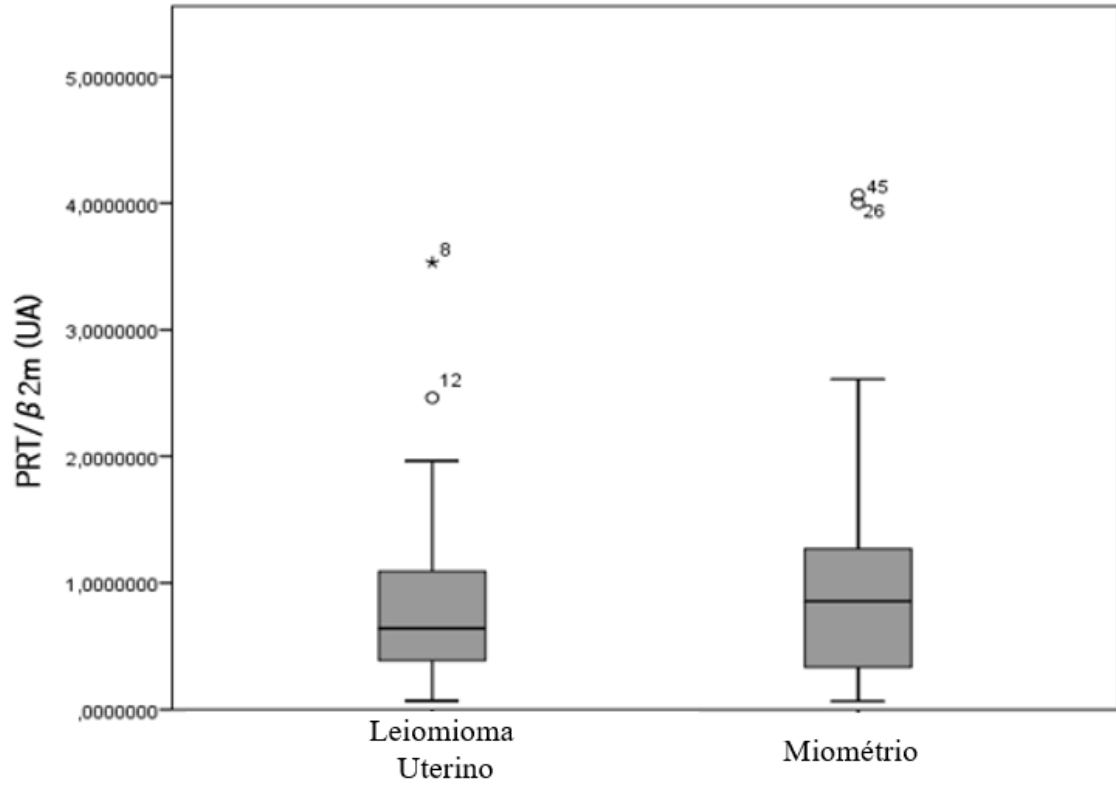
Figuras

Figura 1. Representação gráfica da expressão de PRT nos grupos leiomioma uterino e miométrio. Teste de Mann-Whitney, dados representados como mediana e percentil (25-75). $P=0,669$.

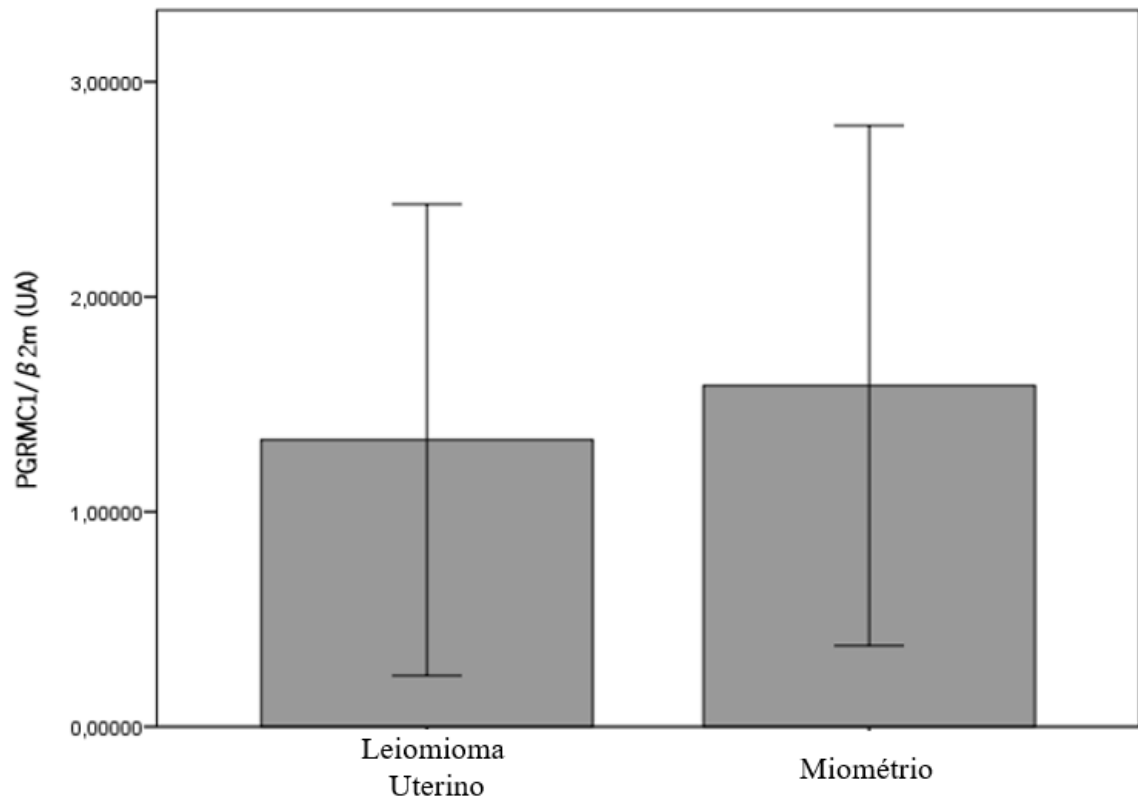


Figura 2. Representação gráfica da expressão de PGRMC1 nos grupos leiomioma uterino e miométrio. Teste ANOVA, dados representados como média \pm DP. $P=0,505$.

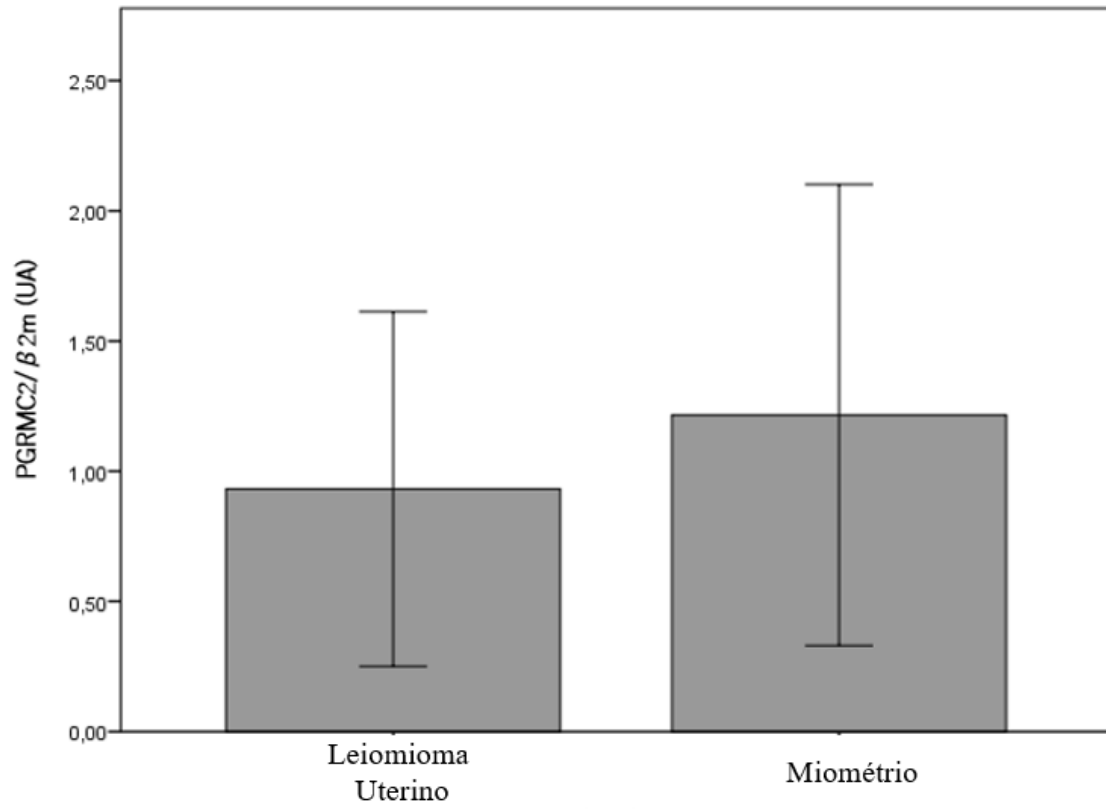


Figura 3. Representação gráfica da expressão de PGRMC2 nos grupos leiomioma uterino e miométrio. Teste ANOVA, dados representados como média \pm DP. $P=0,293$.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do estudo, é possível identificar a presença dos genes PRT, PGRMC1 e PGRMC2 em amostras de leiomiomas uterinos. Na amostra avaliada, não foi possível detectar diferenças significativas na expressão dos diferentes genes que codificam os receptores de progesterona entre os diferentes tecidos. Este estudo demonstra pela primeira vez, a expressão do mRNA dos receptores de membrana para a progesterona em leiomioma e miométrio normal, o que traz uma contribuição importante para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na formação do tumor.

A limitação do tamanho da amostra não nos permite afirmar de forma conclusiva que não exista diferença na expressão destes genes, é possível ainda que a tradução destes genes em proteína esteja alterada. Neste caso, é necessária a realização de novas análises com o intuito de ampliar a amostra e de avaliar a expressão proteica destes receptores. Além disso, é importante avaliar quais outros mecanismos podem estar associados ao desenvolvimento desta doença, como a ação de oncogenes e desequilíbrio em mecanismos epigenéticos.

A análise de vias intracelulares possivelmente ativadas pelos receptores de progesterona de membrana é uma perspectiva importante para uma melhor compreensão acerca dos processos que contribuem para o desenvolvimento do leiomioma. O entendimento destes mecanismos pode ser uma boa alternativa para a obtenção de respostas para o tratamento destes tumores na tentativa de evitar a histerectomia, a qual configura um tratamento extremamente invasivo e por vezes causando morbidade para as pacientes.

REFERÊNCIAS

- AIRES, Margarida de Mello. **Fisiologia**. 4ª Edição ed. [s.l: s.n.], 2012.
- ALBRECHT, Christian et al. In vitro inhibition of SKOV-3 cell migration as a distinctive feature of progesterone receptor membrane component type 2 versus type 1. **Steroids**, [s. l.], v. 77, n. 14, p. 1543–1550, 2012.
- CAHILL, Michael A. et al. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1866, n. 2, p. 339–349, 2016.
- CHILL, H. H. et al. The Rising Phoenix-Progesterone as the Main Target of the Medical Therapy for Leiomyoma. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, p. 8, 2017.
- CONNELLY, O. M.; LYDON, J. P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. **Steroids**, [s. l.], v. 65, n. 10–11, p. 571–7, 2000.
- DAGUR, Gautam et al. Urological complications of uterine leiomyoma: a review of literature. **International Urology and Nephrology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 941–948, 2016.
- DELBRIDGE, Alex R. D. et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 99–109, 2016.
- DEROSSI, Daniela Rudgeri et al. **Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes Bcl-2 protein expression evaluation in breast cancer: study on fine needle** . [s.l: s.n.], 2003.
- DVORSKÁ, Dana et al. Molecular and clinical attributes of uterine leiomyomas. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 101042831771022, 2017.
- FIEBITZ, A. et al. Optimized culture conditions for tissue explants of uterine leiomyoma. **Clinical laboratory**, [s. l.], v. 58, n. 11–12, p. 1153–64, 2012.
- FLAKE, Gordon P.; ANDERSEN, Janet; DIXON, Darlene. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 1037, 2003.
- FOLEY, D. L. et al. Prospects for Epigenetic Epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 169, n. 4, p. 389–400, 2008.
- GRAHAM, J. Dinny; CLARKE, Christine L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues ¹. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 502–519, 1997.
- GRIMM, Sandra L.; HARTIG, Sean M.; EDWARDS, Dean P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 19, p. 3831–3849, 2016.
- HARDY, Tabitha M.; TOLLEFSBOL, Trygve O. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. **Epigenomics**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 503–518, 2011.

IRIMIE, Alexandra et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 670, 2018.

ISHIKAWA, Hiroshi et al. Progesterone Is Essential for Maintenance and Growth of Uterine Leiomyoma. **Endocrinology**, [s. l.], v. 151, n. 6, p. 2433, 2010.

KASTNER, P. et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1603–14, 1990.

KHAN, Aamir T.; SHEHMAR, Manjeet; GUPTA, Janesh K. Uterine fibroids: current perspectives. **International journal of women's health**, [s. l.], v. 6, p. 95–114, 2014.

KIM, J. Julie; SEFTON, Elizabeth C. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. l.], v. 358, n. 2, p. 223–31, 2012.

KIM, J. Julie; SEFTON, Elizabeth C. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 358, n. 2, p. 223–231, 2012.

KLEIN, Kathrin et al. PPARA: A Novel Genetic Determinant of CYP3A4 In Vitro and In Vivo. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 1044–1052, 2012.

KOWALIK, Magdalena K.; REKAWIECKI, Robert; KOTWICA, Jan. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. **Reproductive Biology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 279–289, 2013.

KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; ASTER, Jon C. **Robbins patologia básica**. 2013.

LEE, E. -j. et al. Profiling of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas. **International Journal of Gynecological Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 146–154, 2005.

LORA, Vanessa et al. Gene and protein expression of progesterone receptor isoforms A and B, p53 and p21 in myometrium and uterine leiomyoma. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 286, n. 1, p. 119–124, 2012.

LUMSDEN, Mary Ann. Fibroids: diagnosis and management. **The BMJ**, [s. l.], v. 351, 2015.

MCWILLIAMS, Michelle M.; CHENNATHUKUZHI, Vargheese M. Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. [s. l.], 2017.

MOORE, Keith L. **Moore - Anatomia orientada para a clínica — bibicbs**. 6^a ed. [s.l: s.n.], 2014.

MOTE, P. A. et al. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. **Journal of clinical pathology**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 624–30, 2001.

NAVARRO, Antonia et al. Genome-Wide DNA Methylation Indicates Silencing of Tumor Suppressor Genes in Uterine Leiomyoma. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33284, 2012.

OWEN, Gareth I. et al. Progesterone Regulates Transcription of the p21 WAF1 Cyclindependent Kinase Inhibitor Gene through Sp1 and CBP/p300. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 17, p. 10696–10701, 1998.

PATEL, Bansari et al. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. **Human reproduction update**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 155–73, 2015.

PELUSO, John J. et al. Progesterone Receptor Membrane Component-1 (PGRMC1) and PGRMC-2 Interact to Suppress Entry into the Cell Cycle in Spontaneously Immortalized Rat Granulosa Cells1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 91, n. 5, p. 104, 2014.

PELUSO, John J.; LODDE, Valentina; LIU, Xiufang. Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 153, n. 8, p. 3929–39, 2012.

PRU, James K.; CLARK, Nicole C. PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 7, p. 168, 2013.

RICHER, Jennifer K. et al. Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 7, p. 5209–5218, 2002.

ROTH, Ted M.; KLETT, Christoph; COWAN, Bryan D. Expression profile of several genes in human myometrium and uterine leiomyoma. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 635–641, 2007.

SABRY, Mohamed; AL-HENDY, Ayman. Innovative oral treatments of uterine leiomyoma. **Obstetrics and gynecology international**, [s. l.], v. 2012, p. 943635, 2012.

SCHUCHARD, MARK et al. Steroid Hormone Regulation of Nuclear Proto-oncogenes*. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 659–669, 1993.

SEGARS, James H. et al. Proceedings from the Third National Institutes of Health International Congress on Advances in Uterine Leiomyoma Research: comprehensive review, conference summary and future recommendations. **Human reproduction update**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 309–33, 2014.

SPARIC, Radmila et al. **Epidemiology of Uterine Myomas: A Review** **Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility**. [s.l: s.n.], 2016.

STEWART, EA et al. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 124, n. 10, p. 1501–1512, 2017.

STEWART, Elizabeth A. Uterine fibroids. **The Lancet**, [s. l.], v. 357, n. 9252, p. 293–298, 2001.

STEWART, Elizabeth A. et al. Uterine fibroids. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, p. 16043, 2016

STYER, Aaron K.; RUEDA, Bo R. The Epidemiology and Genetics of Uterine Leiomyoma.

Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, [s. l.], v. 34, p. 3–12, 2016.

VALADEZ-COSMES, Paulina et al. Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 434, p. 166–175, 2016.

VIDIMAR, Vania et al. The AKT/BCL-2 Axis Mediates Survival of Uterine Leiomyoma in a Novel 3D Spheroid Model. **Endocrinology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 1453–1462, 2018.

VINES, Anissa I.; TA, Myduc; ESSERMAN, Denise A. The association between self-reported major life events and the presence of uterine fibroids. **Women's health issues : official publication of the Jacobs Institute of Women's Health**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 294–8, 2010.

VON EYE CORLETA, Helena et al. Tratamento atual dos miomas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** [s. l.], 2007.

WARFEL, Noel A.; EL-DEIRY, Wafik S. p21WAF1 and tumorigenesis. **Current Opinion in Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 52–58, 2013.

WENDLER, Alexandra; WEHLING, Martin. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. **Steroids**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 555–558, 2013.

What Is Normal Size of Uterus? 2019. Disponível em: <<https://www.md-health.com/uterus-size.html>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

YANG, Qiwei et al. The Mechanism and Function of Epigenetics in Uterine Leiomyoma Development. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 163–175, 2016.

YIN, Ping et al. Progesterone Receptor Regulates Bcl-2 Gene Expression through Direct Binding to Its Promoter Region in Uterine Leiomyoma Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 4459–4466, 2007.

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 93970518.0.0000.5327

Título do Projeto: **Análise de metilação gene específico do receptor de progesterona total em leiomiomas uterinos.**

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa, devido ao seu diagnóstico de mioma e com indicação assistencial de realizar procedimento cirúrgico. O objetivo da nossa pesquisa é identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento dos leiomiomas uterinos, popularmente conhecidos como miomas. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: coleta de um pequeno fragmento do mioma e tecido adjacente após o término da cirurgia, consulta ao prontuário para verificação de idade e exames.

Em relação à coleta de material biológico, não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, visto que o material coletado será após a cirurgia não havendo interferência em relação a paciente.

Os possíveis benefícios decorrentes da sua participação na pesquisa não serão diretos, mas possibilitará um melhor entendimento da formação desses tumores e a busca por uma nova forma de tratamento que não necessite de cirurgia.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Poderemos armazenar as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Concordo Discordo

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra Helena von Eye Corleta pelo telefone 33598285, com o pesquisador Gabriela dos Santos Sant'Anna pelo telefone 33083559 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

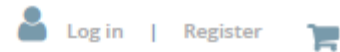
Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o TCLE

Assinatura

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY



Journal

Gynecological Endocrinology >

This journal

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

AUTHORSERVICES

Supporting Taylor & Francis authors

SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Contents

- [About the Journal](#)
- [Peer Review](#)
- [Preparing Your Paper](#)
 - [Structure](#)
 - [Word Limits](#)
 - [Style Guidelines](#)
 - [Formatting and Templates](#)
 - [References](#)
 - [Editing Services](#)

- Checklist
- Using Third-Party Material
- Disclosure Statement
- Clinical Trials Registry
- Complying With Ethics of Experimentation
- Consent
- Health and Safety
- Submitting Your Paper
- Data Sharing Policy
- Publication Charges
- Copyright Options
- Complying with Funding Agencies
- Open Access
- Accepted Manuscripts Online
- My Authored Works
- Reprints

About the Journal

Gynecological Endocrinology is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Gynecological Endocrinology accepts the following types of article: original articles, review articles, case reports, position statements.

A typical paper for this journal should not exceed 2000 words; not inclusive of references, a maximum of 3 figures and/or tables and up to 30 references. A typical review articles for this journal should not exceed 3000 words' not inclusive of references, a maximum of 3 figures and/or tables and up to 70 references.

Peer Review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees.

Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper.

A typical paper for this journal should be no more than 2000 words, inclusive of the abstract, footnotes, endnotes.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where 'a quotation is "within" a quotation'. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide [formatting template\(s\)](#).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, visit this [website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain an unstructured abstract of 200 words.

3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.
5. Between 5 and 8 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details**. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
7. **Disclosure statement**. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
8. **Data availability statement**. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
9. **Data deposition**. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
10. **Geolocation information**. Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information](#).
11. **Supplemental online material**. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

12. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, GIF, or Microsoft Word (DOC or DOCX). For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
13. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
14. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
15. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Taylor & Francis quick layout guide

These general article layout guidelines will help you to format your manuscript so that it is ready for you to submit it to a Taylor & Francis journal. Please also follow any specific [Instructions for Authors](#) provided by the Editor of the journal, which are available on the journal pages at www.tandfonline.com. Please also see our guidance on [putting your article together](#), [defining authorship](#) and [anonymizing your article](#) for peer review.

We recommend that you use our [templates](#) to prepare your article, but if you prefer not to use templates this guide will help you prepare your article for review.

If your article is accepted for publication, the manuscript will be formatted and typeset in the correct style for the journal.

ARTICLE LAYOUT GUIDE

Font: Times New Roman, 12-point, double-line spaced. Use margins of at least 2.5 cm (or 1 inch). Guidance on how to insert special characters, accents and diacritics is available [here](#).

Title: Use bold for your article title, with an initial capital letter for any proper nouns.

Abstract: Indicate the abstract paragraph with a heading or by reducing the font size. Check whether the journal requires a structured abstract or graphical abstract by reading the Instructions for Authors. The Instructions for Authors may also give word limits for your abstract. Advice on writing abstracts is available [here](#).

Keywords: Please provide keywords to help readers find your article. If the Instructions for Authors do not give a number of keywords to provide, please give five or six. Advice on selecting suitable keywords is available [here](#).

Headings: Please indicate the level of the section headings in your article:

1. First-level headings (e.g. Introduction, Conclusion) should be in bold, with an initial capital letter for any proper nouns.
2. Second-level headings should be in bold italics, with an initial capital letter for any proper nouns.
3. Third-level headings should be in italics, with an initial capital letter for any proper nouns.
4. Fourth-level headings should be in bold italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.
5. Fifth-level headings should be in italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.

Tables and figures: Indicate in the text where the tables and figures should appear, for example by inserting [Table 1 near here]. You should supply the actual tables either at the end of the text or in a separate file and the actual figures as separate files. You can find details of the journal Editor's preference in the Instructions for Authors or in the guidance on the submission system. Ensure you have permission to use any tables or figures you are reproducing from another source.

Please take notice of the advice on this site about [obtaining permission for third party material](#), [preparation of artwork](#), and [tables](#).

Running heads and **received dates** are not required when submitting a manuscript for review; they will be added during the production process.

Spelling and punctuation: Each journal will have a preference for spelling and punctuation, which is detailed in the Instructions for Authors. Please ensure whichever spelling and punctuation style you use, you apply consistently.

FORMAT-FREE SUBMISSION

An increasing number of Taylor & Francis journals allow [format-free submission](#), which means that, as long as your article is consistent and includes everything necessary for review, you can submit work without needing to worry about formatting your manuscript to meet that journal's requirements. The 'Instructions for authors' for your chosen journal will tell you whether it operates format-free submission.

IF YOU HAVE ANY QUERIES...

If you need further advice on your article layout, please [contact us](#) giving the full title of the journal you are planning to submit to.