

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DAS ISOFORMAS A E
B DO RECEPTOR DE PROGESTERONA, DE p53 E DE p21
EM MIOMÉTRIO E LEIOMIOMA UTERINO**

Vanessa Lora

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva
Co-Orientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

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

Porto Alegre, 23 de abril de 2010.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Ilma Simoni Brum da Silva, por aceitar a orientação e possibilitar o contato com a biologia molecular endócrina e tumoral, colaborando com minha formação profissional pelo seu exemplo. A minha co-orientadora, professora Helena von Eye Corleta, pela dedicação e amparo prestados, desde as coletas de material até as revisões textuais. Ao professor Edison Capp, pelo estímulo e sugestões.

Aos professores Maria Flávia Marques Ribeiro e Alex Sander Araújo, pelo incentivo, ensinamentos e conselhos, contribuindo para meu aprimoramento pessoal e profissional. A todos professores, e seus laboratórios e equipes, e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelos conhecimentos oferecidos e auxílio.

À amizade dos colegas de mestrado e laboratório Fernanda Seibel e Gustavo Dias Ferreira, pela motivação, por compartilhar experimentos e experiências, por ouvir, aconselhar e confiar sempre. Agradeço, especialmente, a parceira de experimentos e amiga Anelise Olmos Grings, pela valiosa ajuda e pelo companheirismo.

A Gisele Branchini, Lolita Schneider Pizzolato e Vanderlei Biolchi, pela amizade, por me ensinar técnicas de laboratório, dividir experiências e ajudar o meu amadurecimento como pesquisadora. Agradeço às sugestões e idéias e ao sempre prazeroso convívio diário que me foi proporcionado pelos amigos e companheiros do LaBiMET e do LaGOM: Ana Caroline Hillebrand, Ana Paula Santin, Aline Damo, Bruna Amorin, Tiahgo Fontanive, Tiago Ghesi, Aline Amaral, Patrícia Martiny, Vivian Giesel, Klaus von Eye, Anita Pimentel e Ana Luiza Ferrari.

Aos grandes colegas de mestrado, que, por estarmos nessa mesma fase da vida, compartilharam alegrias, angústias, frustrações e conquistas, e ajudaram com amizade, carinho, companhia, incentivo e apoio.

Aos amigos do laboratório 204 do Departamento de Farmacologia, chefiado pela professora Ionara Rodrigues Siqueira, pelos momentos agradáveis, pelo apoio e pela troca de idéias e experiências. Aos amigos do laboratório 35 do Instituto de Bioquímica, chefiado pelo professor Carlos Alexandre Netto, em especial, a Nice Arteni, a Fernanda Fontella e a Simone Weis, pelos valiosos conselhos e estímulo.

A meus generosos e maravilhosos pais, Terezinha e Geromi Lora, pelo exemplo e pela cumplicidade. Obrigada por acreditar em mim, amando e apoiando incondicionalmente e sempre.

A meus amados irmãos, Bruna e Matheus Lora, por compartilhar a vida e torná-la cada vez mais viva. A Cássio Bittencourt, Dona Anair Trindade Farias e Edu Farias Sanches, por todo o respeito e carinho que me dedicam.

A Eduardo Farias Sanches, por ser o estímulo da minha vida. Por acalmar, alegrar, compartilhar, ensinar, entender, ouvir, proteger, respeitar, zelar... Enfim, AMAR! Obrigada por estar ao meu lado em mais uma conquista.

A UFRGS, CNPq e HCPA, pelo auxílio técnico-estrutural e financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	02
LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
1. Útero e Leiomioma.....	12
2. Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides.....	17
3. Receptores de Progesterona.....	19
4. Ciclo Celular.....	22
5. p53.....	23
6. p21.....	25
Justificativa.....	27
OBJETIVO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1. Delineamento do Estudo.....	29
2. Pacientes.....	29
3. Procedimentos.....	30
4. Análise Estatística.....	43

RESULTADOS.....	44
1. Análise dos Níveis de mRNA dos Receptores de Progesterona.....	46
2. Análise dos Níveis de Proteína dos Receptores de Progesterona.....	49
3. Análise dos Níveis de mRNA do Gene <i>p53</i>	51
4. Análise dos Níveis de Proteína <i>p53</i>	52
5. Análise dos Níveis de mRNA do Gene <i>p21</i>	53
6. Análise dos Níveis de Proteína <i>p21</i>	54
7. Relação PRA:PRB.....	55
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	76
Anexo 1.....	77
Anexo 2.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A₂₆₀ – absorvância a 260 nm
AF – domínio de transativação
 β_2 -m – beta-2-microglobulina
BSA – albumina sérica bovina
Cdk2 – cinase dependente de ciclina 2
Cdk4 – cinase dependente de ciclina 4
Cdks – cinases dependentes de ciclinas
CKI – inibidores de Cdk
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
cm – centímetro
DBD – domínio de ligação ao DNA
DEPC – dietilpirocarbonato (*diethylpyrocarbonate*)
DIM – sequência para dimerização do receptor
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatados
DP – desvio padrão
DTT – ditioneitol
ECL – quimioluminescência enzimática
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ERE – elemento responsivo ao esteróide
EP – erro padrão
g – gravidade
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
h – hora
HCl – ácido clorídrico
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H-R – complexo hormônio-receptor
ID – domínio inibitório
IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina I (*insulin-like growth factor I*)
IMC – índice de massa corporal
KCl – cloreto de potássio
kDa – quilo-Dalton
Kg – quilograma
LBD – domínio de ligação ao ligante
M – molar
MgCl₂ – cloreto de magnésio
 μ g – micrograma

μL – microlitro
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
 $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ – pirofosfato decahidrato de sódio
 Na_3VO_4 – ortovanadato de sódio
NaCl – cloreto de sódio
NaF – fluoreto de sódio
NC – Nitrocelulose
nm – nanômetro
pb – pares de bases
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride
PR – receptor de progesterona
PRA – isoforma A do receptor de progesterona
PRAB – fragmento comum nas duas isoformas do receptor de progesterona
PRB – isoforma B do receptor de progesterona
RNA – ácido ribonucleico
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Tris- Hidroximetil aminometano
U – unidade
UA – unidades arbitrárias
V – volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, para amplificação de fragmentos de genes em estudo. *(Página 35)*

Tabela 2. Programas utilizados nas reações de RT-PCR, para amplificação dos genes em estudo. *(Página 35)*

Tabela 3. Anticorpos primários. *(Página 42)*

Tabela 4. Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes incluídas no estudo. *(Página 44)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis locais de crescimento de leiomiomas. *(Página 15)*

Figura 2. Mecanismo de ação genômica dos hormônios esteróides. *(Página 18)*

Figura 3. Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona humano. *(Página 20)*

Figura 4. Ciclo da divisão celular representando a ação de p53 sobre a transativação de p21. *(Página 26)*

Figura 5. Curva de ciclos para o gene *PRAB*. *(Página 36)*

Figura 6. Curva de ciclos para o gene *PRB*. *(Página 37)*

Figura 7. Curva de ciclos para o gene *p53*. *(Página 38)*

Figura 8. Curva de ciclos para o gene *p21*. *(Página 39)*

Figura 9. Expressão gênica de *PRAB* em miométrio e leiomioma. *(Página 47)*

Figura 10. Expressão gênica de *PRB* em miométrio e leiomioma. *(Página 48)*

Figura 11. Análise proteica de PRA e PRB em miométrio e leiomioma. *(Página 50)*

Figura 12. Expressão gênica de *p53* em miométrio e leiomioma. *(Página 51)*

Figura 13. Análise proteica de p53 em miométrio e leiomioma *(Página 52)*

Figura 14. Expressão gênica de *p21* em miométrio e leiomioma. *(Página 53)*

Figura 15. Análise proteica de p21 em miométrio e leiomioma. *(Página 54)*

Figura 16. Correlação da relação PRA:PRB de miométrio e leiomioma. *(Página 55)*

RESUMO

Os leiomiomas são neoplasias benignas comuns do sistema reprodutivo feminino e são encontrados em até 50% das mulheres em idade reprodutiva. As causas e os mecanismos de desenvolvimento desse tumor não estão bem estabelecidos; eventuais descontroles nos percursos apoptóticos e influências dos hormônios esteróides ovarianos devem estar envolvidos.

O objetivo deste trabalho foi examinar a expressão do gene e da proteína das isoformas A e B do receptor de progesterona, de p53 e de p21 em miométrio e leiomioma uterino. Foram obtidas amostras de 14 pacientes em idade reprodutiva que se submeteram à histerectomia abdominal por leiomiomatose.

Os tecidos foram submetidos à extração de mRNA com o uso de Trizol[®], para análise da expressão gênica pela técnica de RT-PCR, e à extração de proteínas, para análise de expressão proteica pela técnica de *Western Blot*. Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de mRNA para *PRAB*, *PRB* e nos níveis proteicos dos PRs entre o miométrio e o leiomioma uterino. Não houve correlação entre a fase do ciclo menstrual e os receptores de progesterona. A relação entre as isoformas (PRA:PRB) não foi diferente entre os tecidos e mostrou uma forte correlação entre ambos ($r=0,767$, $P=0,004$). As análises da expressão gênica e proteica mostraram aumento nos níveis de mRNA e de proteína de p53 no leiomioma comparado ao miométrio ($P=0,030$ e $P=0,002$, respectivamente). O mesmo aumento foi observado nos níveis de mRNA de p21 ($P=0,016$) e nos níveis proteicos de p21 ($P=0,026$) nas amostras de leiomioma uterino. As expressões gênica e proteica inalteradas dos PRs são características das doenças benignas, como a leiomiomatose; alterações da relação PRA:PRB são observadas em neoplasias malignas. Já o aumento significativo observado nos níveis de mRNA e de proteína de p53 e p21 em leiomiomas indica uma possível participação destes genes no desenvolvimento desse tumor podendo estar relacionado à estabilização funcional e detenção de possíveis danos, evitando a transformação carcinogênica.

ABSTRACT

Leiomyomas are common benign neoplasms of the female reproductive system and they are found in up to 50% of women of reproductive age. The causes and mechanisms of the development of this tumor are not well established. Occasional lack of control in apoptotic pathways and influences of ovarian steroid hormones must be involved.

The aim of this study was to examine the expression of gene and protein progesterone receptor isoforms A and B, p53 and p21 in uterine leiomyoma and myometrium. Samples of 14 reproductive-age patients, submitted to abdominal hysterectomy due to leiomyomatosis, were obtained.

The tissues were submitted to mRNA extraction using Trizol[®] for gene expression analysis through the RT-PCR technique, and protein extraction for protein expression analysis was developed through the Western blot technique. There were not significant differences in levels of mRNA expression for PRAB, *PRB* and PRs protein between the myometrium and uterine leiomyoma. It was not found any correlation between the menstrual cycle phase and progesterone receptors. The relationship between the isoforms (PRA: PRB) was not different in the tissues and it was observed a strong correlation ($r = 0.767$, $P = 0.004$) between them. The analysis of gene and protein expression showed an increase in levels of mRNA and p53 protein in leiomyoma when compared to myometrium ($P = 0.030$ and $P = 0.002$). The same increase was observed in the p21 mRNA levels ($P = 0.016$) and in the p21 protein levels ($P = 0.026$) in the samples of uterine leiomyoma. The unchanged gene and protein expressions of PRs are characteristic of benign diseases such as leiomyomatosis, and alterations in PRA: PRB relationship are observed in malignant neoplasms. However, the significant increase observed in the levels of mRNA and p53 and p21 protein in leiomyomas indicates a possible participation of those genes in the development of that tumor, which can be related to functional stabilization and retention of possible damage, avoiding the carcinogenic transformation.

INTRODUÇÃO

1. Útero e Leiomioma

O útero é um órgão do sistema reprodutor feminino localizado na pelve, anterior ao reto e póstero-superior à bexiga urinária [1]. Em formato de uma “pêra invertida”, apresenta uma porção dilatada, o corpo, cuja parte superior é o fundo do útero e uma parte inferior, cilíndrica, que se abre na vagina, a cérvix ou colo uterino [2]. O útero é um órgão muscular oco que tem a função de receber, reter e nutrir o embrião fertilizado [1]. Ele aloja o produto da concepção até o momento do parto, quando a contração do miométrio produz a força propulsora para a expulsão do feto [3].

O miométrio é alvo dos esteróides, estrogênio e progesterona. O estrogênio e a progesterona desempenham um papel chave na regulação dos genes que controlam o desenvolvimento e o funcionamento deste tecido de forma semelhante ao que ocorre na mama e no endométrio. Esse tecido, entretanto, possui baixo número de receptores de estrogênio e progesterona no início da fase folicular [4], conseqüentemente, a resposta do miométrio a esses hormônios também é baixa nesta fase. À medida que o nível plasmático desses hormônios se eleva, o

endométrio se diferencia com o objetivo de se preparar para uma possível gravidez [5].

Os leiomiomas são as neoplasias benignas mais comuns do sistema reprodutivo feminino [6], sendo conhecidos como miomas, fibromas ou fibromiomas [7]. Esses tumores são encontrados em cerca de 50% das mulheres em idade reprodutiva [8, 9]. Esse valor sobe para 77% quando são realizados exames de imagem e em autópsias [10, 11]. A incidência em afro-americanas é de 60% até os 35 anos, e de 80% aos 50 anos, enquanto mulheres caucasianas apresentam incidência de 40% e 70%, respectivamente [7, 12-14], representando uma significativa e onerosa preocupação para a saúde de inúmeras mulheres em todo o mundo [15].

O leiomioma origina-se no miométrio, que é constituído por fibras musculares lisas, arranjadas em feixes em várias direções [7]. Habitualmente, ocorrem no corpo uterino, apesar de poderem surgir no colo do útero. Na maioria das vezes, são firmes, de tamanhos variados e circundados por pseudocápsula, composta de miométrio uterino comprimido. A semelhança entre os tecidos normal e o neoplásico é grande, a ponto de ser difícil distinguí-los, especialmente em aumento maior. No leiomioma, a celularidade (quantidade de núcleos por unidade de área) é um pouco maior e o arranjo em feixes mais nítido (os feixes se cruzam às vezes em ângulo reto) do que no miométrio normal. A boa delimitação do tumor e a ausência de invasão dos tecidos vizinhos sugerem benignidade. Também não há atipias, mitoses ou necrose [7, 16]. Os leiomiomas uterinos tornam-se malignos (leiomiossarcomas) em menos de 0,1% das pacientes [17].

A classificação do leiomioma é feita de acordo com a localização (figura 1). Eles podem se localizar no interior da parede uterina (intramural) ou fazer protrusão

na cavidade endometrial (submucosa) ou na superfície serosa do útero (subseroso). Quando o leiomioma, submucoso ou subseroso, cresce além da superfície, mostrando-se preso por um pedículo, é chamado de pediculado ou pedunculado [7]. Mesmo quando volumosos, os leiomiomas uterinos podem ser assintomáticos. Os sintomas mais importantes são: (i) sangramento excessivo produzido principalmente por leiomiomas submucosos; (ii) aumento da frequência urinária (compressão da bexiga), quando volumosos; (iii) dor súbita quando ocorre torção e interrupção do fluxo sanguíneo; (iv) comprometimento da fertilidade (submucosos) [18, 19]. Nas mulheres grávidas, os leiomiomas aumentam a frequência de aborto espontâneo, má apresentação fetal, inércia uterina e hemorragia pós-parto [7].

Não há recomendação de tratamento para casos assintomáticos, sendo realizado apenas o acompanhamento do crescimento do leiomioma por ultrassonografia [20, 21]. Nos casos sintomáticos, a miomectomia constitui uma opção cirúrgica naquelas mulheres que desejam gestar; no entanto, essa técnica é associada ao aumento de perda de sangue, dor e morbidade pós-operatória. Além disso, a miomectomia pode acarretar procedimento cirúrgico adicional em função de recorrência, que ocorre em cerca de 20% a 25% dos casos. Isto também ocorre para o tratamento com análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), cujo uso prolongado pode promover, em alguns casos, redução da massa óssea e, após a cessação do tratamento, observa-se alta recorrência, fato relacionado ao aumento da expressão de receptores hormonais em tais tumores [22]. Evidência baseada em ensaio controlado e randomizado apoia o uso do GnRH como tratamento prévio à miomectomia, com a finalidade de reduzir perda sanguínea associada à cirurgia [23]. Outra opção seria a remoção do tecido miomatoso por várias formas de energia, entre elas, choque e radiofrequência, havendo relato de redução de 77% da lesão

seis meses após a realização do procedimento, além de melhoria da qualidade de vida [24, 25].

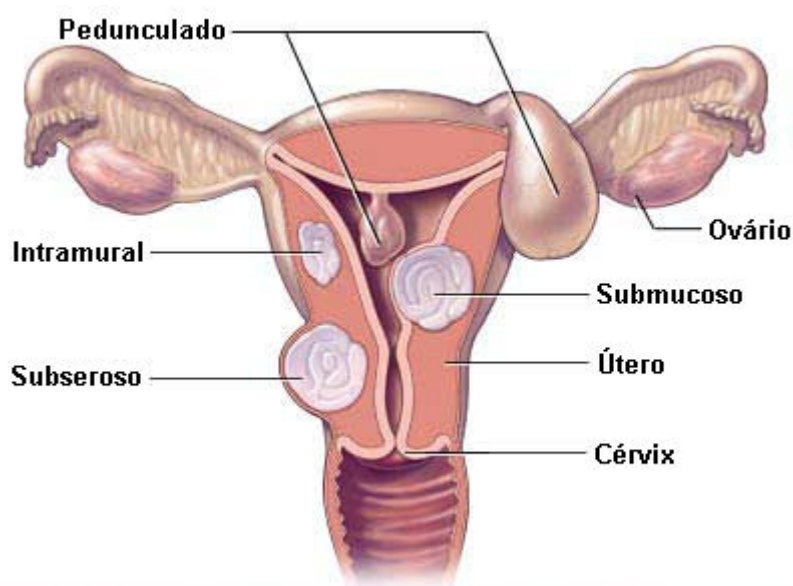


Figura 1. Possíveis locais de crescimento de leiomiomas. Quando o leiomioma localiza-se abaixo da serosa, ele é chamado subseroso; quando o leiomioma está inserido nas camadas musculares lisas, chama-se intramural; quando está entre o endométrio e o tecido muscular liso, é dito submucoso; quando está preso por um pedículo, é chamado pedunculado. Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research (2010) [26].

O tratamento definitivo da leiomiomatose é a histerectomia. Essa é a alternativa para mulheres que já tenham prole completa, com 0,1% de risco estimado de mortalidade pelo procedimento cirúrgico, como revelou um estudo com 37.500 mulheres que foram histerectomizadas por apresentarem leiomiomas [27]. A histerectomia muitas vezes é o tratamento de escolha, o que faz com que essa seja a cirurgia ginecológica mais realizada, tendo um impacto econômico importante nos sistemas de saúde [28].

A causa de leiomiomas uterinos é desconhecida. Existe um conjunto crescente de evidências sugerindo que o desenvolvimento e a regulação do crescimento de leiomiomas pode ser influenciado por vários fatores, incluindo: (i)

hereditariedade (filhas de mães com histórico de leiomiomatose uterina apresentam maior incidência) [29]; (ii) ambientais, como exposição a inúmeras formas de radiação; (iii) hormonais, destacando os hormônios esteroidais femininos estrogênio e progesterona (leiomiomas tipicamente surgem após a menarca e regredem após a menopausa, associando o estrogênio com a promoção do crescimento dos leiomiomas); (iv) eventuais descontroles nos percursos apoptóticos, como as vias dos genes supressores de tumor [15, 30].

Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos leiomiomas. Anormalidades citogenéticas têm sido encontradas em aproximadamente 40% desses tumores examinados [31]. O fato dos leiomiomas aparecerem durante a fase reprodutiva, aumentarem durante o primeiro trimestre da gestação e regredirem após a menopausa sugere sua dependência dos hormônios ovarianos [32-35]. Embora não tenha sido encontrada diferença entre a concentração sérica de estrogênio na mulher com e sem leiomioma, sua concentração tecidual é maior nos leiomiomas que no miométrio adjacente [32]. Isso provavelmente se deve à diminuição do metabolismo do estradiol em estrona, causado por uma menor quantidade de 17β -hidroxiesteróide desidrogenase nesses tumores em comparação ao miométrio. Além disso, a concentração de receptores de estradiol é maior em leiomiomas do que miométrio [36]. O estradiol parece agir diretamente sobre a proliferação celular dos leiomiomas ou por meio de fatores de crescimento como EGF, IGF-1 e insulina [33, 37, 38].

A associação da progesterona ao crescimento dos leiomiomas também é bastante estudada. O índice mitótico dos leiomiomas é maior na fase secretora do ciclo menstrual e as mulheres tratadas com acetato de medroxiprogesterona apresentam leiomiomas com maior índice mitótico. Quando os progestágenos são

utilizados concomitantemente aos análogos do GnRH, a diminuição dos leiomiomas é menor que aquela comparada ao uso apenas do agonista do GnRH [39]. Importante também é a diminuição do volume dos leiomiomas com o uso de antagonistas da progesterona [40].

2. Mecanismos de Ação dos Hormônios Esteróides

O modelo clássico proposto por Schuchard e colaboradores é aplicável aos receptores de estrogênios, progesterona, androgênios, glicocorticóides e mineralocorticóides e descreve a ação nuclear dos receptores desses hormônios. Conforme o esquema da figura 2, que ilustra o modelo clássico, os hormônios esteróides, por serem lipofílicos, difundem-se através da membrana celular, formando complexos de alta afinidade com o seu receptor, resultando na ativação do mesmo. A ativação envolve mudanças conformacionais e associações proteína-proteína, que capacitam o complexo hormônio-receptor (HR) a ligar-se com alta afinidade a regiões do DNA chamadas elementos responsivos a esteróides (EREs). Esses elementos responsivos correspondem a sequências de DNA de 15 a 20 pares de bases localizadas anteriormente (*upstream*) ao sítio de início da transcrição do gene responsivo ao esteróide. 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 do hormônio [41].

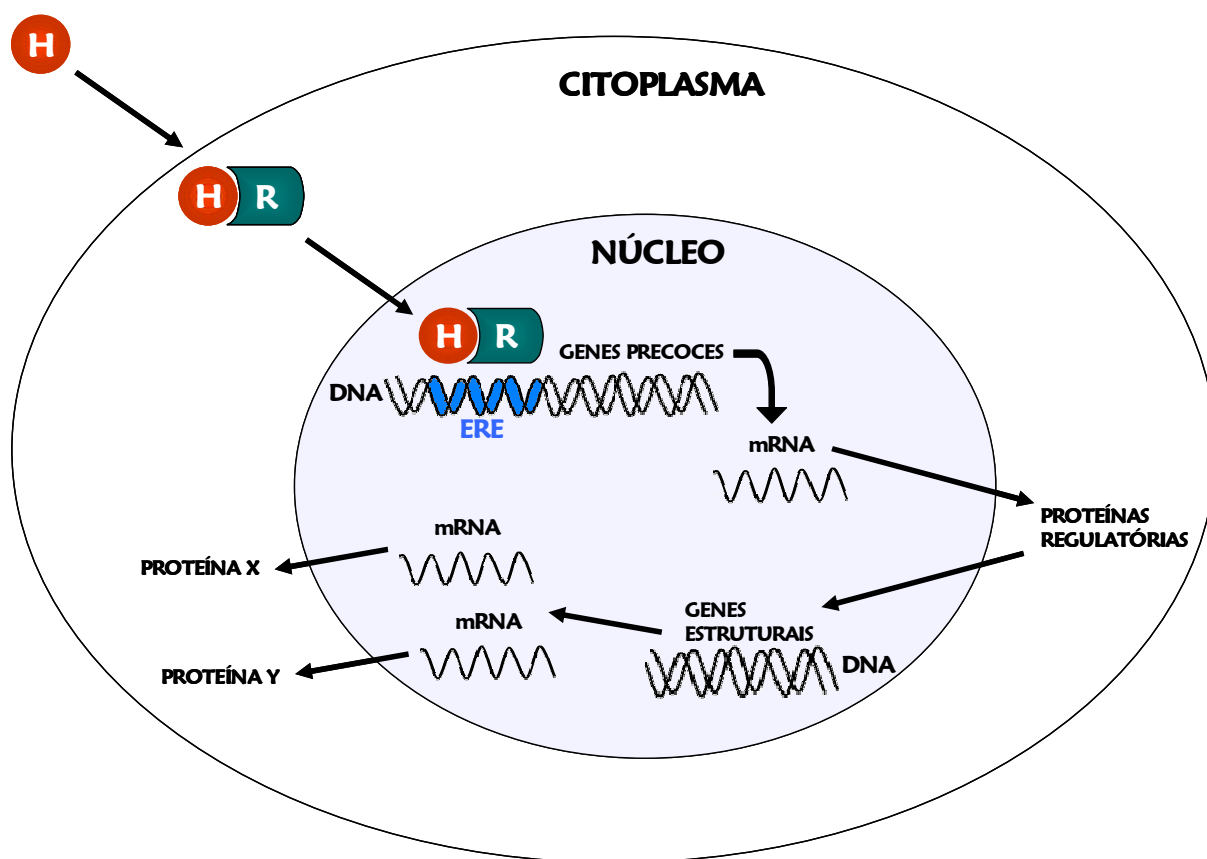


Figura 2. Mecanismo de ação genômica dos hormônios esteróides. O hormônio esteróide (H) difunde-se para dentro da célula ligando-se ao seu receptor específico (R) no núcleo ou citoplasma da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor (HR) se liga a elementos responsivos aos hormônios esteróides (ERE) no DNA, localizados nos promotores dos genes-alvo, induzindo a transcrição imediata dos genes precoces. A proteína produzida por estes genes regula a transcrição dos genes estruturais tardios cujos produtos interferem no desenvolvimento celular (proteína X e proteína Y). Adaptado de Schuchard *et al.* (1993) [41].

A partir do modelo proposto em 1993, avanços foram feitos para aprimorar o entendimento dos mecanismos de ação dos hormônios esteróides e de seus receptores nucleares. Descobriu-se que esses receptores caracterizam-se pela organização em domínios funcionais específicos, que apresentam diferentes graus de semelhança estrutural entre diferentes espécies [42]. Os domínios funcionais 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 ao hormônio, dimerizam-se, e assim formam o complexo hormônio-receptor ativado [43]. 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 [44].

3. Receptores de Progesterona

Sabe-se que os hormônios esteróides desempenham um papel central em diversos eventos associados à reprodução feminina [43]. A progesterona é um regulador essencial da função reprodutiva feminina, com fundamental atuação no útero, nos ovários e nas glândulas mamárias, também desempenhando um papel importante na fisiologia normal de tecidos não-reprodutivos, como sistema cardiovascular, tecido ósseo e sistema nervoso central [42, 45-47].

Para a progesterona desempenhar seus efeitos fisiológicos, é necessário que esta interaja com proteínas intracelulares específicas chamadas de receptores de progesterona (PRs) [48, 49], que são fatores de transcrição ativados por ligante pertencentes à família de receptores nucleares de hormônios esteróides [50]. O complexo progesterona-receptor regula a transcrição gênica através da ligação a sequências regulatórias específicas no DNA por interações específicas com proteínas co-ativadoras e/ou co-repressoras para regular a atividade do complexo da RNA-polimerase [51-54].

Nos humanos, a maioria dos autores é favorável à existência de duas formas originais de PR: a isoforma A (PRA – 94 kDa) e a isoforma B (PRB – 114 kDa) [51, 55], mostradas na figura 3. Estas isoformas são produtos de um único gene, como resultado da transcrição de dois promotores alternativos, induzidos por estrogênio, e também da tradução de dois códons de iniciação (AUG) alternativos do RNA mensageiro (mRNA) codificando PRB, que apresenta uma região de 164 aminoácidos na extremidade N-terminal, não presente em PRA [49, 56]. 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 [45, 57, 58]. O PRB também foi apontado como suficiente para capacitar a proliferação e a diferenciação normais do epitélio em resposta à progesterona, sendo que nenhum destes processos aparentemente exige a expressão funcional do PRA [58].

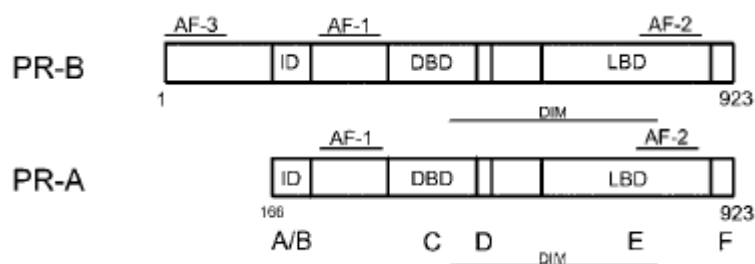


Figura 3. Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona humano. Os números indicam a posição dos aminoácidos em cada proteína. AF-1, AF-2 e AF-3 são domínios de transativação; DBD: domínio de ligação ao DNA; LBD: domínio de ligação ao ligante; ID: domínio inibitório; DIM: sequências importantes para a dimerização do receptor (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004) [43].

Os receptores dos hormônios esteróides são encontrados no miométrio e em tumores fibróides [59, 60]. Há indícios que sugerem que as interações entre

receptores de estrogênios e progesterona podem estar envolvidos na modulação da transcrição gênica da atividade dos leiomiomas [60]. Um aumento na expressão do mRNA de PRB foi encontrada na superfície do leiomioma e a expressão predominante desta isoforma sugere um fenótipo ativado pela progesterona relacionada com o crescimento e a proliferação do leiomioma. No entanto, continua sendo desconhecido se altos níveis de PRA estão associados com a redução da responsividade à progesterona nas células leiomiomatosas [61]. No rato, a ablação de PRA e PRB revelou os papéis originais para o PRA e PRB, demonstrando que o PRB é necessário para o desenvolvimento normal da glândula mamária [62], enquanto PRA é essencial para o útero em desenvolvimento e função reprodutiva [63]. Estudo em glândula mamária de humanos demonstrou que os conteúdos de PRA e PRB são mais elevados em fibroadenoma do que no tecido normal adjacente, com um grande predomínio de PRA sobre PRB; porém, tanto PRA como PRB foram identificados em ambos os tecidos [64].

Várias linhas de evidências clínicas e bioquímicas têm indicado um papel crucial para a progesterona na patogênese do leiomioma [36, 59]. Foi sugerido que os níveis de progesterona devem estimular a atividade mitótica e a proliferação do leiomioma na fase secretora do ciclo [34, 65]. A visão tradicional defende que o leiomioma é apenas dependente de estrogênio, mas alguns dados clínicos e experimentais sugerem que a progesterona pode ser importante para o crescimento tumoral [66]. Culturas de células de miométrio e leiomioma mostram um crescimento significativo quando as células são estimuladas apenas com progesterona e também quando são estimuladas por estrogênio e progesterona [67].

Evidências sugerem que os esteróides sexuais não são os únicos moduladores de tumores leiomiomatosos e seu crescimento. Muitas vezes, os níveis

séricos hormonais de esteróides em mulheres com leiomioma são semelhantes aos de mulheres sem essa doença [68]. Além disso, o tamanho dos leiomiomas durante os dois últimos trimestres da gravidez não aumenta, apesar do aumento exacerbado das concentrações de hormônios esteróides sexuais circulantes nessa fase [60].

4. Ciclo Celular

A função básica do ciclo celular é duplicar exatamente todo o conteúdo de DNA nos cromossomos e, com precisão, segregar as cópias dentro de duas células-filha geneticamente idênticas. Esse processo define as duas principais fases do ciclo celular. A duplicação ocorre na fase S (S de síntese), que dura entre 10 e 12 horas em mamíferos, e a segregação do cromossomo e a divisão celular ocorre na fase M (M de mitose), evento que acontece em menos de uma hora. A maioria das células necessita de muito mais tempo para crescer e duplicar a sua massa de proteínas e de organelas do que o tempo necessário para replicar seu DNA e dividir-se. Para permitir um maior tempo de crescimento, há fases de intervalos, chamados de G1, fase entre M e S, e G2, entre as fases S e M (figura 4). E se as condições extracelulares não são favoráveis, as células retardam a entrada na fase G1 e ficam inativadas na fase G0, permanecendo nesse estado por dias, semanas ou até anos [69].

Cada célula está sob constante vigilância para manter a integridade de seu genoma. As lesões genéticas em uma célula devem ser reparadas antes do início da replicação do DNA e da divisão celular. Para isso, em muitas células existem vários pontos no ciclo celular, denominados “pontos de checagem”, localizados entre G2 e M, entre M e G0/G1 e entre G1 e S, nos quais o ciclo celular pode ser interrompido [70]. A regulação do ciclo celular nesses pontos é governada por subunidades

catalíticas, conhecidas como cinases dependentes de ciclinas (Cdks), e subunidades regulatórias, conhecidas como ciclinas, as quais sofrem um ciclo de síntese e degradação a cada ciclo celular. A progressão do ciclo celular é regulada por ativação ou inibição da fosforilação das subunidades Cdks, dependendo se o agente estressor está presente [71].

O controle homeostático do crescimento dos tumores é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a proliferação celular e a morte celular [72]. Durante o desenvolvimento, a coordenação entre esses eventos é essencial. O estresse genotóxico, que danifica o DNA, induz a parada do ciclo celular, a ativação do reparo do DNA e, em caso de dano irreparável, a apoptose. A decisão das células pela reparação de lesões do DNA e a continuação do ciclo celular, ou de submeter-se à apoptose, é relevante para a incidência de mutagênese e, posteriormente, carcinogênese [73]. Por exemplo, a apoptose celular acontece durante o desenvolvimento através de um mecanismo independente de p53. No entanto, quando há danos nas células, a proteína p53 impõe a parada do crescimento e a morte. A parada do crescimento é facilitada pela indução do inibidor do ciclo celular p21, mediado por p53 [74].

5. p53

O gene *p53*, que codifica uma fosfoproteína nuclear formada por 375 aminoácidos e está localizado no cromossomo 17p, na posição p13.1 [75]. A proteína supressora de tumor p53, uma proteína nuclear, realiza um papel essencial na regulação do ciclo celular, especialmente na transição de G0 para G1 [76].

O nível da proteína p53 é basicamente indetectável em células normais, mas aumenta rapidamente em resposta a vários sinais de estresse. O mecanismo

molecular exato pelo qual se escolhe entre a parada do ciclo e a apoptose permanece em grande parte desconhecido, mas a modificação pós-traducional desempenha um papel fundamental [77-81]. A inativação de *p53* resulta em instabilidade genômica [82]. A *p53* é considerada uma das proteínas mais importantes para manter a estabilidade e integridade do genoma. Ela protege a célula, impedindo a proliferação celular após um dano no DNA e ativando a apoptose, no caso de um dano irreparável [83-85].

Entre as funções da proteína *p53* estão a de regular diretamente a expressão de *p21*, além de deter danos e/ou crescimento desordenado do DNA, que estão envolvidos no controle do ciclo celular [86]. A *p53* liga-se ao DNA danificado para repará-lo e induz a parada do ciclo celular (a partir da fase G1) ou a apoptose [87, 88].

É amplamente reconhecido que a proteína *p53* pode ser frequentemente mutada em cânceres humanos, implicando tal alteração a um passo fundamental na geração de instabilidade genômica e na suscetibilidade a transformações aos estados neoplásicos [89]. Estudos relatam que até 50% dos tumores humanos são portadores de mutações inativadoras do gene *p53* [90], tornando-o um dos genes mais frequentemente mutados no câncer. Em tumores que apresentam o tipo de gene *p53*-selvagem, a sua função é comprometida, em grande parte, pela desregulação do seu ancorador MDM2 [91]. Nos cânceres em que o gene *p53* é expresso, é possível que alterações no gene *p21* possam ter efeito de uma perda da função de *p53*, isto é, perda da capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G1 [92-96]. Além disso, a proteína mutada apresenta uma maior expressão e uma meia vida mais longa que a proteína *p53*-selvagem, que é expressa em níveis muito baixos em células normais [97].

A perda de funções e a desregulação das atividades de p53 não estão envolvidos apenas no desenvolvimento de doenças malignas, por contribuir para a progressão do tumor ao manter as células em um estado relativamente imaturo [98], mas também estão presentes em distúrbios cardiovasculares, neurodegenerativos, infecciosos e metabólicos, bem como há uma participação no processo de envelhecimento do organismo [99]. Assim, o *p53* foi categorizado como um gene supressor tumoral [100].

6. p21

O ponto de checagem G1 bloqueia a continuidade para a fase S por inibir a ativação dos complexos G1/S-Cdk e S-Cdk. Nas células dos mamíferos, por exemplo, os danos ao DNA levam à ativação dos genes regulatórios da proteína p53, a qual estimula a transcrição de vários genes. Um desses genes codifica uma proteína CKI (inibidores de Cdk), denominada p21, que se liga aos complexos G1/S-Cdk e S-Cdk e inibe suas atividades, ajudando a bloquear a entrada na fase S [101].

O gene *p21* codifica uma quinase inibidora dependente de ciclina. A proteína codificada, também chamada de WAF1 ou CIP1, Mda 6, e Cap 20, localizada no cromossomo 6p21.2, liga e inibe a atividade dos complexos ciclina-CDK2 ou -CDK4, e assim funciona como um regulador da progressão do ciclo celular em G1 [102]. A expressão deste gene é regulada pela proteína supressora de tumor p53. A proteína p21 pode desempenhar um papel regulatório antes da fase S da replicação celular e no reparo do DNA antes da fase M da divisão celular [76].

A indução da expressão de p21 poderia servir como indicador da transativação por p53, resultando na inibição da proliferação celular em G1, interrompendo o ciclo celular e a indução de alteração celular. As alterações mais

comuns encontradas em câncer humano são: inativação ou mutação no gene supressor de tumor *p53* e uma dramática redução dos níveis de *p21* [103]. Demonstrou-se que a expressão de *p21* está associada com a presença de metástases e, provavelmente, com grande instabilidade genética [104].

A proteína *p21* também pode agir de forma anti-apoptótica. A inibição da apoptose por *p21* tem sido atribuída à interação com a pró-caspase-3, resultando em inibição de sua atividade de estabilização [105, 106], ou hipossensibilização da caspase-2 [107]. Assim, a função anti-apoptótica de *p21* parece ser distinta da sua função de parada do ciclo celular. A identificação das vias e/ou fatores que regulam a decisão entre apoptose e parada do crescimento/reparo do DNA induzido por *p53* pode ajudar a desenvolver ferramentas que possam modular vias terapêuticas, para que a reativação da *p53* por pequenas moléculas extermine as células tumorais sem efeitos prejudiciais para as células normais. Além disso, seria de grande importância modular *p53* e *p21*, uma vez que o impacto relativo das atividades de apoptose pode aumentar ou impedir a resposta terapêutica. Por exemplo, a parada do ciclo celular mediada por *p53* e de reparo de DNA poderá servir como barreira ao tratamento quimioterápico ideal, como mostrado em um estudo com pacientes com carcinoma do ovário [108].

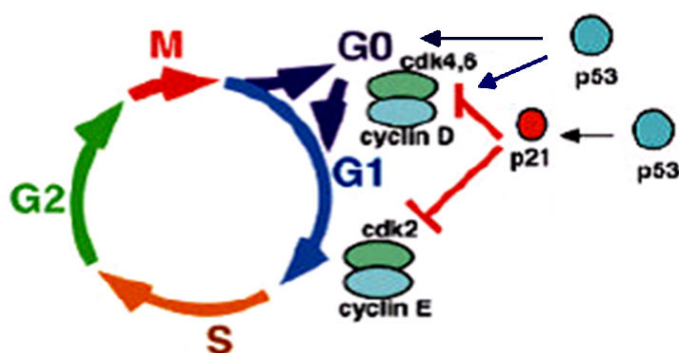


Figura 4. Ciclo da divisão celular representando a ação do *p53* sobre a transativação de *p21* e este agindo sobre as Cdks, interrompendo o ciclo na fase G1. Adaptado de Lewis (2000) [109].

Justificativa

A fisiopatologia do leiomioma uterino ainda não foi explorada de forma satisfatória. As relações entre as alterações citogenéticas dos leiomiomas e os mecanismos hormonais são muito estudados, mas pouco entendidas.

Há razões para acreditar que mutações somáticas induzem alterações no miométrio e que os tumores possam ser dependente de hormônios esteróides. Em geral, os leiomiomas não ocorrem antes da menarca e reduzem marcadamente após a menopausa. Os efeitos dos hormônios esteróides sobre o crescimento dos leiomiomas são mediados por genes específicos que codificam fatores de crescimento e seus receptores diretamente através da transcrição de fatores responsivos aos esteróide, que consistem de proteínas-produto do ciclo celular, e genes relacionados. [60].

Dadas as diversas funções das isoformas A e B do receptor de progesterona, de p53 e de p21 em tecidos normais, hiperplásicos e neoplásicos, como relata essa introdução, a realização deste estudo busca auxiliar na compreensão dos mecanismos que regulam o desenvolvimento das células e da especificidade dos tecidos em resposta às variações cíclicas hormonais, assunto nem sempre bem estabelecido. Assim, pretendeu-se determinar a distribuição dos genes e a aptidão deles em transcrever proteínas que irão regular o ciclo celular do miométrio e dos leiomiomas, interferindo no tenuous limite entre proliferar, diferenciar e morrer.

OBJETIVOS

Examinar a expressão do gene e da proteína das isoformas A e B do receptor de progesterona, de p53 e de p21 em miométrio e leiomioma uterino de pacientes em idade reprodutiva.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento de Pesquisa

O presente estudo trata-se de um estudo transversal.

2. Pacientes

Foram convidadas a participar do estudo as pacientes atendidas pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com histerectomia por leiomiomatose uterina agendada no período de maio de 2008 a janeiro de 2010.

2.1. Critérios de Inclusão

- indicação de histerectomia por leiomiomatose;
- nódulos leiomatosos medindo entre 1,0 cm e 5,0 cm;
- mulheres em idade reprodutiva.

2.2. Critérios de Exclusão

- uso de qualquer medicação hormonal nos últimos 3 meses prévios à cirurgia, tanto para anticoncepção como agonista do GnRH;

- exame anátomo-patológico não confirmando presença de leiomioma uterino.

2.3. Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa que utilizou Reação em Cadeia da Polimerase a partir da Transcrição Reversa (RT-PCR) semi-quantitativo para análise da expressão gênica [110]. Considerando-se um poder de 90%, nível de significância de 0,05 e diferença entre as médias de 0,5 unidades arbitrárias (UA). O cálculo amostral foi baseado em dados de expressão gênica, cujo N necessário foi de 14 pacientes em cada grupo. Os tecidos dos dois grupos a serem comparados foram obtidos da mesma paciente (grupo 1 – miométrio adjacente ao tumor e grupo 2 – leiomioma uterino).

2.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

As pacientes que concordaram em participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), doando uma amostra de tumor removido cirurgicamente e uma amostra do tecido normal circunjacente, além de uma amostra de 10 mL de sangue venoso.

3. Procedimentos

3.1. Coleta das Amostras

As pacientes selecionadas foram submetidas a um questionário (em consultório, anteriormente à cirurgia) para obtenção de dados antropométricos e de história ginecológica e obstétrica (Anexo 2).

Nesse estudo, foram incluídas 14 pacientes que foram atendidas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCPA. As amostras foram coletadas no centro

cirúrgico, onde as pacientes eram submetidas à histerectomia. Foram obtidos fragmentos do leiomioma e do miométrio normal e o restante do material foi encaminhado ao exame anátomo-patológico. Os fragmentos destinados à pesquisa foram acondicionados em microtubos devidamente identificados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e transferidos para um freezer -80 °C para posterior extração de RNA total e proteínas. O diagnóstico de leiomioma uterino foi baseado na macroscopia e confirmado no exame anátomo-patológico.

Uma amostra de 10 mL de sangue venoso foi coletada durante a indução anestésica precedente à cirurgia, em tubo *vacutainer* sem anti-coagulante sendo centrifugada em seguida para obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer a -20°C e posteriormente realizadas as dosagens hormonais de progesterona e estradiol pelo método de *eletroquimiluminescência*.

3.2. Análise da Expressão Gênica

3.2.1. Extração do RNA Total

O RNA total das amostras foi extraído com o uso de Trizol[®] [111]. Parte do fragmento de tecido coletado foi colocado em um tubo de vidro (5mL) com 1mL de Trizol[®] e homogeneizado com auxílio do *OmniMixer*[®]. O homogenato foi transferido para um tubo *ependorf* de 2mL. Após repouso de 5 minutos em temperatura ambiente, foi acrescentado 0,2mL de clorofórmio e a solução foi agitada vigorosamente por 15 segundos no vórtex e deixada por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12000 xg, por 15 minutos em temperatura de 4°C. Transferiu-se o sobrenadante (fase aquosa) para outro tubo limpo e identificado, adicionou-se 1,0 mL de Propanol e seguiu-se um período de precipitação do RNA overnight a -20°C. Após esse período, o material foi

centrifugado por 15 minutos a 12000 xg a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugou-se a 8000 xg por 10 minutos a 4°C. Foi desprezado o sobrenadante e o precipitado foi bem seco à temperatura ambiente. Esse precipitado foi redissolvido em volume adequado de água ultrapura tratada com *diethylpyrocarbonate* (DEPC). Dependendo do tamanho do precipitado formado, adicionou-se entre 10 a 30 µL, incubou-se por 10 min a 65°C e, em seguida, por 1 min no gelo para posterior quantificação e estocagem a -20°C.

3.2.2. Quantificação do RNA

Alíquotas de 1 µL do RNA dissolvido foram diluídas com 499 µL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant[®]), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm (*ratio* – calculada pelo equipamento) foi superior a 1,6. A concentração de RNA na solução original foi calculada pela seguinte fórmula (considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução): $A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$, onde: A = absorvância a 260 nm e D = diluição da alíquota usada para quantificação (neste caso, D = 500, pois 1 µL do RNA foi diluído com 499 µL de água).

3.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase a partir da Transcrição

Reversa – RT-PCR

A avaliação da expressão do mRNA das isoformas do receptor de progesterona, de *p53* e de *p21* foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de Transcrição Reversa (RT) ou RT-PCR [112]. A técnica

consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do RNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

Síntese de cDNA

A síntese do cDNA das amostras foi feita a partir de 2 µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo-se um cDNA exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do RNA total que corresponde ao mRNA é de aproximadamente 2 a 3%, estimou-se que 2 µg de RNA total dariam origem a 40 µg de cDNA, com uma concentração de 2µg/µL. O kit usado foi o *Super Script First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (Invitrogen – Life Technologies). O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 min juntamente com o *primer* Oligo(DT) e os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPS). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, ditioneitol (DTT) 0,1 M e 40 unidades (U) da enzima RNase OUT, sendo incubado a 42°C por 2 min. Após a adição de 50U da enzima transcriptase reversa, seguiu-se um período de incubação a 42°C por 50 min. A seguir, a atividade enzimática foi inibida por um período de incubação a 70°C por 15 min. Para degradação do RNA remanescente no tubo, foram adicionadas 2U da enzima RNase H de *E. coli*, incubando-se a 37°C por 20 min. A síntese do cDNA totalizou um volume de 20 µL, que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

Protocolo Geral da PCR

As reações de PCR foram feitas num volume final de 50 μ L. As amostras de cDNA foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 2 min na presença de 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) mais 500 mM KCl e 50mM MgCl₂. Esse procedimento, conhecido como *hot start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados. Em seguida os tubos foram imersos em gelo e receberam 10 μ L de uma solução com as mesmas concentrações do tampão Tris-HCl e MgCl₂, acrescida dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA Polimerase e submetidos à amplificação. A tabela 1 mostra as características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA (beta-microglobulina- β_2m , isoformas *PRAB* e *PRB*, *p53* e *p21*). As condições finais para RT-PCR estão listadas na tabela 2. O número de ciclos foi ajustado para cada oligonucleotídeo (figuras 5 a 8). Todos os reagentes foram provenientes da LGC Biotechnologies (Kit Easy Taq DNA Polymerase). O produto amplificado pela RT-PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica através do sistema de captação de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Para cada amostra, a análise densitométrica obtida para a banda referente aos genes em estudo foi corrigida pela banda referente ao gene constitutivo β_2m , sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 1. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, para amplificação de fragmentos de genes em estudo.

Gene	Sequência sintetizada	Fragmento	Referência
<i>β_2m</i>			
sense	5'CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	167 pb	[113, 114]
antisense	5'ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'		
PRAB*			
sense	5'AGAGCACTGGATGCTGTTGCT 3'	68 pb	[113]
antisense	5'TGGCTTAGGGCTTGGCTTT 3'		
PRB			
sense	5'GCCAGACCTCGGACACCTT 3'	77 pb	[113]
antisense	5'CAGGGCCGAGGGAAGAGTAG 3'		
p53			
sense	5'AGGTGACCCAGGCTTGGAAAG 3'	133pb	[114]
antisense	5'TCCTGACTCAGAGGGGGCTC 3'		
p21			
sense	5'CTCAG7AGGAGGCGCCATG 3'	517 pb	[114]
antisense	5'GGCGGATTAGGGCTTCC 3'		

* *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. Programas utilizados nas reações de RT-PCR, para amplificação dos genes em estudo.

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão final
β_2m	94°C/30s	55°C/30s	72°C/30s	30 ciclos	72°C/5min
PRAB	94°C/30s	56°C/45s	72°C/45s	36 ciclos	72°C/5min
PRB	94°C/30s	59°C/30s	72°C/45s	38 ciclos	72°C/5min
p53	94°C/1min	56°C/1min	72°C/1min	35 ciclos	72°C/5min
p21	94°C/1min	62°C/50s	72°C/1min	38 ciclos	72°C/5min

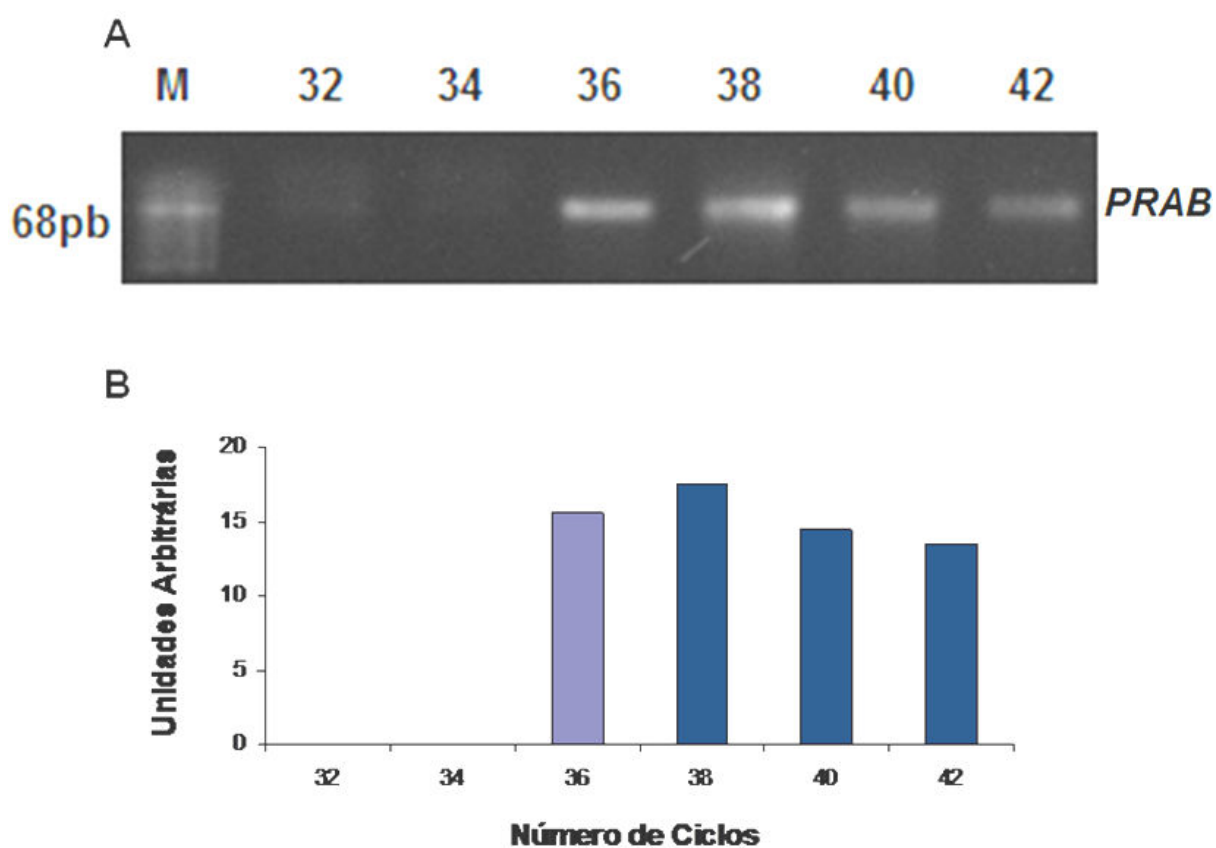


Figura 5. Curva de ciclos para o gene *PRAB*. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da padronização de RT-PCR dos ciclos para o gene *PRAB*, em amostras de miométrio e leiomioma uterino (**M** marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos, em unidades arbitrárias, para o gene *PRAB* determinado por RT-PCR para amostras de miométrio e leiomioma uterino. O padrão de RT-PCR escolhido para o gene *PRAB* foi de 36 ciclos.

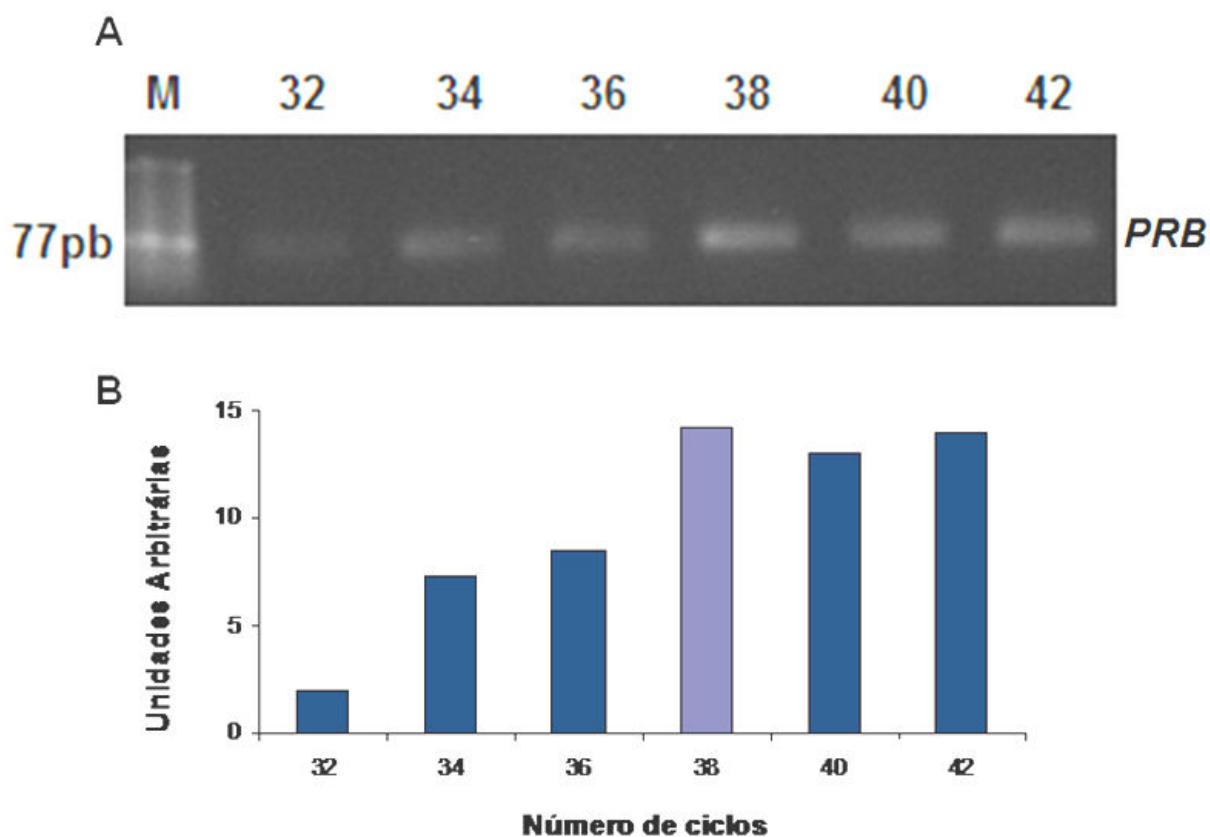


Figura 6. Curva de ciclos para o gene *PRB*. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da padronização de RT-PCR dos ciclos para o gene *PRB*, em amostras de miométrio e leiomioma uterino (**M** marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos, em unidades arbitrárias, para o gene *PRB* determinado por RT-PCR para amostras de miométrio e leiomioma uterino. O padrão de RT-PCR para o gene *PRB* foi de 38 ciclos.

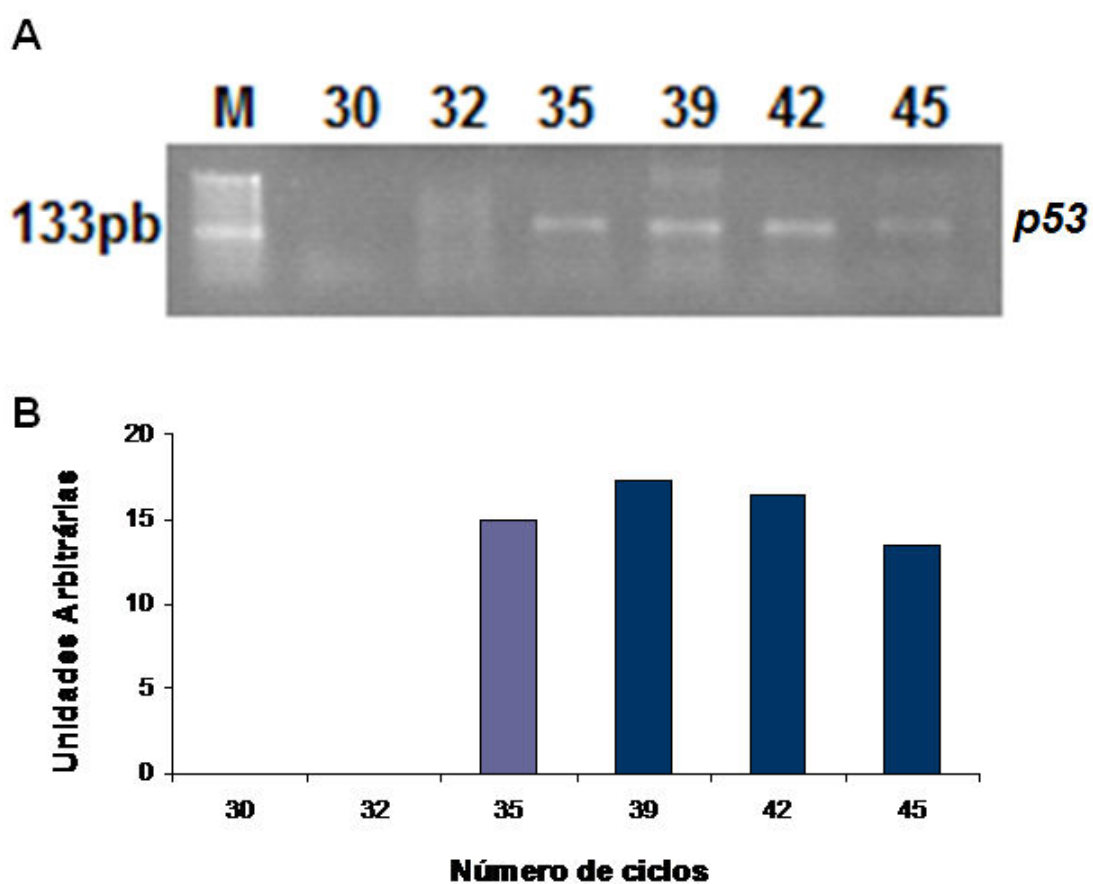


Figura 7. Curva de ciclos para o gene *p53*. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da padronização de RT-PCR dos ciclos para o gene *p53*, em amostras de miométrio e leiomioma uterino (**M** marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos, em unidades arbitrárias, para o gene *p53* determinado por RT-PCR para amostras de miométrio e leiomioma uterino. O padrão de RT-PCR para o gene *p53* foi de 35 ciclos.

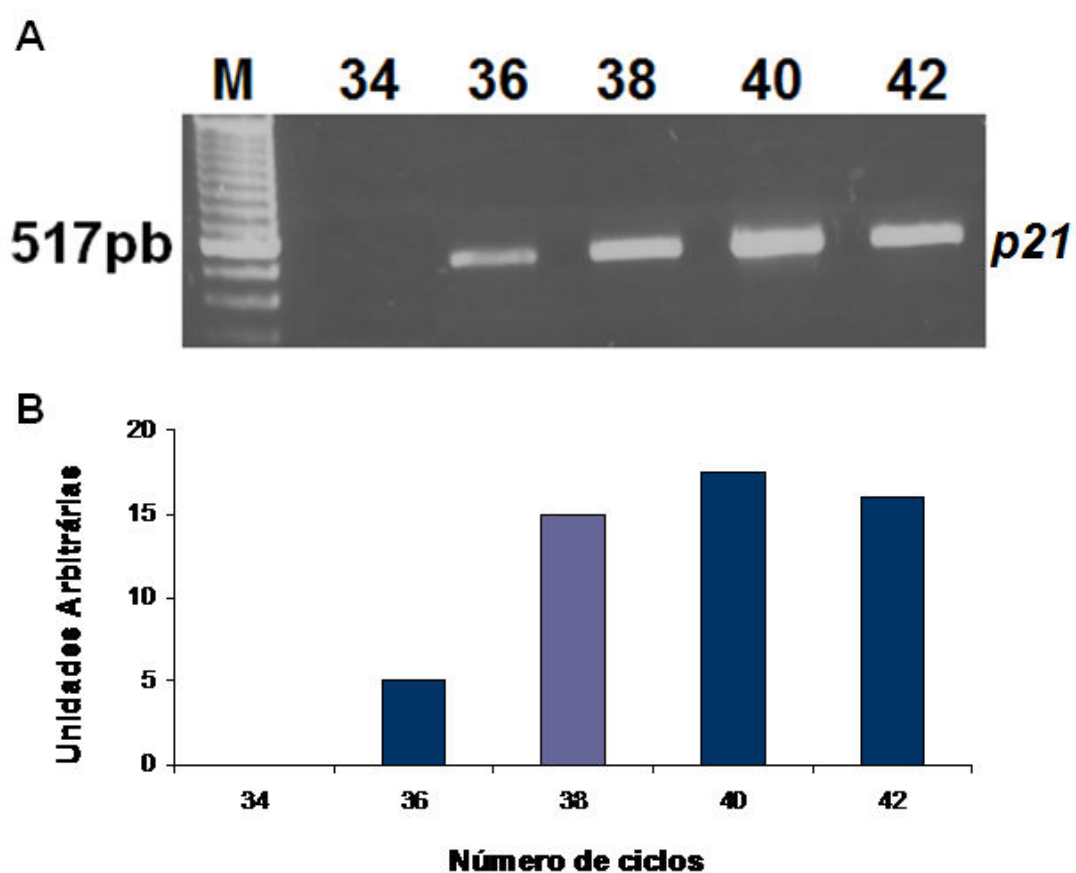


Figura 8. Curva de ciclos para o gene *p21*. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da padronização de RT-PCR dos ciclos para o gene *p21*, em amostras de miométrio e leiomioma uterino (**M** marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos, em unidades arbitrárias, para o gene *p21* determinado por RT-PCR para amostras de miométrio e leiomioma uterino. O padrão de RT-PCR para o gene *p21* foi de 38 ciclos.

3.3. Análise da Expressão Proteica

3.3.1 Extração e Quantificação de Proteínas

Para extração das proteínas, a outra metade do fragmento de tecido congelado (aproximadamente 500 mg) foi homogeneizada com o uso do homogeneizador OmniMixer[®] por 30 s com 0,3 mL de uma solução tampão de lise contendo Tris 10mM pH 7,4, EDTA 100mM pH 7,4, PMSF 200 mM, NaF 200 mM, Na₂P₂O₇ 10 mM, Na₃VO₄ 2mM e Triton X-100 10%. O material foi solubilizado por 2 h a 4°C, e após foi centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Cerca de 10 µL de amostra foram utilizados para dosagem de proteínas pelo Método Colorimétrico de Bradford [115]. A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com 100 µL de amostra diluída em água destilada (1:2000) e 150 µL de solução de Bradford, e comparadas com curva padrão de albumina. Após a dosagem de proteínas, o material foi estocado a -20°C para análise da expressão proteica pela técnica de *Western Blot*.

3.3.2. Western Blot

Para separação das proteínas, foi utilizado o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 8% (para PRA e PRB) e de 12% (para p53 e p21). Aproximadamente 50 µg da proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (glicerol 50%, SDS 10%, Tris 65 mM, azul de bromofenol 0,1% e 2-β-mercaptoetanol 0,05%) a 95°C por 5 min [116], e adicionadas em cada poço

do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 3 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. O equipamento utilizado foi o Mini-PROTEAN[®] 3 *Electrophoresis Cell* (BioRad, EUA).

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (NC), coberto com tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1% e metanol 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada no sistema Trans-Blot SD – *Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, EUA), por 1 h à diferença de potencial de 25 V para o gel de 8% e por 40 min à diferença de potencial de 20 V para o gel de 12%.

As membranas de NC contendo as proteínas foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora, contendo NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4, acrescido de leite em pó desnatado 5%. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos na membrana de NC.

Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, 16 horas a 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos específicos diluídos em TTBS (tabela 3). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS 1% (3 lavagens de 10 min cada) e então incubadas com o segundo anticorpo (IgG *rabbit anti-mouse*, Cat. N° 81-6711, Zymed[®], EUA, na concentração de 1:6000) por 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas com TBS (3 lavagens de 10 min cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimioluminescência (ECL) por 1 min, em sala escura.

Após a incubação com a solução para quimioluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare®/Amersham Hypperfilm™ ECL), de 30 s a 5 min. Dada a revelação, o filme foi analisado por densitometria óptica das bandas, medida por um sistema de processamento de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, EUA). A densitometria obtida para as bandas de PRA, PRB, p53 e p21 foi corrigida pela densitometria da banda de β -tubulina, uma proteína constitutiva também presente na membrana de NC, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 3. Anticorpos primários.

Anticorpo	Concentração	Empresa	Catálogo N°.
β-Tubulina(2-28-33)	1:500	Santa Cruz Biotechnology® Inc.	sc-23949
PR(AB-52) monoclonal	1:500	SC Biotech® Inc.	sc-810
p53 monoclonal	1:500	BioSource™	AHO0112
p21 monoclonal	1:250	Invitrogen™	33-7000

3.4. Dosagens Hormonais

Os níveis séricos de progesterona e estradiol foram obtidos junto ao serviço de Patologia Clínica do HCPA, pelo método de *eletroquimioluminescência* (Kit de reagentes Elecsys Progesterone II e Elecsys Estradiol, Roche®, e equipamento Modular Roche®, Suíça).

4. Análise Estatística

Para cada amostra, os dados obtidos de expressão gênica e expressão proteica foram expressos como média \pm erro padrão (EP) quando apresentaram distribuição normal, ou como mediana e intervalos interquartis quando não apresentaram distribuição normal. Os resultados foram avaliados quantitativamente, pelos testes: t de Student, T de Wilcoxon, além de correlação de Pearson para avaliar a relação PRA:PRB entre miométrio e leiomioma uterino, e também para avaliar parâmetros clínicos das pacientes, estes descritos como média \pm desvio padrão (DP).

Foi considerado o nível de significância quando $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 15.0 (*Statistical Packages for the Social Sciences*, EUA).

RESULTADOS

Nesse estudo, foram obtidas amostras de 27 pacientes, das quais, 13 não se adequaram aos critérios de inclusão (anátomo-patológico compatível com uso de medicação hormonal, por exemplo). Das 14 pacientes incluídas no estudo, 2 pacientes declararam ser da raça negra e 4 pacientes não tiveram filhos. Duas pacientes nunca haviam feito uso de método anticoncepcional hormonal, 11 encontravam-se na fase folicular do ciclo menstrual e 3 na fase lútea, classificadas conforme data da última menstruação, avaliação histológica do endométrio e níveis de progesterona sérica. A tabela 4 apresenta os dados clínicos e antropométricos das pacientes.

Tabela 4. Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes incluídas no estudo.

	Número ou Média±DP
Número de casos	14
Idade	46,21 ± 5,15
Fase do ciclo menstrual	
folicular	11
lútea	3
IMC (kg/m ²)	30,01 ± 5,93

Os resultados da expressão gênica e proteica foram avaliados de forma quantitativa e independente. Os genes *PRAB*, *p53* e *p21* não apresentaram distribuição normal, sendo, portanto utilizado o teste *T* de Wilcoxon para amostras dos grupos miométrio e leiomioma correspondentes de cada paciente. Os gráficos desses resultados foram representados como mediana e intervalos interquartil (25-75). Já para o gene *PRB* e as proteínas PRA, PRB, p53 e p21 foi realizado o teste *t* pareado de Student por apresentarem distribuição normal, sendo representados em gráficos como média±EP.

1. Análise dos Níveis de mRNA dos Receptores de Progesterona

A expressão do mRNA do *PRAB* foi avaliada em miométrio [0,8766 (0,7554-0,9710)] e em leiomioma [0,8736 (0,7918-1,0882)] não mostrando diferença significativa na sua expressão entre estes tecidos (Teste *T* de Wilcoxon, $P=0,433$). Estes dados são apresentados na figura 9 como valores individuais de expressão gênica.

A figura 10 representa a expressão do mRNA do *PRB* em miométrio ($0,8941\pm 0,0604$) e em leiomioma ($1,0278\pm 0,0791$), como valores individuais de expressão gênica. Não houve diferença significativa de expressão deste gene quando comparados os dois tecidos (Teste *t* de Student, $P=0,104$).

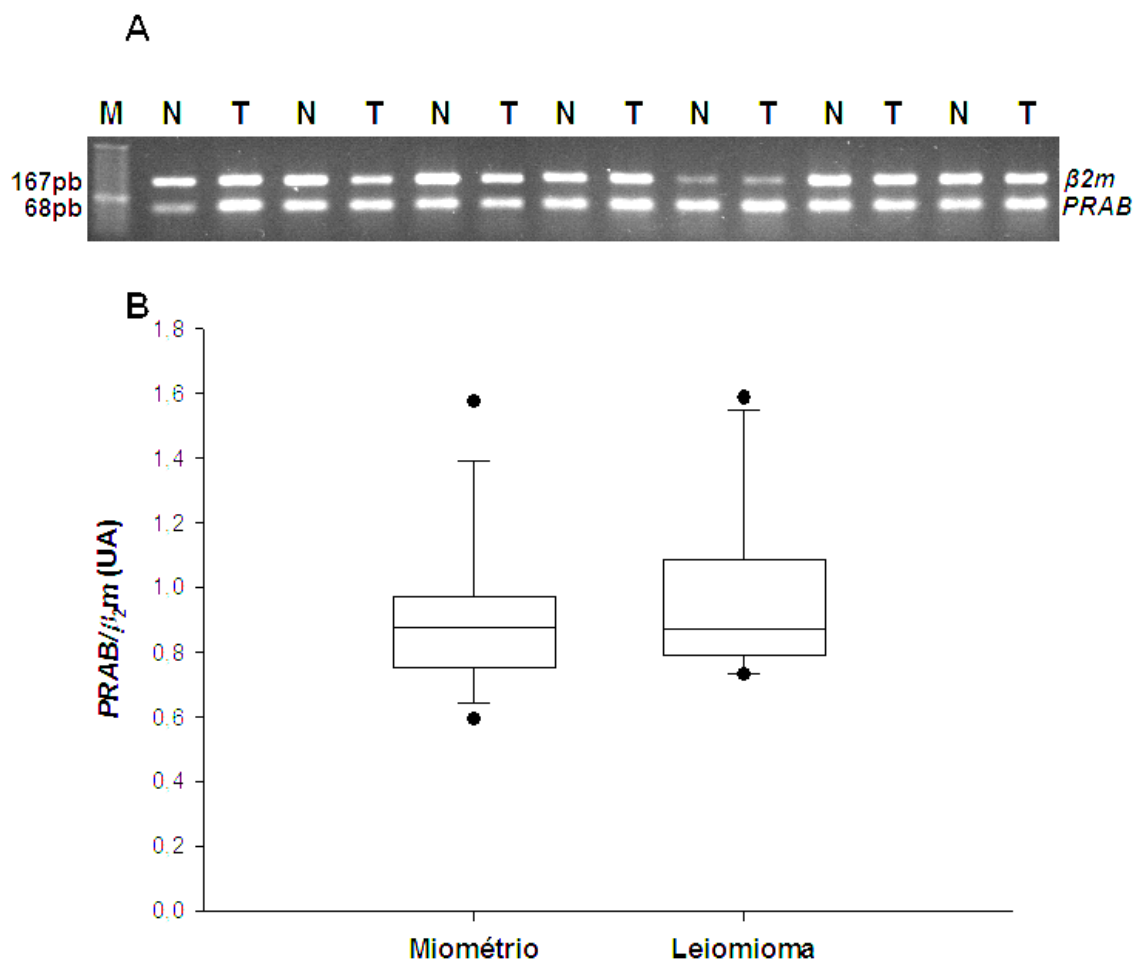


Figura 9. Expressão gênica de *PRAB* em miométrio e leiomioma. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da RT-PCR dos genes β_2m e *PRAB*, em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T) (M marcador de pares de bases). (B) Gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação *PRAB*/ β_2m (mediana e intervalo interquartis 25-75), em unidades arbitrárias. Não foi observada diferença significativa entre a expressão gênica de *PRAB* de miométrio e de leiomioma ($P=0,433$).

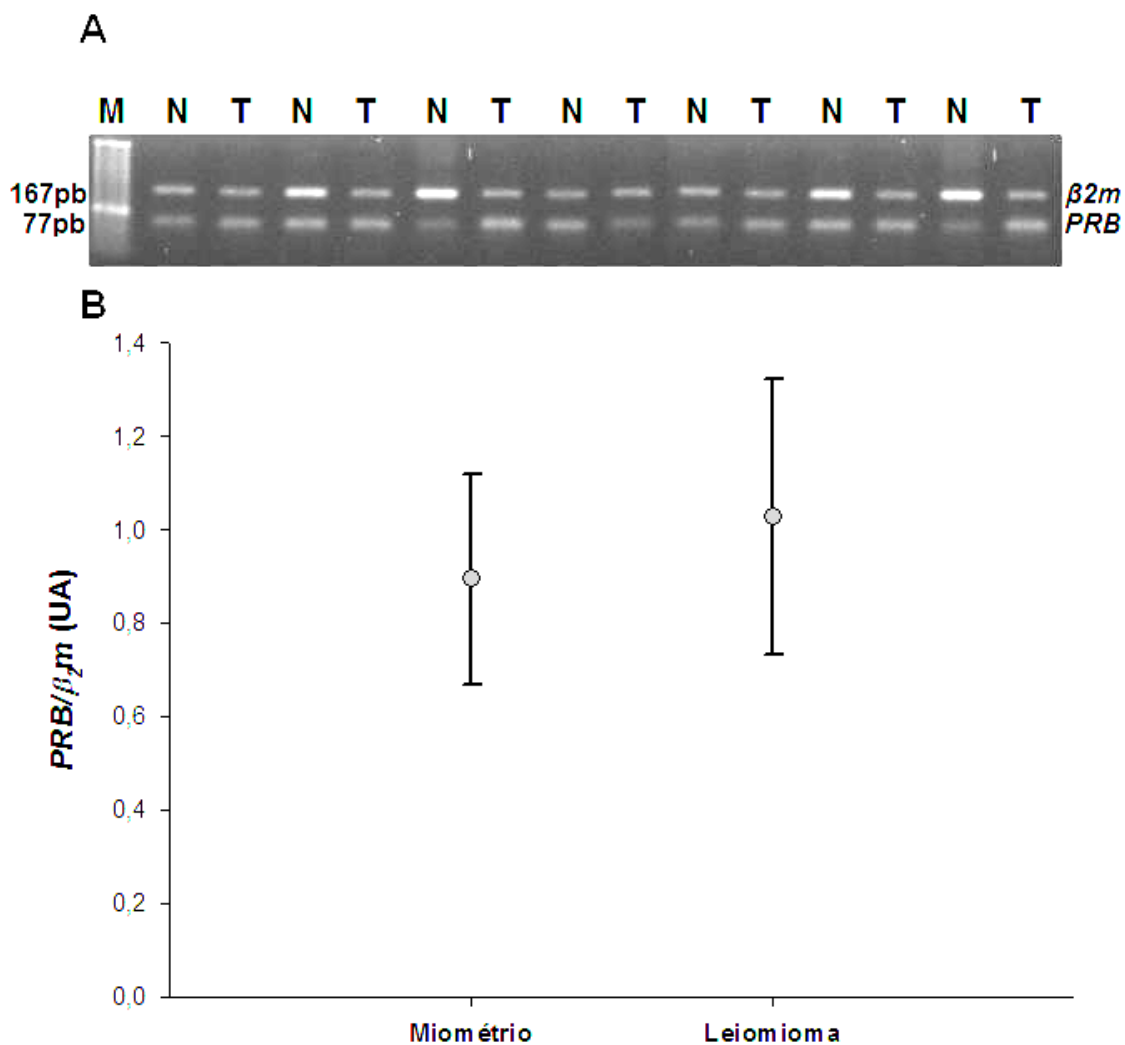


Figura 10. Expressão gênica de *PRB* em miométrio e leiomioma. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da RT-PCR dos genes β_2m e *PRB*, em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T) (M marcador de pares de bases). (B) Gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação PRB/β_2m (média \pm EP), em unidades arbitrárias. Não foi observada diferença significativa entre a expressão gênica de *PRB* de miométrio e de leiomioma ($P=0,104$).

2. Análise dos Níveis de Proteína dos Receptores de Progesterona

A proteína PRA não teve diferença entre as amostras de miométrio ($0,7430 \pm 0,0937$) e de leiomioma ($0,7665 \pm 0,0948$) (teste *t* pareado de Student, $P=0,605$). Resultado similar também foi encontrado na expressão da proteína PRB, sem diferença significativa entre miométrio ($0,7153 \pm 0,0761$) e leiomioma ($0,7056 \pm 0,0634$) (teste *t* pareado de Student, $P=0,852$). A figura 11 apresenta a autoradiografia obtida pela técnica de *Western Blot* e os gráficos dos resultados obtidos na quantificação de PRA/ β -Tubulina e PRB/ β -Tubulina, expressos como média \pm erro padrão em unidades arbitrárias.

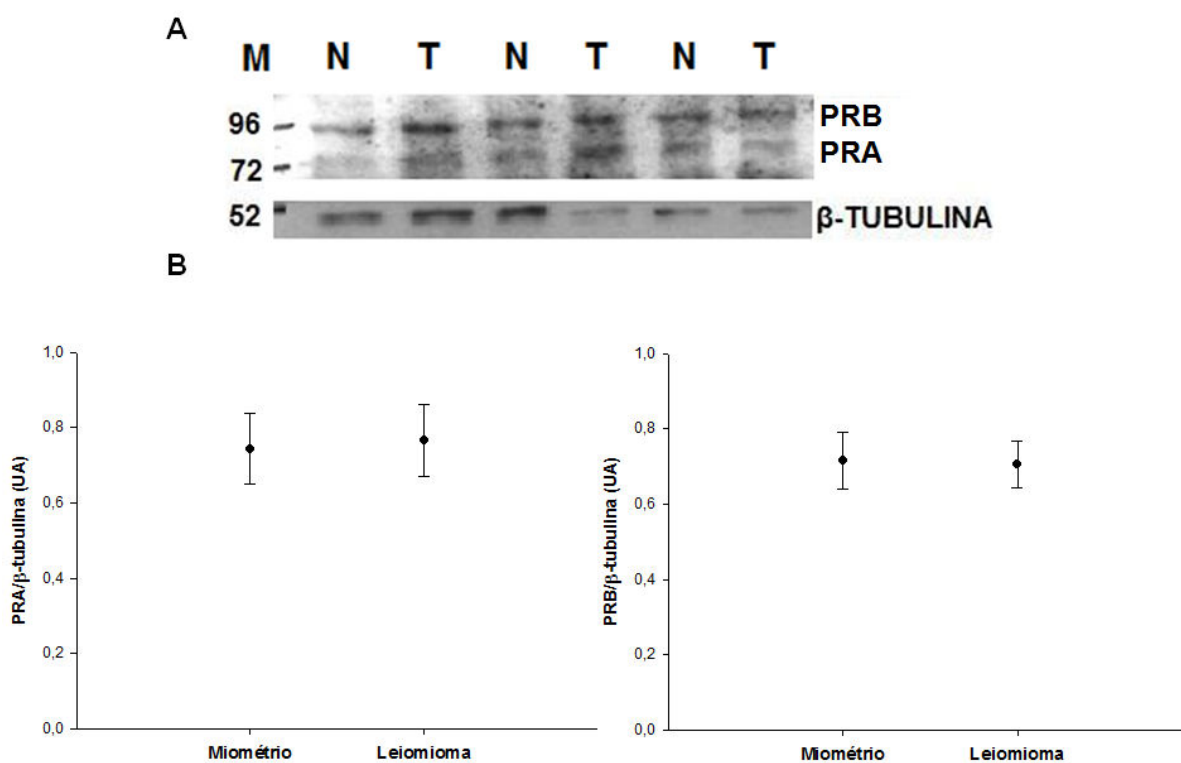


Figura 11. Análise proteica de PRA e PRB em miométrio e leiomioma. (A) Autorradiografia representativa do *Western Blot* de PRB (114kDa) e de PRA(94kDa) em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T), normalizadas com a banda correspondente de β -Tubulina (50kDa) (M marcador molecular). (B) Gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação PRA/ β -Tubulina e PRB/ β -Tubulina (média \pm EP), em unidades arbitrárias. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão proteica de PRA ($P=0,605$) e de PRB ($P=0,852$) em miométrio e leiomioma.

3. Análise dos Níveis de mRNA do Gene *p53*

A expressão do mRNA do *p53* foi avaliada em miométrio [0,7434 (0,6879-0,8040)] e em leiomioma [0,8324 (0,6538-1,4207)], mostrando um aumento significativo na expressão de *p53* em leiomioma (Teste *T* de Wilcoxon, $P=0,030$). Estes dados são apresentados na figura 12 como valores individuais de expressão gênica.

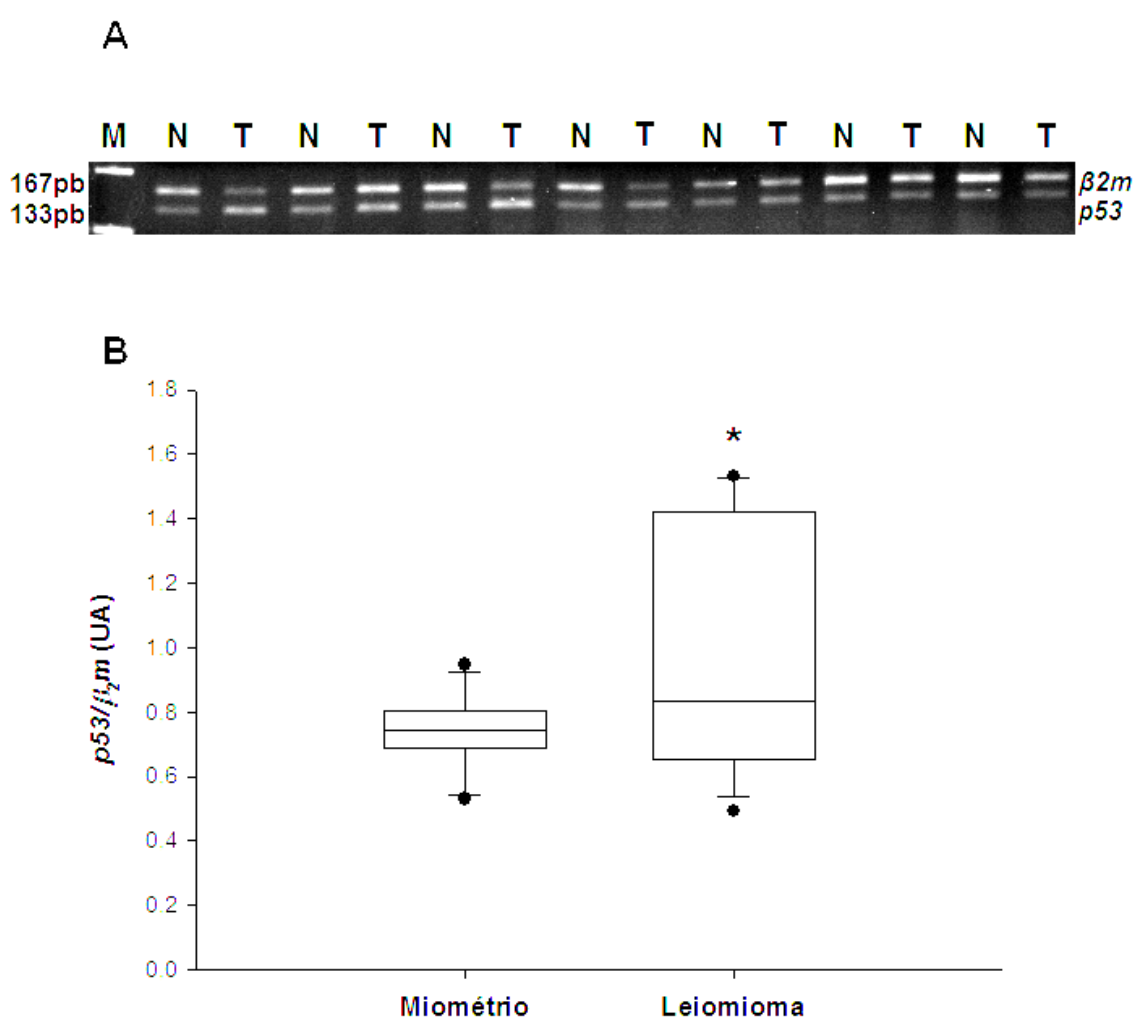


Figura 12. Expressão gênica de *p53* em miométrio e leiomioma. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da RT-PCR dos genes β_2m e *p53*, em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T) (M marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação $p53/\beta_2m$ (mediana e intervalo interquartilis 25-75), em unidades arbitrárias. * $P=0,030$.

4. Análise dos Níveis de Proteína p53

A análise dos níveis proteicos de p53 revela uma maior expressão de p53 nas amostras de leiomioma ($1,0004 \pm 0,0532$) quando comparado com o miométrio ($0,7826 \pm 0,0646$) ($P=0,002$). Estes resultados estão representados na figura 13.

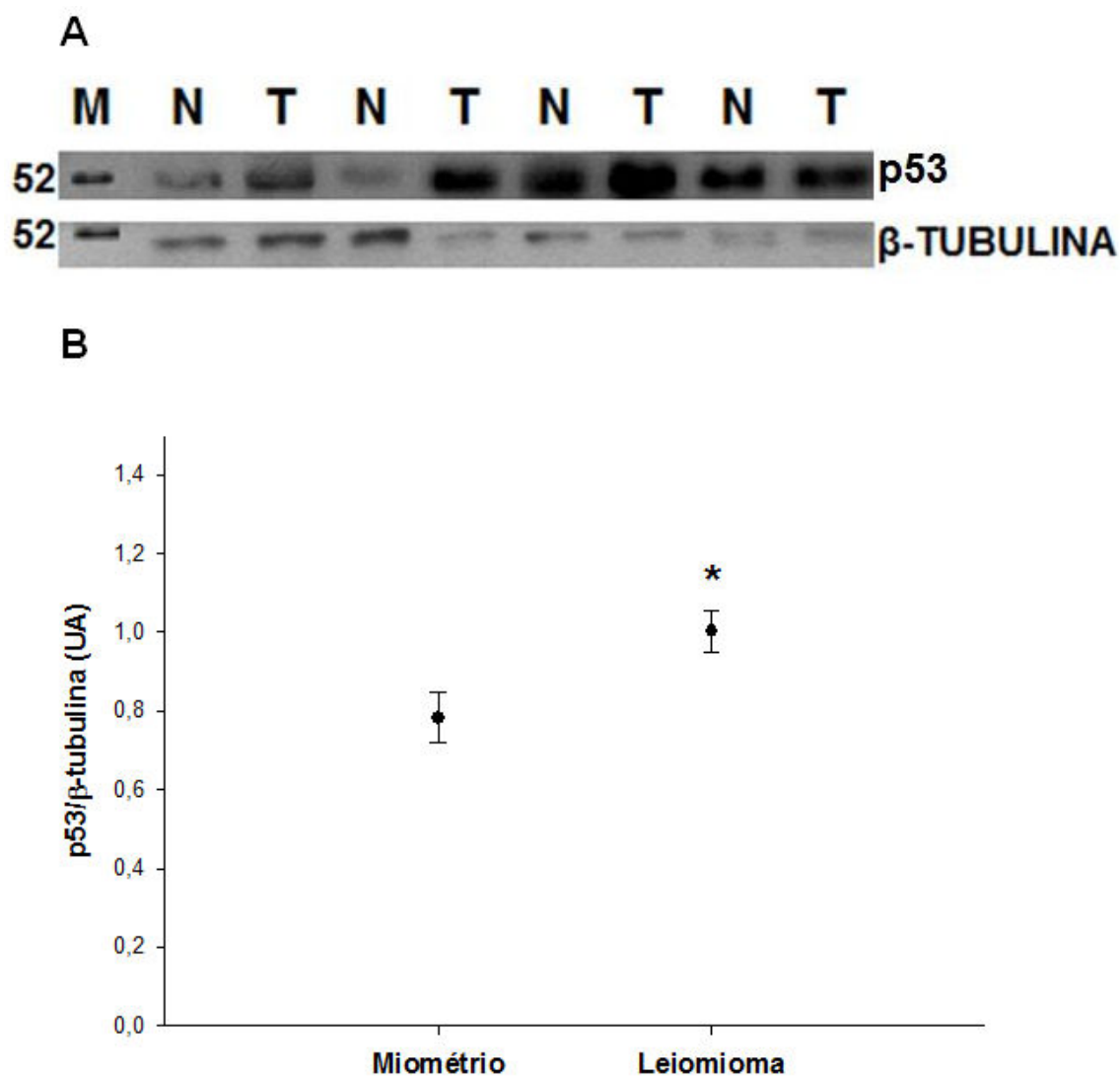


Figura 13. Análise proteica de p53 em miométrio e leiomioma. (A) Auto-radiografia representativa do *Western Blot* da proteína p53 (53kDa), em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T), normalizadas com a banda correspondente de β -Tubulina (50kDa) (M marcador molecular). (B) Gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação p53/ β -Tubulina (média \pm EP), em unidades arbitrárias.* $P=0,002$.

5. Análise dos Níveis de mRNA do Gene *p21*

A expressão do mRNA do *p21* foi avaliada em miométrio [0,6277 (0,4412-0,8606)] e em leiomioma [1,2687 (0,6478-2,0787)], apresentando um aumento na expressão deste gene no leiomioma (Teste *T* de Wilcoxon, $P=0,016$). Estes dados são apresentados na figura 14 como valores individuais de expressão gênica.

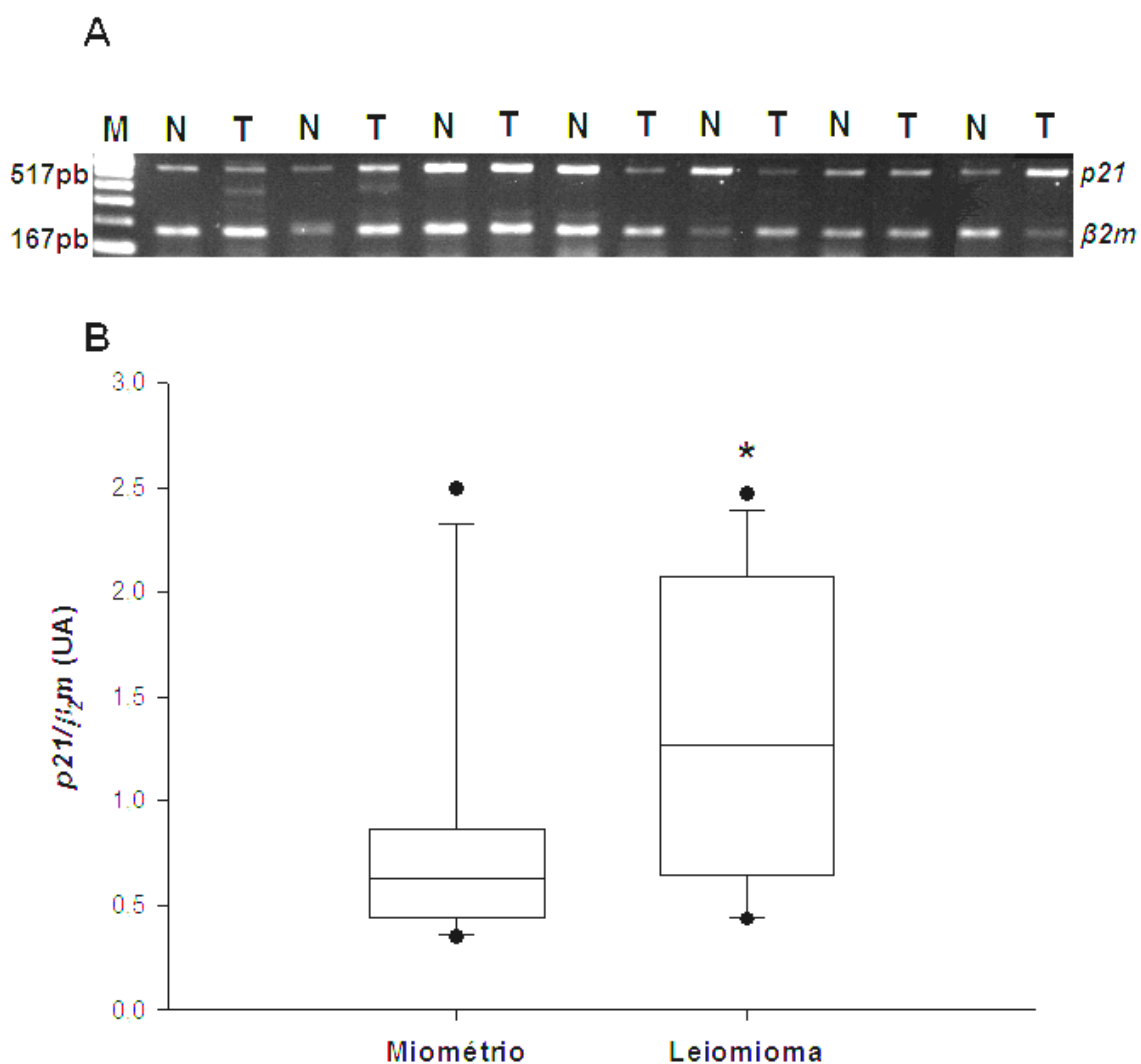


Figura 14. Expressão gênica de *p21* em miométrio e leiomioma. (A) Gel de agarose (1,5%) representativo da RT-PCR dos genes β_2m e *p21*, em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T) (M marcador de pares de bases). (B) gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação $p21/\beta_2m$ (mediana e intervalo interquartis 25-75), em unidades arbitrárias. * $P=0,016$.

6. Análise dos Níveis de Proteína p21

A análise proteica de p21 revela uma maior expressão de p21 nas amostras de leiomioma ($1,0274 \pm 0,1197$) quando comparado com o miométrio ($0,8477 \pm 0,1257$) ($P=0,026$). Estes resultados estão representados na figura 15.

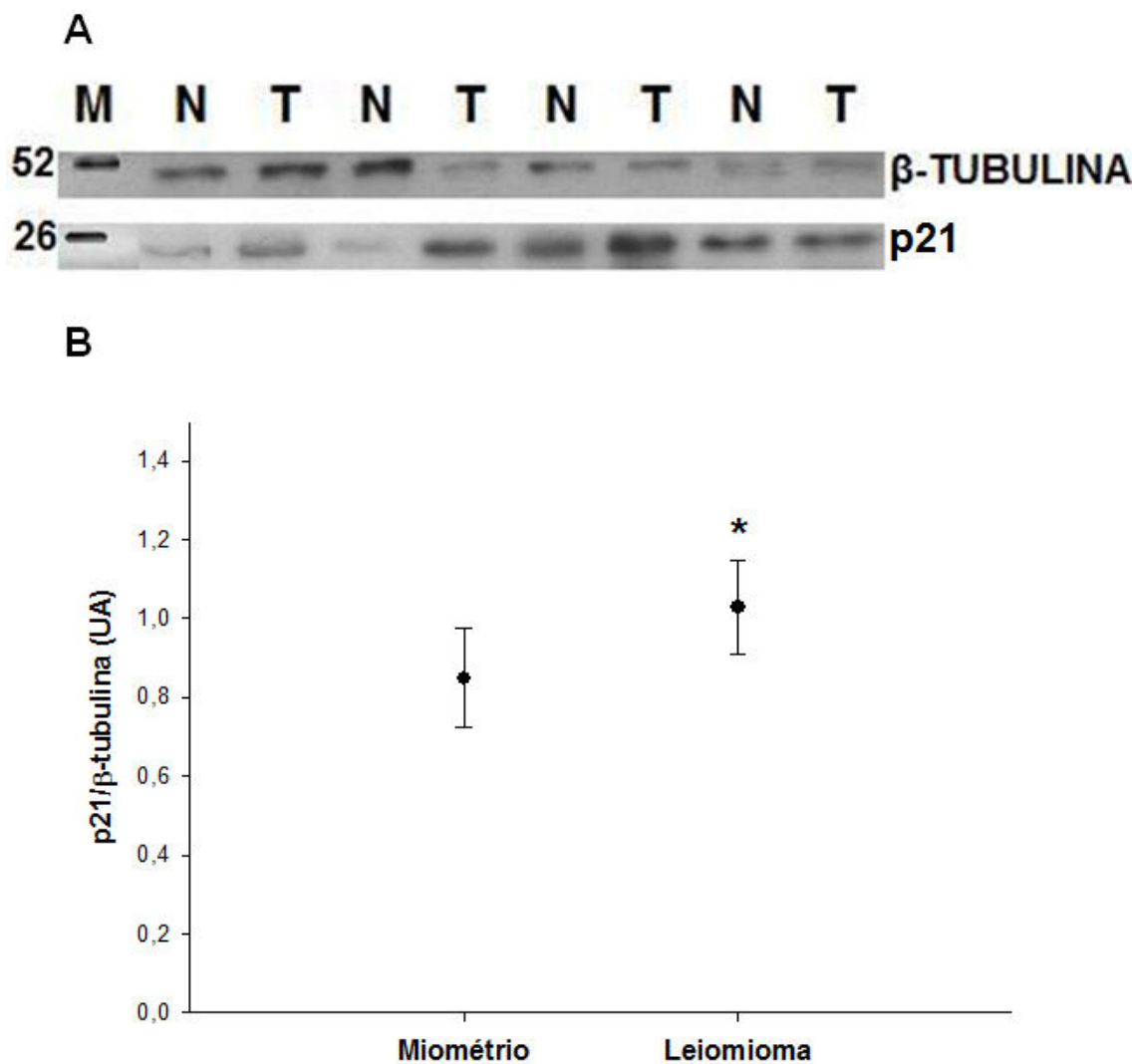


Figura 15. Análise proteica de p21 em miométrio e leiomioma. (A) Auto-radiografia representativa do *Western Blot* das proteínas p21 (21kDa), em amostras de miométrio (N) e leiomioma uterino (T), normalizadas com a banda correspondente de β -Tubulina (50kDa) (M marcador molecular). (B) Gráfico que representa a quantificação das bandas expressa como relação p21/ β -Tubulina (média \pm EP), em unidades arbitrárias. * $P=0,026$.

7. Relação PRA:PRB

A partir da razão dos valores de expressão proteica, foi realizada uma análise de correlação da relação PRA:PRB entre o miométrio e o leiomioma, revelando uma forte correlação dessa razão entre os dois tecidos (correlação de Pearson, $r=0,767$, $P=0,004$). Essa correlação entre os níveis da expressão proteica de PRA e PRB está ilustrada na figura 16. Não houve uma diferença significativa dessa relação entre os dois tecidos estudados (teste t pareado de Student, $P=0,707$). Valores da média \pm EP da relação em miométrio foi $1,0277\pm 0,0933$ e em leiomioma foi $1,0543\pm 0,1060$.

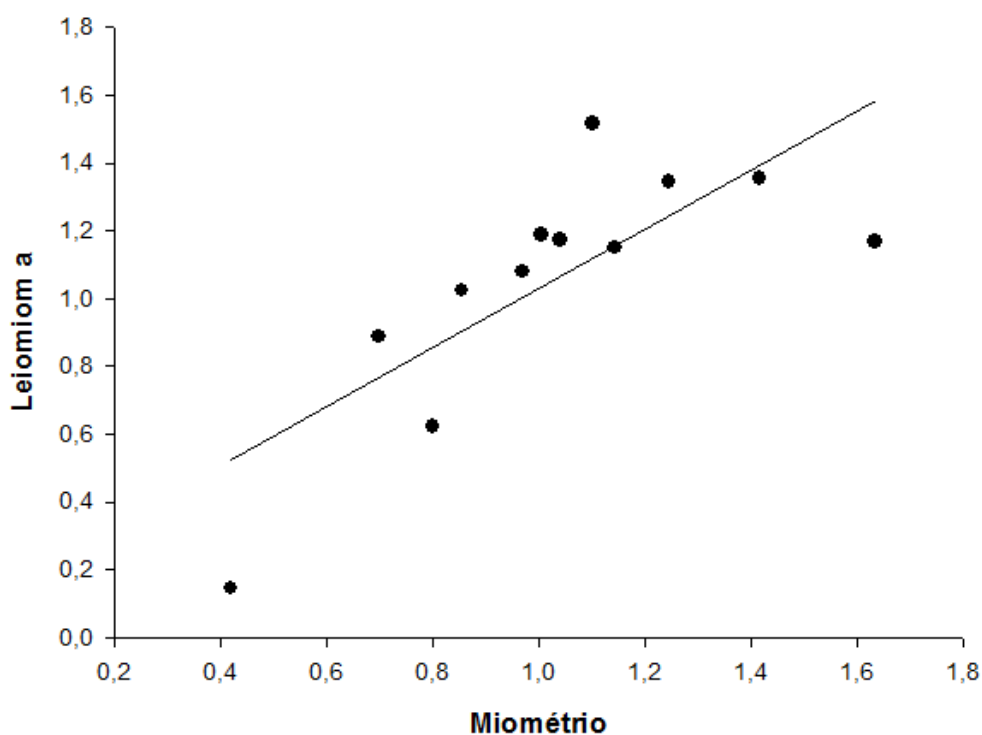


Figura 16. Correlação da relação PRA:PRB de miométrio e leiomioma. Correlação de Pearson, $r=0,767$, $P=0,004$.

DISCUSSÃO

A maioria das histerectomias por leiomiomas ocorre nas pacientes ao final da fase reprodutiva, antes da menopausa [68, 117, 118]. É neste período que a leiomiomatose se torna sintomática e as pacientes, que não desejam mais gestar, se submetem ao tratamento definitivo, a histerectomia. Neste trabalho avaliamos, com técnicas de biologia molecular, o comportamento gênico e proteico da leiomiomatose uterina em amostras de pacientes na pré-menopausa, com média de idade de 46,21 ± 5,15 anos.

Conforme a data da última menstruação, a análise histológica do endométrio e as dosagens hormonais observamos que 11 pacientes estavam na fase folicular do ciclo menstrual quando realizada a histerectomia, enquanto 3 estavam na fase lútea. A fase folicular é caracterizada pela presença de níveis crescentes de estrogênio e baixos de progesterona. Os níveis de estrogênio aumentam rapidamente no final da fase folicular, atingindo um platô 48 horas antes da ovulação. A partir da ovulação ocorre o aumento da progesterona, que caracteriza a segunda fase do ciclo – a fase lútea. [119, 120].

Neste estudo, avaliamos os níveis de mRNA e de proteína dos receptores de progesterona em miométrio e leiomioma, e os resultados encontrados não

mostraram diferenças de expressão nos dois tecidos estudados. A similaridade encontrada na expressão gênica e proteica das isoformas do receptor de progesterona talvez possa estar associada à fase do ciclo, embora numericamente a expressão não seja diferente das pacientes em fase folicular ou lútea. Estudo feito em pacientes com leiomiomas observou um decréscimo no número de receptores de progesterona tanto no leiomioma como no miométrio com o uso de Mifepristone[®], por esse manter um estado de fase folicular aparente [40].

A teoria mais aceita atualmente é que havendo receptores de progesterona, o leiomioma pode aumentar com o uso de progestágenos – visto que ao se fazer o uso de Mifepristone[®], um antagonista da progesterona, os leiomiomas diminuem. Apesar da necessidade de mais estudos randomizados para utilização clínica do Mifepristone[®], é muito interessante a sua ação na leiomiomatose [22]. Estudo que utilizou agonista de GnRH como hormonioterapia adicional para tratar leiomiomas determinou que o uso de estrogênio-progestina não causou alterações no crescimento do leiomioma, porém, o crescimento do leiomioma foi significativo com o uso de progestinas [121]. Os dados *in vitro* podem apoiar esta conclusão clínica, mostrando que a atividade mitótica em leiomiomas foi significativamente maior na terapia com progestina, enquanto a atividade mitótica com estrógeno e progesterona foi a mesma [22, 122, 123].

As isoformas A e B do receptor de progesterona foram analisadas em amostras de corpo lúteo humano, onde a expressão de mRNA e as concentrações de hormônios esteróides foram determinados simultaneamente durante a fase lútea. Nesse estudo, foi observado um predomínio na expressão de mRNA de *PRB* sobre mRNA de *PRA* em todas as amostras analisadas [124].

Fujimoto e colaboradores analisaram a expressão de mRNA das isoformas A e B do receptor de progesterona em miométrio e leiomioma uterino. Em todos os casos de miométrio normal, foi encontrada uma maior expressão de mRNA de *PRA* do que *PRB*, e houve aumento da expressão de mRNA de *PRB* sobre a expressão de mRNA de *PRA* em aproximadamente 60% dos casos de leiomioma uterino. Portanto, a superexpressão relativa do mRNA de *PRB* no leiomioma uterino pode revelar um fenótipo ativado de proliferação progestacional, relacionando essa isoforma com o crescimento do leiomioma uterino [61].

A ausência de diferença significativa dos PRs, em nosso estudo, também pode ser devido ao fato das duas isoformas serem produtos de um único gene, a partir da transcrição de dois promotores e pela tradução de dois códons de iniciação alternativos no mRNA que codifica PRB. As duas proteínas diferem somente pela presença de uma região amino-terminal de 164 amino-ácidos em PRB [49, 125, 126]. Na análise da expressão gênica, diferencia-se o mRNA que codifica PRB, não podendo, entretanto, avaliar diretamente o mRNA que codifica PRA, porque os oligonucleotídeos estão ligados em regiões comuns .

Os PRs também podem atuar mediando respostas não-genômicas da progesterona pela sua capacidade de recrutar e ativar c-src tirosina quinases [127]. Esta pode ser uma via alternativa para a ação da progesterona, contribuindo para explicar a pequena ou inexistente diferença entre a expressão das isoformas PRA e PRB. Embora o significado da ativação desta via, no que diz respeito à fisiologia da progesterona, ainda não esteja definido, é provável que este mecanismo de ativação possa mediar algumas ações não-genômicas rápidas da progesterona [49]. Os PRs também podem ser ativados por estímulos extracelulares que interagem com receptores da membrana da célula ativando as vias de fosforilação intracelular,

incluindo fatores de crescimento e do neurotransmissor catecolaminérgico dopamina [58]. Poderíamos inferir, portanto, que a ação dos PRs no leiomioma possa ocorrer por outras vias, que não foram alvo deste estudo. Anteriormente, nosso grupo verificou a atividade da tirosina quinase do receptor de insulina em miométrio e leiomioma uterino e não observou diferença na expressão desse receptor entre os tecidos estudados [37]. Em outro estudo, avaliamos uma via genômica de regulação de proliferação pela expressão gênica e proteica dos protooncogenes *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* em miométrio e leiomioma uterino e demonstramos que tanto a transcrição como a tradução desses protooncogenes, nos tecidos avaliados, são semelhantes [128].

No presente estudo, a similaridade entre os níveis de mRNA e proteicos dos genes e das proteínas dos receptores de progesterona propiciou a obtenção de uma correlação positiva entre a razão das isoformas PRA e PRB entre o miométrio e o leiomioma. O equilíbrio na expressão dessas duas isoformas pode ser importante para a manutenção do fenótipo benigno de alguns tecidos. Baseado em estudos que envolvem tratamentos com progesterona em células de cultura, os quais demonstraram a atuação dos PRs em combinação com múltiplos fatores de transcrição, pode sugerir que é possível haver uma variabilidade de expressão tecido-específica dos componentes do complexo multiproteico, podendo resultar em atividades diferentes de PRA e PRB na mesma célula, influenciando a resposta das células à progesterona, como proliferar, diferenciar ou morrer [42, 129]. Além disso, como já foi mencionado, a propriedade de transdução de sinal desses receptores pode não se limitar às suas atividades genômicas ou a seus ligantes esteróides.

Ambos PRA e PRB são encontrados no útero em níveis aproximadamente equivalentes [59]. PRA comanda a atividade antiproliferativa, limitando a ação do

estrogênio, que é um possível gerador de efeitos hiperplásicos no útero. PRB apresenta uma atividade proliferativa por remoção de PRA, indicando que o PRA não é necessário apenas para inibir estrogênio que induz hiperplasia, mas também para limitar os efeitos potencialmente negativos da proliferação da proteína PRB [64, 130]. Devido aos efeitos opostos sobre a proliferação das isoformas do PR neste tecido, sugere-se que os níveis de expressão semelhantes, possam desempenhar um papel importante, porque razões aberrantes entre as isoformas dos PRs nos tecidos já foram observadas em cânceres de endométrio [131]. Nosso estudo revelou uma expressão gênica e proteica semelhante das isoformas A e B do receptor de progesterona, o que é compatível com a benignidade da neoplasia. De Vivo e colaboradores (2002) encontraram ainda uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo +331G/A do gene *PR* e o risco de câncer de endométrio, sugerindo que esse polimorfismo contribui para o risco de câncer de endométrio por aumentar a expressão da isoforma PRB [131].

Estudo anterior do nosso grupo verificou ausência de diferença significativa na expressão de mRNA dos PRs entre o tecido de mama normal e o fibroadenoma [113], resultado semelhante ao obtido em miométrio e leiomioma. Porém, no referido estudo, foi observado uma maior expressão proteica das isoformas dos PRs em fibroadenomas comparado à mama normal, ao contrário do verificado no presente estudo. Estudo prévio, realizado com técnicas de RT-PCR para elucidar se a progesterona afeta a expressão de *IGF-1* (*insulin-like growth factor-I*) através da expressão gênica dos receptores de progesterona e contribui no crescimento da neoplasia por essa via, mostrou que os níveis de mRNA de *PRA*, *PRB* e *IGF-1* foram significativamente maiores em leiomiomas quando comparados com o miométrio adjacente. Além disso, demonstrou que a progesterona, ligada ao *PRB*, pode

exercer uma *down-regulation* sobre *IGF-1*, podendo haver inibição nessa regulação de *PRB* por expressão de *PRA*; portanto, o estudo relata a importância da manutenção do equilíbrio entre *PRA:PRB* para limitar o crescimento desse tumor [132].

Sabe-se que a senescência e a integridade gênomicas são quesitos importantes no desenvolvimento de doenças malignas [133] e que a resposta celular ao estresse genotóxico inclui parada do ciclo celular, ativação de reparo do DNA e indução de apoptose [73]. Mediante essas afirmações, nosso estudo ainda propôs a pesquisa do envolvimento dos genes *p53* e *p21* na proteção tecidual contra os leiomiomas uterinos. Muitos estudos relatam que o aparecimento dos leiomiomas não é apenas regulado por fatores hormonais, cabendo aos genes reparadores do DNA e reguladores apoptóticos a explicação dos distúrbios proliferativos [15].

Observamos aumento significativo das expressões gênica e proteica de *p53* nas amostras de leiomioma quando comparadas às amostras do miométrio adjacente. Esse resultado coincide com os estudos em que o nível da proteína *p53* é indetectável em células normais, e aumenta rapidamente em resposta a uma variedade de sinais de estresse [77-81]. Exemplo disso foi demonstrado em estudo imunohistoquímico que investigou a diferença da expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular *p53*, *p21* e *p16* em polipose e adenocarcinoma endometrial, onde foi encontrado maiores índices de proliferação e de expressão de *p53* e de *p21* nos tumores mais indiferenciados ou em estágios mais avançados [134].

Muitos estudos referem que o aumento da expressão da *p53* pode estar envolvido na parada do processo de transformação maligna [88, 91, 96, 135] e que a inativação de *p53* resulta em instabilidade genômica [82]. Resultado de estudo

imunohistoquímico apontou que, enquanto a expressão da proteína p53 é difusa no leiomioma uterino, essa expressão também é um marcador relativamente específico que indica malignidade, porque em uma parte significativa dos leiomiossarcomas, o resultado imunohistoquímico é negativo ou focalmente positivo [136].

Os níveis aumentados de *p53* nos leiomiomas podem ser justificados pelo fato de haver um estresse gerando um aumento da tradução desse gene, que acaba por inibir a degradação de *p53*, acarretando um acúmulo desta proteína na célula afetada [88]. Esse acúmulo pode ser uma característica de benignidade. Mediante aumentos de *p53*, a via do *p21* é ativada, sendo a associação entre os dois genes uma tentativa de reparar e bloquear danos que evoluem para a malignidade [81]. Os níveis basais de *p53* encontrados nas amostras de miométrio desempenham um papel importante na manutenção da saúde normal da célula.

As formas mutadas do *p53* não foram alvo de nosso estudo. Porém, sabe-se que a ativação desse gene contribui para a manifestação do câncer e, como relatam os estudos, ele liga-se a proteínas da família *p53*, mudando a conformação destas, diminuindo sua expressão e a função de supressão tumoral [89, 137].

Uma das funções da proteína *p53* é a de regular diretamente a expressão de *p21*, além de deter danos e/ou crescimento desordenado do DNA, que estão envolvidos no controle do ciclo celular [86]. Em um estudo que utilizou imagem de citometria imunohistoquímica para quantificar a expressão de *p21* e *p53* em câncer de mama invasivo, foi mostrada a associação significativa entre esses genes, sugerindo uma estabilização funcional e, portanto, detenção de possíveis danos (instabilidade genética) na fase G1/S do ciclo celular [104].

Nesta pesquisa, a expressão do gene e da proteína *p21* mostrou-se aumentada nas amostras de leiomioma em comparação com o miométrio adjacente.

O *p21* apresenta duas ações antagônicas: inibe a apoptose (supressora tumoral) ou provoca efeitos antiproliferativos (anti-apoptóticos). A capacidade de *p21* para induzir a parada do ciclo celular após estresse pode proteger as células da apoptose ocasionada pelo estresse. A atividade antiapoptótica do *p21* pode contribuir para que ele atue como oncogene. Em contrapartida, a função de *p21* como inibidora da proliferação celular pode contribuir para a habilidade do *p21* atuar como gene supressor de tumor [138]. Estudos prévios em pacientes que apresentavam endometriose demonstraram uma ação antiapoptótica do *p21*, onde foi observada a expressão diminuída de *p21* no carcinoma comparado à hiperplasia de endométrio, o que poderia ser uma diferença no processo da não transformação neoplásica maligna [139]. E quando miométrio e leiomioma foram comparados em um estudo imunocitoquímico, não houve diferenças aparentes na imunocoloração de *p21* em ambos os tecidos e, portanto, concluiu-se que a proteína *p21* não estava associada ao crescimento de leiomiomas [140].

Anteriormente, nosso grupo observou aumento significativo na expressão gênica de *p21* em fibroadenomas, sem haver uma diferença na expressão proteica entre o fibroadenoma e a mama normal. Ao fazer parada do ciclo celular para reparar danos por estresse, *p21* pode exercer função pró-oncogênica por uma antiapoptose [114]. A expressão aumentada da proteína *p21* restringiu-se aos casos de leiomiossarcoma quando comparados aos leiomiomas em estudo imunohistoquímico, sugerindo que a proteína *p21* é um elemento importante no desenvolvimento de leiomiossarcomas [141].

A expressão de *p21* em leucemia mostrou uma capacidade de *p21* em fornecer proteção contra a apoptose, apesar da perda da parada em G1, resume a ideia de que o efeito anti-apoptótico de *p21* não é um epifenômeno da parada do

ciclo celular. Um completo entendimento de *p21* nos efeitos anti-apoptóticos é biologicamente significativo, porque neoplasias diversas expressam elevados níveis de *p21*. A alternância entre efeitos anti-apoptóticos e pró-apoptóticos da *p21* pode ser a modulação de um processo normal de desenvolvimento. Na definição de leucemia, efeitos anti-apoptóticos da *p21* proporcionam vantagem seletiva de formas leucêmicas menos agressivas e a não-transformação [106].

A expressão e a atividade da *p21* e seu controle sobre o ciclo celular é diferente entre os tecidos do organismo, por talvez seguir diferentes percursos apoptóticos e vias pós-transcricionais. Além disso, o acúmulo da proteína *p21*, assim como acontece com a proteína *p53*, pode ser um fator que restrinja a transformação da neoplasia benigna e a torne limitada, evitando a perda da diferenciação celular.

Por fim, a leiomiomatose uterina está sob ação de inúmeros e intrincados sistemas de controle, seja hormonal – sistêmico e local, seja do ciclo celular por supressores tumorais. Entender a fisiopatologia desta neoplasia benigna é importante para que abordagens terapêuticas mais conservadoras possam ser desenvolvidas.

CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou uma maior expressão gênica e proteica de p53 e de p21 nos leiomiomas uterinos quando comparados com o miométrio adjacente, o que pode indicar possível participação desses genes na tentativa de proteção e no controle dessa doença.

Em relação às isoformas A e B do receptor de progesterona, não houve diferença nas expressões gênica e proteica desses receptores nas amostras de leiomioma uterino quando comparadas às amostras de miométrio adjacente, podendo ser uma resposta característica da benignidade da lesão. Entretanto, para essa resposta ser conclusiva, são necessários estudos envolvendo outras vias de atuação dos receptores de progesterona nas células uterinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marieb, E.N., *et al*, *Anatomia e Fisiologia*. 3^a ed. 2009, Porto Alegre: Artmed.
2. Spencer, T.E., *et al.*, *Comparative developmental biology of the mammalian uterus*. *Curr Top Dev Biol*, 2005. **68**: p. 85-122.
3. De Cuneo, M.F.R., R.D.; Lacuara, J.L., *Sistema Genital Feminino*, in *Fisiologia Humana de Houssay*, H.E.H. Cingolani, A.B., Editor. 2004, Artmed: Porto Alegre. p. 706.
4. Andersen, J. and R.L. Barbieri, *Abnormal gene expression in uterine leiomyomas*. *J Soc Gynecol Investig*, 1995. **2**(5): p. 663-72.
5. Geimonen, E., *et al.*, *Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(4): p. 1177-85.
6. Sutton, C.J., *Treatment of large uterine fibroids*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1996. **103**(6): p. 494-6.
7. Crum, C., *The Female Genital Tract.*, in *Pathologic Basis of Disease*, R.S.K. Cotran, V. ; Collins, T., Editor. 1999, WB Saunders, Co: Philadelphia.
8. Goldberg, J., *et al.*, *Pregnancy outcomes after treatment for fibromyomata: uterine artery embolization versus laparoscopic myomectomy*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **191**(1): p. 18-21.
9. Stovall, D.W., *Clinical symptomatology of uterine leiomyomas*. *Clin Obstet Gynecol*, 2001. **44**(2): p. 364-71.
10. Stewart, E.A., *Uterine fibroids*. *Lancet*, 2001. **357**(9252): p. 293-8.
11. Okolo, S., *Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008. **22**(4): p. 571-88.

12. Day Baird, D., et al., *High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(1): p. 100-7.
13. Walker, C.L. and E.A. Stewart, *Uterine fibroids: the elephant in the room*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1589-92.
14. Wise, L.A., et al., *Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study*. Am J Epidemiol, 2004. **159**(2): p. 113-23.
15. Martel, K.M., et al., *Apoptosis in human uterine leiomyomas*. Semin Reprod Med, 2004. **22**(2): p. 91-103.
16. Montenegro, M.R.F., M., *Patologia: Processos Gerais*. 4^a ed. 2004, São Paulo: Atheneu.
17. Levy, B., T. Mukherjee, and K. Hirschhorn, *Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **121**(1): p. 1-8.
18. Pron, G., et al., *Hysterectomy for complications after uterine artery embolization for leiomyoma: results of a Canadian multicenter clinical trial*. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 2003. **10**(1): p. 99-106.
19. Hovsepian, D.M., et al., *Quality improvement guidelines for uterine artery embolization for symptomatic leiomyomata*. J Vasc Interv Radiol, 2004. **15**(6): p. 535-41.
20. Lefebvre, G., et al., *The management of uterine leiomyomas*. J Obstet Gynaecol Can, 2003. **25**(5): p. 396-418; quiz 419-22.
21. Lefebvre, G., *Hysterectomy: the right to choose*. J Obstet Gynaecol Can, 2003. **25**(3): p. 178-9, 180-1.
22. Rackow, B.W. and A. Arici, *Options for medical treatment of myomas*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2006. **33**(1): p. 97-113.
23. Vercellini, P., et al., *Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment before abdominal myomectomy: a controlled trial*. Fertil Steril, 2003. **79**(6): p. 1390-5.
24. Bergamini, V., et al., *Laparoscopic radiofrequency thermal ablation: a new approach to symptomatic uterine myomas*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **192**(3): p. 768-73.
25. Pron, G., et al., *The Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial. Part 1. Baseline patient characteristics, fibroid burden, and impact on life*. Fertil Steril, 2003. **79**(1): p. 112-9.
26. MAYO, 2010. *Uterine fibroids*. <http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM00757>. Acesso em 07 de fevereiro de 2010.

27. McPherson, K., et al., *Severe complications of hysterectomy: the VALUE study*. BJOG, 2004. **111**(7): p. 688-94.
28. Hassan, M.H., et al., *Adenovirus-mediated delivery of a dominant-negative estrogen receptor gene in uterine leiomyoma cells abrogates estrogen- and progesterone-regulated gene expression*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(10): p. 3949-57.
29. Treloar, S.A., et al., *Pathways to hysterectomy: insights from longitudinal twin research*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **167**(1): p. 82-8.
30. Schwartz, S.M., L.M. Marshall, and D.D. Baird, *Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 5**: p. 821-7.
31. Flake, G.P., J. Andersen, and D. Dixon, *Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(8): p. 1037-54.
32. Otubu, J.A., et al., *Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **143**(2): p. 130-3.
33. Giudice, L.C., et al., *Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(5): p. 1115-22.
34. Brandon, D.D., et al., *Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1876-81.
35. Strawn, E.Y., Jr., et al., *Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro*. Am J Obstet Gynecol, 1995. **172**(6): p. 1837-43; discussion 1843-4.
36. Rein, M.S., *Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 5**: p. 791-3.
37. Toscani, G.K., et al., *Gene expression and tyrosine kinase activity of insulin receptor in uterine leiomyoma and matched myometrium*. Arch Gynecol Obstet, 2004. **270**(3): p. 170-3.
38. Miragaya, M.H., et al., *Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*)*. Theriogenology, 2004. **61**(4): p. 663-71.
39. Friedman, A.J., et al., *A prospective, randomized trial of gonadotropin-releasing hormone agonist plus estrogen-progestin or progestin "add-back" regimens for women with leiomyomata uteri*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(6): p. 1439-45.
40. Steinauer, J., et al., *Systematic review of mifepristone for the treatment of uterine leiomyomata*. Obstet Gynecol, 2004. **103**(6): p. 1331-6.
41. Schuchard, M., et al., *Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes*. Endocr Rev, 1993. **14**(6): p. 659-69.

42. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells*. Breast Cancer Res, 2002. **4**(5): p. 187-90.
43. Mulac-Jericevic, B. and O.M. Conneely, *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors*. Reproduction, 2004. **128**(2): p. 139-46.
44. Takimoto, G.S., et al., *Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 209-19.
45. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Physiological action of progesterone in target tissues*. Endocr Rev, 1997. **18**(4): p. 502-19.
46. Li, X., D.M. Lonard, and B.W. O'Malley, *A contemporary understanding of progesterone receptor function*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(10-11): p. 669-78.
47. Mote, P.A., J.D. Graham, and C.L. Clarke, *Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast*. Ernst Schering Found Symp Proc, 2007(1): p. 77-107.
48. Lonard, D.M. and W. O'Malley B, *Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation*. Mol Cell, 2007. **27**(5): p. 691-700.
49. Conneely, O.M. and J.P. Lydon, *Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms*. Steroids, 2000. **65**(10-11): p. 571-7.
50. Richer, J.K., et al., *Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5209-18.
51. Kastner, P., et al., *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1603-14.
52. McKenna, N.J. and B.W. O'Malley, *Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **949**: p. 3-5.
53. Arnett-Mansfield, R.L., et al., *Subnuclear distribution of progesterone receptors A and B in normal and malignant endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1429-42.
54. Arnett-Mansfield, R.L., et al., *Focal subnuclear distribution of progesterone receptor is ligand dependent and associated with transcriptional activity*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(1): p. 14-29.
55. Gronemeyer, H., et al., *Progestin receptors: isoforms and antihormone action*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(1-3): p. 271-8.

56. Li, A.J., R.L. Baldwin, and B.Y. Karlan, *Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**(1): p. 22-7.
57. Mote, P.A., et al., *Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **72**(2): p. 163-72.
58. Conneely, O.M., B. Mulac-Jericevic, and J.P. Lydon, *Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 771-8.
59. Maruo, T., et al., *Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis*. Steroids, 2000. **65**(10-11): p. 585-92.
60. Maruo, T., et al., *Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(3): p. 207-20.
61. Fujimoto, J., et al., *Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma*. Tumour Biol, 1998. **19**(2): p. 126-31.
62. Mulac-Jericevic, B., et al., *Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9744-9.
63. Mulac-Jericevic, B., et al., *Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1751-4.
64. Viville, B., et al., *Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium*. Hum Reprod, 1997. **12**(4): p. 815-22.
65. Kawaguchi, K., et al., *Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle*. Am J Obstet Gynecol, 1989. **160**(3): p. 637-41.
66. Smith, S.K., *The regulation of fibroid growth: time for a re-think?* Br J Obstet Gynaecol, 1993. **100**(11): p. 977-9.
67. Wilson, E.A., F. Yang, and E.D. Rees, *Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues*. Obstet Gynecol, 1980. **55**(1): p. 20-4.
68. Buttram, V.C., Jr., *Uterine leiomyomata--aetiology, symptomatology and management*. Prog Clin Biol Res, 1986. **225**: p. 275-96.
69. Aaronson, S.A., *Growth factors and cancer*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1146-53.
70. Basu, A. and S. Haldar, *The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(12): p. 1099-109.

71. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1059-65.
72. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
73. Yoshida, K., *Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage*. Trends Mol Med, 2008. **14**(7): p. 305-13.
74. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
75. Milner, J., *Structures and functions of the tumor suppressor p53*. Pathol Biol (Paris), 1997. **45**(10): p. 797-803.
76. Gompel, A., et al., *Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis*. Maturitas, 2001. **38**(1): p. 39-44.
77. Oren, M., et al., *Regulation of p53: intricate loops and delicate balances*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 865-71.
78. D'Orazi, G., et al., *Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 11-9.
79. Samuels-Lev, Y., et al., *ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 781-94.
80. Sykes, S.M., et al., *Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 841-51.
81. Tang, Y., et al., *Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 827-39.
82. Stewart, Z.A. and J.A. Pietsenpol, *p53 Signaling and cell cycle checkpoints*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(3): p. 243-63.
83. Borresen-Dale, A.L., *TP53 and breast cancer*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 292-300.
84. Osin, P.P. and S.R. Lakhani, *The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis*. Breast Cancer Res, 1999. **1**(1): p. 36-40.
85. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
86. Kastan, M.B., et al., *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. Cell, 1992. **71**(4): p. 587-97.
87. Lee, J.M. and A. Bernstein, *p53 mutations increase resistance to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5742-6.

88. Horn, H.F. and K.H. Vousden, *Coping with stress: multiple ways to activate p53*. *Oncogene*, 2007. **26**(9): p. 1306-16.
89. Jung, M.S., et al., *p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor*. *Oncogene*, 2001. **20**(41): p. 5818-25.
90. Olivier, M., et al., *The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users*. *Hum Mutat*, 2002. **19**(6): p. 607-14.
91. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 594-604.
92. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. *Science*, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
93. Li, Y.J., et al., *Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer*. *Oncogene*, 1995. **10**(3): p. 599-601.
94. Mousses, S., et al., *Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(6): p. 1089-92.
95. Shiohara, M., et al., *Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies*. *Blood*, 1994. **84**(11): p. 3781-4.
96. Chen, P.L., et al., *Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene*. *Science*, 1990. **250**(4987): p. 1576-80.
97. Reich, N.C., M. Oren, and A.J. Levine, *Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53*. *Mol Cell Biol*, 1983. **3**(12): p. 2143-50.
98. Oren, M., *p53: the ultimate tumor suppressor gene?* *FASEB J*, 1992. **6**(13): p. 3169-76.
99. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. *Oncogene*, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
100. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. *Nature*, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
101. Alberts, B., et al., *Biologia Molecular da Célula*. 4^a ed. 2004, Porto Alegre: Artmed.
102. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
103. Ostrakhovitch, E.A. and M.G. Cherian, *Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **423**(2): p. 351-61.

104. Ceccarelli, C., et al., *Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators*. Int J Cancer, 2001. **95**(2): p. 128-34.
105. Suzuki, A., et al., *Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP*. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 931-9.
106. Steinman, R.A. and D.E. Johnson, *p21WAF1 prevents down-modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis*. Mol Med, 2000. **6**(9): p. 736-49.
107. Baptiste-Okoh, N., A.M. Barsotti, and C. Prives, *Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner*. Cell Cycle, 2008. **7**(9): p. 1133-8.
108. Moreno, C.S., et al., *Evidence that p53-mediated cell-cycle-arrest inhibits chemotherapeutic treatment of ovarian carcinomas*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e441.
109. Lewin, B., *Genes VII*. 1^a ed. 2000, Porto Alegre: Artmed.
110. Cericatto, R., et al., *Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features*. Steroids, 2005. **70**(3): p. 153-60.
111. Orcy, R.B., et al., *Insulin receptor tyrosine kinase activity and substrate 1 (IRS-1) expression in human myometrium and leiomyoma*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **123**(1): p. 107-10.
112. Brum, I.S., et al., *Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation*. Horm Res, 2003. **60**(5): p. 209-14.
113. Branchini, G., et al., *Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas*. Endocrine, 2009. **35**(3): p. 459-66.
114. Schneider, L., et al., *Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue*. Endocrine, 2009. **35**(1): p. 118-22.
115. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
116. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
117. Borsari, R., et al., *Genic expression of the uterine leiomyoma in reproductive-aged women after treatment with goserelin*. Fertil Steril, 2009.

118. *Myomas and reproductive function*. Fertil Steril, 2008. **90**(5 Suppl): p. S125-30.
119. Muizzuddin, N., et al., *Effect of systemic hormonal cyclicality on skin*. J Cosmet Sci, 2005. **56**(5): p. 311-21.
120. Hall, G. and T.J. Phillips, *Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(4): p. 555-68; quiz 569-72.
121. Young, S.L., A. Al-Hendy, and J.A. Copland, *Potential nonhormonal therapeutics for medical treatment of leiomyomas*. Semin Reprod Med, 2004. **22**(2): p. 121-30.
122. Schweppe, K.W., *Progestins and uterine leiomyoma*. Gynecol Endocrinol, 1999. **13 Suppl 4**: p. 21-4.
123. Mutter, G.L., et al., *The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators*. Mod Pathol, 2008. **21**(5): p. 591-8.
124. Misao, R., et al., *Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(11): p. 1045-52.
125. Mote, P.A., et al., *Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis*. J Clin Pathol, 2001. **54**(8): p. 624-30.
126. Briton-Jones, C., et al., *Ratio of mRNA expression of progesterone receptor isoforms AB is to B in human oviduct mucosal cells during the ovulatory cycle*. J Assist Reprod Genet, 2005. **22**(11-12): p. 429-35.
127. Boonyaratanakornkit, V., et al., *Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 269-80.
128. Ferrari, A.L., et al., *Expressão dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio normal e mioma humanos*. Rev Bras Ginecol Obstet. 2006; **28**(10): 590-95.
129. Gompel, A., et al., *Steroid hormones and proliferation, differentiation and apoptosis in breast cells*. Maturitas, 2004. **49**(1): p. 16-24.
130. Giangrande, P.H., et al., *The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 3102-15.
131. De Vivo, I., et al., *A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12263-8.

132. Ying, Z. and Z. Weiyuan, *Dual actions of progesterone on uterine leiomyoma correlate with the ratio of progesterone receptor A:B*. *Gynecol Endocrinol*, 2009. **25**(8): p. 520-3.
133. Romanov, S.R., et al., *Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes*. *Nature*, 2001. **409**(6820): p. 633-7.
134. Buchynska, L.G. and I.P. Nesina, *Expression of the cell cycle regulators p53, p21(WAF1/CIP1) and p16(INK4a) in human endometrial adenocarcinoma*. *Exp Oncol*, 2006. **28**(2): p. 152-5.
135. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 323-31.
136. O'Neill, C.J., et al., *Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential*. *Histopathology*, 2007. **50**(7): p. 851-8.
137. Li, Y. and C. Prives, *Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function?* *Oncogene*, 2007. **26**(15): p. 2220-5.
138. Gartel, A.L. and A.L. Tyner, *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(8): p. 639-49.
139. Palazzo, J.P., et al., *Immunohistochemical localization of p21(WAF1/CIP1) in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissues*. *Hum Pathol*, 1997. **28**(1): p. 60-6.
140. Sendemir, A., et al., *Expression of sex hormone-binding globulin, oxytocin receptor, caveolin-1 and p21 in leiomyoma*. *Gynecol Endocrinol*, 2008. **24**(2): p. 105-12.
141. Leiser, A.L., et al., *Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma*. *Gynecol Oncol*, 2006. **101**(1): p. 86-91.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: “Expressão Gênica e Proteica das Isoformas A e B do Receptor de Progesterona, de p53 e de p21 em Miométrio e Leiomioma Uterino”.

Prezada Sra.:

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. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal do útero e levar a formação de tumores como os leiomiomas uterinos. 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 informar dados sobre sua história ginecológica e obstétrica, uma coleta sanguínea no dia da sua cirurgia e a permitir que um pequeno fragmento do seu tumor (10 mm x 5 mm) e do tecido adjacente normal (10 mm x 5 mm) que o envolve, sejam encaminhados para estudo genético. O restante do tumor será destinado ao exame histopatológico normal.

Quanto à coleta sanguínea, a Sra. será submetida à coleta de 10 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são mínimos, sendo a ocorrência de pequenos hematomas a alteração mais comum.

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.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 3308.3559), a Profa. Dra. Helena von Eye Corleta (51 3311.5699) e Vanessa Lora (51 3308.3559). Caso a Sra. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

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.

Local e data _____

Paciente ou responsável

Pesquisador _____

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA ESTUDO DE TÉCNICAS DE RT-PCR E *WESTERN BLOT* NA AVALIAÇÃO DE LEIOMIOMAS UTERINOS:

Caso Nº:

Registro Prontoário:

Iniciais do nome:

Data do procedimento cirúrgico:

Idade:

Raça declarada:

Peso:

Altura:

IMC:

Idade da menarca (primeira menstruação):

Paridade: G ___ P ___ C ___ A ___

Primeira gestação no termo aos ___ anos

Datas de início dos 3 últimos ciclos menstruais e duração do fluxo:

1- ___ / ___ / 20___, fluxo de ___ dias;

2- ___ / ___ / 20___, fluxo de ___ dias;

3- ___ / ___ / 20___, fluxo de ___ dias.

Fase do ciclo em que foi realizada a cirurgia (após resultados das dosagens hormonais e de exame anátomo-patológico):

() Fase folicular inicial;

() Fase folicular tardia;

() Fase ovulatória

() Fase lútea inicial;

() Fase lútea tardia.