

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

Expressão protéica das isoformas do receptor de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  e da aromatase  
em miométrio normal e leiomioma uterino

Anelise Olmos Grings

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2010

**G867e Grings, Anelise Olmos**

Expressão protéica das isoformas do receptor de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  e da aromatase em miométrio normal e leiomioma uterino / Anelise Olmos Grings ; orient. Edison Capp. – 2010.

57 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Leiomioma 2. Miométrio 3. Aromatase 4. Receptor alfa de estrogênio 5. Receptor beta de estrogênio I. Capp, Edison II. Título.

NLM: WP 459

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	7
INTRODUÇÃO .....	9
REVISÃO DA LITERATURA .....	13
1 Estrogênio e seus receptores: alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ).....	13
2 Expressão de RE $\alpha$ e RE $\beta$ em leiomiomas e miométrio normal.....	15
3 Aromatase.....	21
JUSTIFICATIVA .....	26
OBJETIVO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
ARTIGO EM INGLÊS - Protein expression of estrogen receptors (ER $\alpha$ and ER $\beta$ ) and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma.....	37
CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	54
ANEXOS .....	55
Anexo 1 - Protocolo de estudo de técnicas de RT-PCR na avaliação de Miomas e do Miométrio Normal.....	55
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	56

## **AGRADECIMENTOS**

De acordo com John Donne, nenhum homem é uma ilha. Somos parte do continente. O desenvolvimento e crescimento humanos são, portanto, resultado de uma complexa interação de fatores. Este trabalho espelha a dedicação de várias pessoas a um projeto em comum.

Em primeiro lugar, agradeço à amiga Vanessa Lora, minha companheira de experimentos. Sem tua ajuda e encorajamento constante nestes anos, eu não teria chegado até aqui.

Ao amigo Gustavo Dias Ferreira pela ajuda inestimável no final desta jornada.

Ao Professor Edison Capp pelo otimismo inabalável. Obrigada por acreditar em mim.

À Professora Helena von Eye Corleta, mestre exemplar.

Agradecimentos especiais à minha família e amigos. Meus pais, Helena e José, que me compraram livros e me mostraram o mundo. Às minhas irmãs, Cristiane e Luciane, as forças que movem a minha vida. À Aline Grill Gomes, meio irmã, meio terapeuta: amiga por inteiro. Às amigas Juliana, Sabrina e Adriana: ontem, hoje e sempre. À Denise Gonçalves da Silva Machado, meu anjo da guarda. À Lilica, fonte inesgotável de amor, lealdade, mordidas e arranhões.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AU – arbitrary units

BMI – body mass index

BSA – albumina sérica bovina

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio padrão

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ERE – elemento responsivo ao esteróide

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina

GnRH $\alpha$  – análogo do hormônio liberador de gonadotrofina

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

kDa – quilo-Dalton

$\mu$ L – microlitro

min – minutos

mg - miligramas

mL – mililitro

mm - milímetro

mM – milimolar

RNA $m$  – ácido ribonucléico mensageiro

Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – pirofosfato decahidrato de sódio

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – ortovanadato de sódio

NaCl- cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

OD – Optical densitometry

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride

RE – receptor de estrógeno

RE $\alpha$  – receptor de estrógeno alfa

RE $\beta$  – receptor de estrógeno beta

RNA – ácido ribonucléico

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

TTBS - Tris- Tween 20

## RESUMO

**Introdução:** Miomas são tumores benignos extremamente comuns em mulheres em idade reprodutiva. Constituem um importante problema de saúde pública, uma vez que atualmente o tratamento cirúrgico é o mais eficaz. Os estrógenos parecem ter importante participação no desenvolvimento e crescimento dos miomas. Dentre as hipóteses estudadas para explicar esta influência, destacam-se o aumento da concentração de receptores de estrogênio no tecido miomatoso e a habilidade deste de converter androgênios em estrogênio *in situ*, via aumento da expressão da aromatase. **Métodos:** Foi realizado um estudo caso-controle. Foram obtidas amostras de miomas e miométrios normais de 14 pacientes em idade reprodutiva que se submeteram a histerectomia por miomatose. **Resultados:** Foram avaliadas amostras de leiomioma e miométrio normal de 12 pacientes. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a expressão protéica dos receptores RE $\alpha$ , RE $\beta$  e da aromatase (P= 0,239, P = 0,695 e P = 0,203, respectivamente). **Conclusão:** Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão protéica dos receptores de estrógeno alfa e beta e na expressão protéica da aromatase. Os estudos realizados até o momento em relação a este assunto são controversos e o assunto está longe de ser esclarecido.

## ABSTRACT

**Introduction:** Leiomyomas are common benign tumors of the female reproductive tract. They are a major public health problem since nowadays surgical treatment is the most effective. Evidence suggests that estrogens regulate cell proliferation and myoma growth. This estrogen-mediated effect might be due to different amounts of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) in normal and myoma tissues and overexpression of aromatase P450 in myomas, which is responsible for conversion of androgens to estrogens in situ. **Methods:** Case-control study. Samples were collected from 14 premenopausal women admitted for abdominal hysterectomy due to fibroids. **Results:** We analyzed samples from myoma and normal myometrium from 12 patients. The protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase had no statistical difference between leiomyoma and normal myometrium (P = 0.239, P = 0.695 and P = 0.203, respectively). **Conclusions:** The protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase was similar in leiomyoma and normal myometrium. Studies accomplished so far reveal conflicting data and this subject still needs to be elucidated.



## INTRODUÇÃO

Miomas ou leiomiomas uterinos são tumores monoclonais benignos derivados de células do músculo liso do miométrio (Stewart, 2001). Ocorrem em cerca de 20 a 40 % das mulheres, embora estimativas de autópsias evidenciem incidência de até 77 % em pacientes na menopausa (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006; Cramer SF, Patel A, 1990).

Leiomiomas podem causar morbidade significativa devido a dor pélvica, aumento da frequência urinária, constipação, menorragia, infertilidade e complicações na gestação (Stewart, 2001). Além disso, são a principal causa de laparotomia em mulheres americanas, acarretando cerca de 175.000 histerectomias e 20.000 miomectomias anualmente (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006).

Fatores responsáveis pela formação e regulação do crescimento tumoral são pouco compreendidos. Assume-se que tenham origem multifatorial (Flake e cols., 2003; Parker, 2007a). Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas. Estudos cromossômicos, no entanto, mostram aberrações citogenéticas heterogêneas em cerca de 40% dos casos, sendo cinco as mais frequentes: translocação específica entre os cromossomas 12 e 14, trissomia do 12, deleção do cromossoma 7 e rearranjo envolvendo o braço longo do cromossoma 12 e o braço curto do 6. Assim múltiplos locus gênicos parecem envolvidos (Flake e cols., 2003; Parker, 2007a).

Fatores como idade (pacientes na menopausa), paridade, obesidade e etnicidade (risco 2-3 vezes maior em pacientes afro-americanas do que em

caucasianas) têm sido associados à miomatose (Flake e cols., 2003; Ishikawa e cols., 2009).

Estrógeno e progesterona parecem ter participação central no crescimento dos leiomiomas (Flake e cols., 2003; Parker, 2007b; Marshall e cols., 1998). Miomas são mais prevalentes durante os anos reprodutivos e regredem após a menopausa (Maruo e cols., 2004). Situações que aumentam a exposição a estrógenos, tais como: obesidade e menarca precoce, aumentam sua incidência.

O uso de análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRHa) gera um estado de hipogonadismo hipogonadotrófico semelhante à menopausa, capaz de reduzir o volume uterino e diminuir o tamanho de leiomiomas (Kobayashi e cols., 1997; Bozzini e cols., 2003). Também parece suprimir o crescimento miomatoso por interferir com a expressão de fatores do ciclo celular (Kobayashi e cols., 1997). Esta droga tem sido usada como terapia medicamentosa pré-operatória para diminuir o tamanho dos miomas (Englund e cols., 1998; Maruo e cols., 2004). No entanto, estes tratamentos não são adequados a longo prazo devido ao grande número de efeitos colaterais, como por exemplo, perda de massa óssea e sintomas climatéricos (Rein e cols., 1995; Banu NS, Manyonda IT, 2005). Além disso, 6 meses após descontinuado o tratamento, o volume uterino tende a retornar ao tamanho pré-tratamento (Friedman e cols., 1994).

A administração exógena de progesterona juntamente com análogos do GnRH resulta em uma redução menor do volume dos miomas quando comparado ao tratamento isolado com análogos (Rein e cols., 1995). Este dado sugere que a

progesterona também exerce efeito na promoção do crescimento dos miomas (Parker, 2007b).

O desenvolvimento e crescimento dos miomas resultam de uma complexa interação entre hormônios esteróides, fatores de crescimento, citocinas e mutações somáticas (Sozen I, Arici A, 2006; Villanova e cols., 2006; Hermon e cols., 2008). Os estrógenos desempenham funções fundamentais no desenvolvimento de diversos tecidos, devido à ligação com receptores nucleares protéicos específicos. Tanto o tecido miometrial normal quanto os leiomiomas estão igualmente expostos à concentração plasmática de estrógenos (Sumitani e cols., 2000). Existem algumas teorias para explicar a influência do estrogênio no crescimento aumentado dos miomas (Sumitani e cols., 2000; Englund e cols., 1998). Uma possibilidade seria o aumento da concentração de receptores de estrogênio encontrada nos leiomiomas (Englund e cols., 1998). Outra possibilidade estudada é a habilidade do leiomioma de converter androgênios em estrogênio *in situ*, através do aumento da expressão da aromatase (Sumitani e cols., 2000).

Estrógenos são conhecidos como potentes agentes mitogênicos e regulam a proliferação celular no útero e mama, entre outros órgãos-alvo (Kovács e cols., 2001). O efeito do estrógeno no crescimento e desenvolvimento dos miomas é mediado por dois receptores, receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ) e receptor de estrógeno beta (RE $\beta$ ) (Bakas e cols., 2008). O papel de cada um destes receptores e sua interação tem sido objeto de intensa investigação, muitas vezes com dados conflitantes (Brandon e cols., 1995; Asada e cols., 2008; Lessl e cols., 1997; Jakimiuk e cols., 2004).

A aromatase é uma enzima cuja função é promover a biossíntese dos estrogênios no organismo humano. Alguns estudos têm demonstrado níveis aumentados desta enzima em miomas quando comparado com o tecido miometrial normal (Folkerd e cols., 1984; Bulun e cols., 1994), suscitando a tese de que o estrógeno produzido localmente no tumor seja um fator que contribua para o crescimento deste (Sumitani e cols., 2000). Recentemente, inibidores da aromatase, tais como acetato de leuprorelina, anastrozol e letrozole, têm sido testados a fim de diminuir o tamanho dos miomas e de tratar sangramento uterino (Shozu e cols., 2003; Kaunitz, 2007; Gurates e cols., 2008; Hilario e cols., 2009).

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 Estrogênio e seus receptores: alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ )

O estrogênio é um hormônio esteróide. Possui características lipofílicas e tem baixo peso molecular, sendo, portanto, capaz de atravessar facilmente a membrana celular sem a necessidade de utilizar sistemas de transporte especializados (Osterlund MK, Hurd YL, 2001).

Três formas estrogênicas estão presentes em quantidades significativas no plasma da mulher:  $\beta$ -estradiol, estrona e estriol, sendo o  $\beta$ -estradiol o principal estrogênio secretado pelos ovários.

A partir de observações clínicas, o estrogênio tem sido tradicionalmente considerado um promotor do crescimento dos miomas (Flake e cols., 2003). Por outro lado, poderia também ser responsável pelo aparecimento de neoplasias, uma vez que o aumento da proliferação celular resultante da ligação do estradiol ao seu receptor faz com que as células se dividam mais rapidamente, aumentando assim a probabilidade de ocorrência de erros e de mutações desencadeando o crescimento descontrolado das células (Henderson BE, Feigelson HS, 2000).

Inicialmente, apenas um receptor de estrogênio era conhecido ( $RE\alpha$ , 66kDa). Em estudo publicado em 1996, Kuiper e cols. evidenciam a existência de outro receptor, denominado receptor de estrógeno beta, isolado inicialmente a partir da próstata de ratos. O  $RE\beta$ , com peso molecular de 54 kDa, é 95 % homólogo na seqüência de aminoácidos ao  $RE\alpha$  em seu domínio de ligação ao DNA e 55 % homólogo no domínio de ligação hormonal. A interação com o ligante é praticamente

a mesma nos dois subtipos do receptor, porém esta interação difere por dois resíduos de aminoácidos.

Os receptores de estrógeno (RE) pertencem à superfamília de receptores nucleares, os quais são intracelulares e possuem várias propriedades em comum, como a localização nuclear e a ligação a sequência específica de DNA (Matthews J, Gustafsson JA, 2003). São fatores de transcrição ativados por hormônios e regulam a expressão gênica através da ligação com elementos responsivos a esteróides (ERE) (Benassayag e cols., 1999). Após a formação do complexo estrogênio – receptor e ligação ao DNA ocorre a ativação da transcrição de genes específicos com a conseqüente síntese de proteínas (enzimas, receptores e fatores de secreção) que originam a resposta hormonal reguladora da função, crescimento e diferenciação das células-alvo (Weigel NL, Rowan BG, 2001).

Os dois subtipos de receptores de estrogênio, RE $\alpha$  e RE $\beta$ , apresentam padrões de expressão diferentes nos diversos tecidos do corpo humano (Kuiper e cols., 1996; Mosselman e cols., 1996). Análises indicam que o RE $\beta$  possui alta expressão na próstata e ovário (Mosselman e cols., 1996; Kuiper e cols., 1997) e expressão moderada nos testículos e útero, tecidos estes, que também expressam RE $\alpha$  (Kuiper e cols., 1997).

Ambos receptores de estrogênio codificam isoformas variantes (Matthews J, Gustafsson JA, 2003; Zhao e cols., 2008). O mecanismo genômico, determinado pela ligação com receptores nucleares específicos, resulta em efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos (Nillson e cols., 1998). A concentração dos receptores nos tecidos determina sua resposta ao hormônio (Dornstauder e cols., 2001). De acordo

com Hall e McDonnell (Hall, 1999), o papel do RE $\beta$  seria modular a atividade transcricional do RE $\alpha$ . Desta forma, a expressão relativa das duas isoformas seria o fator determinante das respostas celulares a agonistas e antagonistas. Outro estudo sugere que os dois receptores podem apresentar efeitos opostos *in vitro*, com o RE $\beta$  tendo papel de modulador dos efeitos do RE $\alpha$  no útero (Weihua e cols., 2000).

Cinco variantes de RE $\beta$  foram identificadas através de amplificação por PCR de cDNA testicular e da linha celular MDA-MB 435 (Moore e cols., 1998). Após a identificação das variantes, avaliaram sua presença em vários órgãos humanos. Em tecido uterino foi detectada a expressão de hER $\beta$ 1, hER $\beta$ 2, hER $\beta$ 4 e hER $\beta$ 5. A expressão de hER $\beta$ 3, entretanto, restringiu-se ao tecido testicular.

## **2 Expressão de RE $\alpha$ e RE $\beta$ em leiomiomas e miométrio normal**

O desenvolvimento de leiomiomas uterinos é estrogênio-dependente, sendo que estes expressam ambos os receptores de estrogênio; entretanto, a base molecular desta dependência não é totalmente conhecida (Bakas e cols., 2008). Existem controvérsias a respeito do nível de expressão de RNAm de RE $\alpha$  e RE $\beta$  em miomas e miométrio normal. Alguns estudos encontraram aumento dos níveis em leiomiomas em relação ao miométrio adjacente, enquanto outros estudos não encontraram diferença entre os tecidos (Benassayag e cols., 1999; Nisolle e cols., 1999; Lessl e cols., 1997; Jakimiuk e cols., 2004).

A expressão gênica e protéica do receptor de estrogênio em miomas e miométrio normal em pacientes na menacme submetidas a histerectomia ou

miomectomia já foi determinada (Brandon e cols., 1995). Na época deste estudo, o RE $\beta$  ainda não havia sido descrito. Os resultados indicavam que tanto a transcrição do gene do receptor de estrógeno quanto à tradução da proteína estão aumentadas em miomas em relação ao miométrio normal adjacente. Houve grande variação nos níveis de RE entre as amostras de leiomioma e miométrio de diferentes pacientes, indicando a importância de fazer a comparação entre tecido normal e tumoral da mesma paciente.

Englund e cols. (1998) estudaram mudanças na expressão de receptores de estrógeno e progesterona em miomas e miométrio normal durante o ciclo menstrual e durante o tratamento com GnRHa. As pacientes não tratadas com GnRHa foram subclassificadas em grupo proliferativo e grupo secretor, de acordo com a fase do ciclo menstrual. A taxa de RE no tecido miomatoso foi maior do que no miométrio nos três grupos estudados. Houve variação na quantidade de RE detectada em miomas e miométrio, sendo menor na fase secretora quando comparada com a fase proliferativa e com o grupo tratado com GnRHa. O estudo descreve, também, variação importante nos níveis de receptores de estrógeno e progesterona entre diferentes tumores provenientes de uma mesma paciente.

Através de um estudo imunohistoquímico, a atividade proliferativa de receptores de estrogênio e progesterona em leiomiomas e miométrio normal durante o ciclo menstrual e em pacientes em uso de GnRHa foi avaliada (Nisolle e cols., 1999). Os leiomiomas apresentaram mais RE do que o miométrio normal em ambas as fases do ciclo menstrual. Contudo, a quantidade de RE encontrada foi significativamente maior apenas na fase proliferativa. Tumores tratados com GnRHa



apresentaram diminuição na atividade proliferativa quando comparados com miomas não expostos à medicação, o que sugere ação do estrógeno no crescimento dos mesmos. De acordo com os autores, os receptores de progesterona também estão mais expressos em tecido tumoral, indicando influência da mesma na patologia da miomatose uterina.

Matsuzaki e cols. (1999), avaliando a expressão de RE $\alpha$  e RE $\beta$  em células musculares lisas do miométrio encontrou expressão de RE $\alpha$  mais proeminente do que a do RE $\beta$ . Não foi encontrada diferença na localização dos receptores e intensidade da sua expressão ao longo do ciclo menstrual.

Em pacientes pré e pós-menopáusicas submetidas a histerectomia, os níveis protéicos de RE $\alpha$  encontrados em amostras de leiomiomas foram duas vezes os encontrados em amostras de miométrio (Kovács e cols., 2001). Não houve variação na expressão do RE $\alpha$  nos tecidos estudados entre as fases do ciclo menstrual e na menopausa. Os níveis de RE $\beta$  estavam aumentados em miomas durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e, de forma mais intensa, durante a menopausa. O estudo conclui que, na menopausa, parece haver uma mudança na expressão dos receptores em miomas – aumento da expressão do receptor beta em relação ao alfa – o que poderia explicar a regressão dos miomas encontrada já no início da menopausa.

Estudo avaliando a expressão de RE $\alpha$  e RE $\beta$  em miomas e miométrio adjacente de 35 pacientes submetidas a histerectomia durante a fase folicular do ciclo menstrual, demonstrou um nível de expressão aumentado de RNAm de ambos os receptores em miomas quando comparado com miométrio (Bakas e cols., 2008).

Além disso, conclui que a razão entre os receptores ( $RE\alpha/RE\beta$ ) mais do que a expressão individual destes determina o tipo e a afinidade de ligação ao DNA, ocasionando o crescimento dos leiomiomas.

Em pesquisa comparando  $RE\alpha$  e  $RE\beta$  em miométrio e leiomiomas provenientes de mesmas pacientes (Benassayag e cols., 1999) evidenciaram aumento de RNAm de  $RE\alpha$  (3 a 8 vezes) em três miomas, enquanto em outras duas pacientes os resultados foram semelhantes. A expressão de  $RE\beta$  também foi maior em miomas (1,5 a 4 vezes) quando correlacionado com miométrio adjacente, exceto em um caso.

A expressão de  $RE\alpha$  e  $RE\beta$  em culturas de células endoteliais microvasculares e de células musculares lisas de miométrio e leiomioma foi caracterizada pela primeira vez em 2002 (Gargett e cols., 2002). Todas as amostras pareadas de tecido tumoral e miometrial expressaram  $RE\beta$  nas células endoteliais microvasculares; entretanto, a expressão de  $RE\alpha$  foi variável entre os pares avaliados (em alguns não foi detectada expressão protéica através da técnica de *Western blot*). Em relação às células musculares lisas, todos os pares expressaram  $RE\alpha$  (RNAm e proteína), mas não houve expressão de  $RE\beta$ . O nível de expressão de  $RE\alpha$  foi variável entre os pares. De forma contraditória a estes dados, Valladares e cols. (2006), avaliando por imunohistoquímica a localização celular e subcelular dos receptores de estrógeno em leiomiomas, concluíram que células musculares lisas uterinas expressam ambos os subtipos de RE, enquanto células endoteliais e células do tecido conjuntivo de leiomiomas e miométrio normal expressam apenas  $RE\beta$ .

Em artigo publicado em 2002, Sakaguchi e cols. avaliaram a expressão dos receptores de estrógeno alfa e beta em miométrio de pacientes pré e pós-menopáusicas. Foram encontrados níveis de RNAm do RE $\beta$  10 a 200 vezes menores do que os níveis de RE $\alpha$  em ambos os grupos de pacientes. No miométrio pré-menopáusicas, o padrão de expressão de RNAm do RE $\beta$  durante o ciclo menstrual foi semelhante ao do RE $\alpha$ . Comparando os dois grupos, RNAm do RE $\beta$  do miométrio pós-menopáusicas foi significativamente maior, enquanto o nível de expressão de RNAm do RE $\alpha$  foi menor. Em análise imunohistoquímica, ambos os receptores foram detectados no núcleo de células musculares lisas uterinas.

Contrariando alguns resultados acima descritos outros trabalhos não encontraram diferença ao avaliarem receptores de estrogênio em miomas e miométrio normal correspondente. Vollenhoven e cols (1994) elaboraram estudo cujo objetivo era investigar a expressão de RNAm de receptores de estrógeno e receptores de progesterona (RP) e a sua capacidade de ligação em miomas e miométrio provenientes de pacientes expostas e não expostas a tratamento com GnRHa. Vinte pacientes não expostas a tratamento hormonal e 10 pacientes com uso prévio de pelo menos 3 meses de GnRHa foram arroladas no trabalho. A ligação de RE e de RP foi duas e três vezes maior, respectivamente, em miomas do que em miométrio nos dois grupos estudados. A quantidade de RNAm de RE e RP foi semelhante em miomas e miométrio das pacientes não tratadas. Também não houve diferença na expressão de RNAm de RE e RP em miomas expostos ou não a GnRHa. A partir destes dados, concluem que receptores de estrógeno e progesterona possam contribuir com o crescimento dos miomas através de uma maior afinidade de ligação aos receptores encontrada neste tecido. Além disso, o

tratamento com GnRHa talvez exerça seu efeito através da diminuição dos níveis circulantes de estradiol e não tenha relação com mudanças na quantidade de receptores.

Lessl e cols. (1997) avaliaram RNAm de receptores de estrógeno e progesterona de miomas e miométrio por RT-PCR. Em 18 amostras coletadas, o conteúdo de RNAm dos dois tipos de receptores não diferiu nos tecidos avaliados e foi semelhante nas duas fases do ciclo menstrual. Os achados foram confirmados através da avaliação de proteína destes receptores por imunohistoquímica.

Jakimiuk e cols. (2004) não evidenciaram diferença entre a expressão de RNAm de RE $\alpha$  e RE $\beta$  em leiomiomas uterinos e miométrio adjacente. Ambos receptores foram encontrados em todos os tecidos investigados e a expressão de RE $\alpha$  em miomas e miométrio foi maior do que a expressão de RE $\beta$ . Em leiomiomas, foi encontrada correlação entre a expressão de RE $\alpha$  e RE $\beta$ , enquanto não foi observada tal relação no miométrio. Em relação às fases do ciclo menstrual, não houve diferença nos grupos investigados. Discutindo as razões de tais achados, os autores relatam que cerca de 50% das pacientes encontravam-se na perimenopausa, apresentando níveis de FSH maiores de 20 mUI/mL. Durante a perimenopausa os níveis de FSH sérico tendem a aumentar, mas a produção de estradiol não parece ser afetada significativamente. Entretanto, os autores sugerem que talvez os níveis aumentados de FSH possam influenciar a expressão dos REs.

Em estudo controlado com 30 pacientes a fim de investigar o papel do RE $\beta$  no crescimento dos leiomiomas, amostras de tecido tumoral e miométrio foram coletados durante a fase proliferativa do ciclo menstrual (Roan e cols., 2005). As

expressões de RNAm de ER $\beta$  e de ER $\alpha$  e de proteína de ambos foram analisadas por RT-PCR e imunohistoquímica, respectivamente. Foi encontrada expressão maior de RE $\alpha$  nos tecidos. Em 90% dos nódulos avaliados não houve diferença entre os níveis de RNAm de RE $\alpha$  e RE $\beta$  em miomas e miométrio adjacentes. Contudo, a razão RE $\beta$ /RE $\alpha$  foi menor no tecido miomatoso. Os autores propõem que a relação entre os receptores, em detrimento aos seus valores individuais, determina o desenvolvimento tumoral.

Zhao e cols. (2008) investigaram a expressão de isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  do receptor de estrogênio e de IGF-1 em miomas. Foram analisados níveis de RE $\alpha$ , RE $\beta$  e IGF-1 em miomas e miométrio adjacente de 21 pacientes através de RT-PCR quantitativo. Todos os tecidos apresentaram aumento de expressão de RE $\alpha$ . O estudo não encontrou diferença dos níveis de RNAm de RE $\alpha$  e RE $\beta$  entre leiomiomas e miométrio normal. Foi encontrada correlação positiva entre RNAm de RE $\alpha$  e RNAm de IGF-1. Também houve correlação positiva entre RNAm de RE $\beta$  e RNAm de IGF-1, mas não foi significativa. O estudo conclui que o estrogênio pode regular positivamente o IGF-1 através do RE $\alpha$  e que o RE $\beta$  talvez tenha participação na via de sinalização deste.

### **3 Aromatase**

Estrogênios são sintetizados em vários tecidos humanos por intermédio da aromatase, enzima pertencente à superfamília do citocromo P450 a qual é codificada pelo gene CYP19, localizado no cromossomo 15q21.2 (Bulun e cols., 1997; Bulun e cols., 2003).

O complexo enzimático encontra-se localizado no retículo endoplasmático de células produtoras de estrógeno, sendo composto por dois polipeptídeos: o primeiro, chamado de aromatase citocromo P450 (CYP450AROM), responsável pela aromatização oxidativa dos androgênios a estrogênios; e a outra, uma flavoproteína NADPH-citocromo P450 redutase, que transfere equivalentes redutores para CYP450AROM (Bulun e cols., 1994).

A região codificante é constituída por aproximadamente 30 kb e a região reguladora é constituída por 93 kb (Bulun e cols., 2004). O CYP19 é composto por 10 exons. O cDNA do gene da aromatase contém 3,4 kb e codifica um polipeptídeo de 503 aminoácidos com um peso molecular de 55 kDa: a CYP450AROM. A transcrição da aromatase é altamente regulada e complexa tendo sido identificados vários promotores específicos de cada tecido (Simpson e cols., 2002).

A aromatização processa-se em três passos oxidativos sucessivos, que resultam na conversão da androstenediona e da testosterona em estrona e estradiol respectivamente (Fishman J, Hahn EF, 1987). A presença da aromatase foi descrita em leiomiomas uterinos e sugere-se que sua atividade possa contribuir para o desenvolvimento desses tumores (Folkerd e cols., 1984).

A prevalência de miomas é maior em mulheres afro-americanas quando comparadas com caucasianas ou outras raças. Estudam-se, atualmente, os motivos desta diferença. Ishikawa e cols. (2009) encontraram níveis de RNAm de aromatase em miomas maiores do que em miométrio normal. Em pacientes afro-americanas o aumento foi de 83 vezes, enquanto em caucasianas e japonesas, foi de 38 e 33 vezes, respectivamente. Em contraste com estes dados, a expressão de RNAm de

RE $\alpha$ , RE $\beta$  e RP em leiomiomas foi pouco menos de três vezes maior do que no miométrio adjacente em todos os grupos.

Bulun e cols. (1994) encontraram maior expressão de aromatase em cultura de células de miomas do que no miométrio adjacente. Em contrapartida, não foi encontrada expressão desta enzima em miométrios provenientes de úteros sem miomatose. Os autores levantam a suposição de que os miomas podem desenvolver-se preferencialmente em tecidos miometriais capazes de expressar aromatase ou que produtos secretados pelo tumor possam aumentar a transcrição da enzima em miomas e miométrio adjacente.

Através de técnica semiquantitativa de RT-PCR e de *Western blot*, Sumitani e cols. (2000) encontraram expressão aumentada de aromatase P450 em tecido miomatoso em relação a endométrio e miométrio adjacente. Neste estudo, foi também confirmado através de culturas celulares, que a enzima era funcional e que seu local mais importante de expressão ocorre nas células musculares lisas. De acordo com os resultados do estudo, células miomatosas em cultura têm a habilidade de sintetizar estrógeno para promover seu próprio crescimento e proliferação. O estrógeno sintetizado no citoplasma pode ligar-se diretamente ao seu receptor intracelular, sem atingir o plasma. Portanto, o estrógeno sintetizado *in situ* poderia contribuir para o crescimento tumoral através de mecanismo intracrino/autócrino.

De acordo com Shozu e cols. (2001), o uso de agonistas de GnRH reduz a expressão de aromatase P450 em leiomiomas causando supressão do estrógeno produzido *in situ*, constituindo-se um mecanismo adicional dos efeitos do agonista

de GnRH no retardo de crescimento das células miomatosas. Foram comparadas pacientes submetidas a histerectomia que haviam usado acetato de leuprorelina pré-operatório (injeção subcutânea de 1,88 mg a cada 4 semanas por 12-24 semanas) com pacientes sem uso da medicação. Em pacientes que não estavam em uso hormonal houve expressão 20 vezes maior de aromatase em leiomiomas do que no miométrio homólogo. O uso hormonal reduziu significativamente a expressão de aromatase em miomas e miométrio a aproximadamente um décimo da expressão encontrada no miométrio de pacientes não tratadas. Após o tratamento, não houve mais diferença nos níveis de expressão entre leiomioma e miométrio correspondente nas amostras estudadas. A supressão de aromatase também foi demonstrada em nível protéico através de análise por *Western blot*. Amostras de mioma foram obtidas de pacientes dos dois grupos e foram tratadas com estrógeno para determinar a atividade da aromatase. Não foi encontrada alteração na atividade da enzima após o tratamento de ambos os grupos. A partir destes dados, os autores referem que a supressão da aromatase em células miomatosas durante o tratamento hormonal ocorre provavelmente por ação direta nas células e não pela deprivação de estrógeno circulante no plasma, gerada pelo uso da medicação.

Varelas e cols. (2007) elaboraram estudo para avaliar o efeito de anastrozol em leiomiomas uterinos sintomáticos. O anastrozol é um inibidor da aromatase não esteróide de terceira geração utilizado para tratamento de câncer de mama avançado em pacientes menopáusicas. As pacientes utilizaram anastrozol 1mg por dia por 3 ciclos menstruais de 28 dias. O volume médio dos miomas decresceu de forma significativa após o uso da medicação ( $p < 0,001$ ) em pacientes com mais de 40 anos, resultando em uma redução média de 55,74 % no volume original dos



miomas. Não houve diferença significativa no tamanho dos tumores em pacientes com menos de 40 anos. De 39 pacientes tratadas, 2 apresentaram aumento no volume dos miomas e uma não apresentou alteração. O uso do anastrozol resultou em redução de 29,85% do volume uterino, em média (83,02 mL, DP 98,72, IC 95 % 53,01-126,66). O estudo reportou também aumento de 11,3 % do hematócrito no final do tratamento e ausência de efeitos adversos graves. Entretanto, a manutenção dos resultados encontrados após o descontinuo do uso dos inibidores da aromatase ainda necessita avaliação.

No Brasil, Hilário e cols. (2009) avaliaram o uso de inibidores da aromatase para tratamento de leiomiomas. As pacientes receberam medicação para 90 dias de tratamento (1 mg de anastrozol por dia). A redução do volume uterino foi avaliada por ecografia. Com o uso da medicação houve uma redução média de 9,3 % no volume uterino, sem haver mudanças significativas nos níveis séricos de estradiol, FSH, androstenediona e testosterona. Também foi evidenciada melhora da disfunção menstrual e da dismenorréia ( $p = 0,001$ ).

## **JUSTIFICATIVA**

A fisiopatologia dos miomas uterinos não está bem estabelecida. Supõe-se que tenham origem multifatorial. Diante do impacto sócio-econômico causado por esta doença, vários estudos dedicam-se à investigação dos fatores que promovem o crescimento dos leiomiomas visando a um melhor entendimento deste processo biológico. Entretanto, os resultados são muitas vezes conflitantes. Desta forma, há necessidade de avaliar os mecanismos implicados na associação do estrogênio ao crescimento dos leiomiomas.

## **OBJETIVO**

Avaliar a expressão protéica das isoformas do receptor de estrogênio- $\alpha$  e receptor de estrogênio- $\beta$ , assim como da enzima aromatase em miométrio normal e mioma uterino provenientes de mulheres na menacme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Potential link between estrogen receptor- $\alpha$  gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Human Reprod* 2008; 14 (9): 539–545.
2. Bakas P, Liapis A, Vlahopoulos S, Giner M, Logotheti S, Creatsas G, Meligova AK, Alexis MN, Zoumpourlis V. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 1878-1885.
3. Banu NS, Manyonda IT. Alternative medical and surgical options to hysterectomy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2005; 19(3):431-49.
4. Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honoré JC, Mignot TM, Vacher-Lavenu MC, Chapron C, Ferré F. Estrogen receptors (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 39: E1112–8.
5. Bozzini N, Rodrigues CJ, Petti DA, Bevilacqua RG, Gonçalves SP, Pinotti JA. Effects of treatment with gonadotrophin releasing hormone agonist on the uterine leiomyomata structure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:330–4.
6. Brandon D D, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1876–1881.

7. Bulun SE, Noble LS, Takayama K, Dodson Michael M, Agarwal V, Fisher C, Zhao Y, Hinshelwood MM, Ito Y, Simpson ER. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 61(3-6): 133-139.
8. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid Biochem Molec Biol* 2003; (86): 219–224.
9. Bulun SE, Simpson ER, Word RA. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:736–743.
10. Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med* 2004; 22: 5-9.
11. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:435– 8.
12. Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (MenoflavonÒ) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78: 67-75.
13. Englund K, Blanck A, Gustavsson I, Lundkvist U, Sjoblom P, Norgren A, Lindblom B. Sex Steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes

during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4092-6.

14. Fishman J, Hahn EF. The nature of the final oxidative step in the aromatization sequence. *Steroids* 1987; 50:339-345.

15. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003; 111(8):1037-54.

16. Folkerd EJ, Newton CJ, Davidson K, Anderson MC, James VHT. Aromatase activity in uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1984; 20:1195-1200.

17. Friedman AJ, Daly M, Juneau-Norcross M, Gleason R, Rein MS, LeBoff M. Long-term medical therapy for leiomyomata uteri: a prospective, randomized study of leuprolide acetate depot plus either oestrogen-progestin or progestin 'add-back' for 2 years. *Hum Reprod* 1994; 9 (9): 1618-1625.

18. Gargett CE, Bucak K, Zaitseva M, Chu S, Taylor N, Fuller PJ, Rogers PA. Estrogen receptor-alpha and -beta expression in microvascular endothelial cells and smooth muscle cells of myometrium and leiomyoma. *Mol Hum Reprod* (2002) 8:770–775.

19. Gurates B, Parmaksiz C, Kilic G, Celik H, Kumru S, Simsek M. Treatment of symptomatic uterine leiomyoma with letrozole. *Reprod BioMed Online* 2008; 17 (4): 569-574.

20. Hall J, McDonnell D. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key

regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140: 5566–5578.

21. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21:427-433.

22. Hermon TL, Moore AB, Yu L, Kissling GE, Castora FJ, Dixon D. Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) phospho-serine-118 is highly expressed in human uterine leiomyomas compared to matched myometrium. *Virchows Arch* 2008; 453(6): 557–569.

23. Hilario SG, Bozzini N, Borsari R, Baracat EC. Action of aromatase inhibitor for treatment of uterine leiomyoma in perimenopausal patients. *Fertil Steril* 2009; 91:240–243.

24. Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, Usui H, Shozu M, Bulun SE. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(5):1752–56.

25. Jakimiuk AJ, Bogusiewicz M, Tarkowski R, Dziduch P, Adamiak A, Wróbel A, Haczynski J, Magoffin DA, Jakowicki JA. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression in uterine leiomyomas from premenopausal women. *Fertil Steril* 2004; 82(3):1244-1249.

26. Kaunitz AM. Aromatase inhibitor therapy for uterine bleeding in a postmenopausal woman with leiomyomata. *Menopause* 2007; 14 (5): 941/943.

27. Kobayashi Y, Zhai Y.L., Linuma M, Horiuchi A, Nikaido T, Fujii S. Effects of a GnRH analogue on human smooth muscle cells cultured from normal myometrial and from uterine leiomyoma tissues. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 (2): 91–99.
28. Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor ( $\alpha$  and  $\beta$ ) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(11):1085-1091.
29. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5925-30.
30. Kuiper GJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S and Gustafsson J-Å. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1997; 138: 863-870.
31. Lessl M, Klotzbuecher M, Schoen S, Reles A, Stockemann K, Fuhrmann U. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2596–2600.
32. Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM: Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103(35):13162-13167.
33. Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz G, Barbieri RL, Stampfer MJ, Hunter DJ. A prospective study of reproductive factors and oral



contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998; 70(3):432-9.

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

35. Matsuzaki S, Fukaya T, Susuki T, Murakami T, Sasano H, Yajima A. Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999; 5 (6): 559-564.

36. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Interv* 2003; 3:281-292.

37. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:75–78.

38. Mosselman S, Ploman J, Dijkema R. Erb: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.

39. Nillson S, Kuiper G, Gustafsson, JA. ER beta a Novel Estrogen Receptor Offers the Potential for New Drug Development. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:387-395.

40. Nisolle M, Gillerot S, Cansas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the

menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999;14:2844–50.

41. Österlund MK, Hurd YL. Estrogen receptors in the human forebrain and relation to neuropsychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 2001; 64, 251-267.

42. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007a; 87(4):725-36.

43. Parker WH. Uterine myomas: management. *Fertil Steril* 2007b; 88(2):255-71.

44. Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:14–18.

45. Roan CJ, Chuang JH, Hsu TY, Tsai HY, Pan LL, Cheng JT. Estrogen receptor beta is not increasingly expressed in leiomyoma nodules which show no progressive enlargement in premenopausal women. *J Formos Med Assoc* 2005; 104:920–6.

46. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I and Tamaya T (2003) Expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 68,11–19.

47. Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Inoue M. Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 2003; 79:628–31.

48. Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang H-J, Murakami K, Inoue M. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5405–5411.

49. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase - a brief overview. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:93-127.
50. Sozen I, Arici A. Cellular Biology of Myomas: Interaction of Sex Steroids with Cytokines and Growth Factors. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2006; 33:41–58.
51. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001; 357(9252): 293-8.
52. Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang H, Shimada K, Inoue M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology* 2000; 141:3852-60.
53. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Myomas and reproductive function. *Fertil Steril* 2006; 86(5 Suppl):S194-9.
54. Valladares F, Frias I, Baez D, Garcia C, Lopez FJ, Fraser JD, Rodríguez Y, Reyes R, Díaz-Flores L, Bell AR. Characterization of estrogen receptors alpha and beta in uterine leiomyoma cells. *Fertil Steril* 2006;86: 1736–43.
55. Varelas FK, Papanicolaou AN, Vavatsi-Christaki N, Makedos GA, VlassisGD. The effect of anastrozole on symptomatic uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 2007; 110:643–649.
56. Villanova FE, Andrade PM, Otsuka AY, Gomes MTV, Leal ES, Castro RA, Girão MJBC, Nishimura E, Baracat EC, Silva IDCG. Estrogen receptor alpha polymorphism and susceptibility to uterine leiomyoma. *Steroids* 2006; 71:960–965.

57. Vollenhoven BJ, Pearce P, Herington AC, Healey DL. Steroid receptor binding and messenger RNA expression in fibroids from untreated and gonadotrophin-releasing hormone agonist pretreated women. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 537–44.
58. Weigel NL, Rowan BG. Estrogen and progesterone action. In: DeGroot L. J., Jameson J. L., Burger H. G., et al (eds) *Endocrinology*. W.B. Saunders, Philadelphia, 2001; 2053-2060.
59. Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) $\beta$ , a modulator of ER $\alpha$  in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:5936–41.
60. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 2008 1; 6: e003.
61. Zhao Y, Zhang W, Wang S. The expression of estrogen receptor isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and insulin-like growth factor-i in uterine leiomyoma. *Gynecol endocrinol* 2008; 24(10): 549–554.

**ARTIGO EM INGLÊS - Protein expression of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ )  
and aromatase in normal myometrium and uterine leiomyoma**

Anelise Olmos Grings<sup>1,2</sup>, Vanessa Lora<sup>2</sup>, Gustavo Dias Ferreira<sup>2</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>2</sup>,  
Helena von Eye Corleta<sup>1,2,3</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina;<sup>2</sup>Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde;  
<sup>4</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel. +55 51 3308 3559, Fax +55 51 3311 5699

e-mail: [edcapp@ufrgs.br](mailto:edcapp@ufrgs.br)

## Abstract

**Background:** Leiomyomas are the most common tumors of the female reproductive tract and a major public health problem. The mechanism of tumorigenesis is unknown, but evidence suggests that estrogens, which are potent mitogens, regulate cell proliferation and myoma growth. This estrogen-mediated effect might be due to different amounts of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) in normal and myoma tissues and overexpression of aromatase P450 in myomas, which is responsible for conversion of androgens to estrogens in situ. **Purpose:** Assess protein expression of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and aromatase in leiomyomas and normal adjacent myometrium of premenopausal women. **Methods:** Samples were collected from 14 premenopausal women admitted for abdominal hysterectomy due to fibroids. **Results:** The protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase was similar in leiomyoma and normal myometrium (P = 0.239, P = 0.695 and P = 0.203, respectively). **Conclusions:** Our data does not support the theory that overexpression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase in myomas are the cause of tumor growth.

## Keywords

Leiomyoma, myometrium, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , aromatase.

## INTRODUCTION

Uterine leiomyomas are the result of clonal proliferation of uterine smooth muscle cells (Stewart, 2001). Leiomyomas are the most common tumors of the female reproductive tract, affecting approximately 20 % to 40 % of women of reproductive age (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006). They are a common indication for hysterectomy due to local pressure effects and bleeding, although it is estimated that less than 50 % produce symptoms (Bakas *et al.*, 2008).

The exact etiology of leiomyomas is unknown, but their development is considered to be estrogen dependent (Bakas *et al.*, 2008). Uterine leiomyomas are more prevalent through the reproductive years and tend to regress after oophorectomy, after the menopause and during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy (Marshall *et al.*, 1998; Villanova *et al.*, 2006). In addition, several other hormone-associated risk factors for myomatosis have been identified, such as early menarche, obesity and unopposed estrogen exposure (Al-Hendy A, Salama SA, 2006).

Estrogens are potent mitogens and regulate cell proliferation in breast, uterus and other target organs (Kovács *et al.*, 2001). Both leiomyoma and normal miometrial tissue are equally exposed to serum estrogen (Sumitani *et al.*, 2000). Therefore, some theories were raised in order to explain how estrogens exert influence on leiomyoma growth. Some studies found a higher content of estrogen receptors in leiomyomas than in homologous myometrium (Brandon *et al.*, 1995; Englund *et al.*, 1998). Other possibility is that leiomyomas have been shown to convert androgens to

estrogen *in situ*, through the increase of aromatase expression (Sumitani *et al.*, 2000).

Estrogens act in the uterus mainly through two estrogen receptors (ER), ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Bakas *et al.*, 2008). The role of these receptors and their interaction has been investigated, with conflicting data regarding the amount of ER isoforms found in leiomyomas compared with normal myometrial tissue (Brandon *et al.*, 1995; Englund *et al.*, 1998; Lessl *et al.*, 1997; Jakimiuk *et al.*, 2004).

The synthesis of estrogens is catalyzed by the enzyme aromatase, which is expressed in a number of tissue sites in the human, including uterine leiomyomas (Bulun *et al.*, 1994). Some studies have demonstrated higher levels of aromatase activity in leiomyomas when compared with normal myometrial tissue (Folkerd *et al.*, 1984; Bulun *et al.*, 1994). This suggests that leiomyoma cells synthesize estrogen *in situ* what would promote its growth (Sumitani *et al.*, 2000). Recently, aromatase inhibitors have been tested as an alternative treatment of uterine leiomyomas (Hilario *et al.*, 2009).

The aim of this study was to evaluate protein expression of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and aromatase in leiomyomas and normal adjacent myometrium of premenopausal women.

## **METHODS**

### ***Study design***



A case-control study was performed.

### ***Patient selection and tissue collection***

Samples were obtained from 14 premenopausal women admitted for abdominal hysterectomy due to fibroids from May 2008 through January 2010 at the Department of Gynecology and Obstetrics of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were hysterectomy due to menorrhagia, compressive symptoms and rapid tumor growth. Exclusion criteria were adenomyosis, malignancy or use of hormonal therapy in the previous 3 months before surgery. Body weight, height, and body mass index (BMI) were measured.

The fragments of leiomyoma and adjacent myometrial tissue collected were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent extraction of total RNA and proteins. The diagnosis of leiomyoma was confirmed by histopathologic examination.

This study was submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the Research and Post-Graduation Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 08142).

### ***Western blots***

To obtain tissue lysate, 500 mg samples of leiomyoma and normal adjacent miometrium tissue were individually homogenized in 500 µL of 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA pH 7.4, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and

1% Triton X-100. The samples were shaken overnight at 4°C and then centrifuged at 12,000 x g for 30 min at 4°C. Tissue lysates were applied to a 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. The membrane was washed with blocking solution (TTBS) containing 15 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM TRIS, 0.5 % Tween 20, pH 7.4 plus 2.5 % BSA, and incubated with specific mouse anti-ER $\alpha$  (66 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), rabbit anti-ER $\beta$  (56 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and mouse anti-aromatase (55 kDa, AbD Serotec, Oxford, UK) diluted in TTBS with 2.5 % BSA and 0.1 % azide (Branchini *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009). The bands were detected by a chemoluminescence reaction (ECL) with film (CL-Exposure, Pierce) exposure for 15–60 s. The OD (optical densitometry) of the bands obtained by chemoluminescence was measured by densitometric analysis with an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech). Mouse anti- $\beta$ -tubulin (50 kDa Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used to normalize the ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase protein amounts.

### ***Statistical analysis***

For each sample, data obtained from protein expression were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) when normally distributed or as median and interquartile range when supposition of normality of the data was rejected. The results were evaluated quantitatively by tests: Student *t* and Wilcoxon T. The sample size was calculated from a previous study (Cericatto *et al.*, 2005), in order to detect a difference of 0.5 between the means of arbitrary units of protein expression of ER $\alpha$ ,

ER $\beta$  and aromatase, for a sample power 90 % and a significance level of 0.05. All tests were performed using the SPSS 15.0 data processor (*Statistical Packages for Social Sciences*, USA).

## RESULTS

Twelve samples of leiomyomas paired with adjacent normal myometrium were analyzed for protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase. Samples from 2 patients had insufficient protein quantity in order to perform the Western blot technique. Quantitative results are shown as the ratio of the target protein versus  $\beta$ -tubulin in arbitrary units (AU).

Patients' mean age was  $46.8 \pm 5.1$  years and BMI was  $28.3 \pm 4.8$  kg/m<sup>2</sup>. Ten of our patients were of Caucasian descent and 2 were of African descent.

The protein expression of ER $\alpha$  was similar in leiomyoma [0.782 (0.468 - 1.727)] and normal myometrium [1.137 (0.559 - 2.456)] (Wilcoxon T test P = 0.239) (figure 1).

The protein expression of ER $\beta$  is shown in figure 2 as mean  $\pm$  SEM. There was no statistical difference between normal miometrium ( $0.560 \pm 0.125$ ) and leiomyoma ( $0.583 \pm 0.158$ ) (Student's' *t* test for paired samples P = 0.695).

The analysis of cytochrome p450 aromatase also showed no statistical difference in protein levels of myoma ( $3.964 \pm 0.929$ ) and adjacent miometrium ( $2.678 \pm 0.463$ ) (Student's' *t* test for paired samples P = 0.203) (figure 3).

## DISCUSSION

The mechanisms underlying the proliferative effects of estrogen on leiomyoma growth are not completely understood. Although several studies analyzing the estrogenic effect on leiomyomatosis have implicated both estrogen receptor types (quantity, distribution and interactions with each other) on fibroid development, there are conflicting data about their exact role in the process.

Before ER $\beta$  was discovered as a distinct receptor, Brandon *et al.* (1995) and Englund *et al.* (1998) showed increased expression of ER in leiomyomas when compared to normal myometrium. After the finding of a novel ER receptor, other researchers (Benassayag *et al.*, 1999; Kovács *et al.*, 2001; Bakas *et al.*, 2008) have found increased expression of both receptors in leiomyomas when compared with normal myometrium.

In the present study, protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase in leiomyomas compared to normal adjacent myometrial tissue were analyzed. These results, however, revealed no difference in protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase between normal myometrium and leiomyoma.

In 1994, Bulun and coworkers demonstrated that aromatase mRNA was detectable by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction in leiomyomata and in normal-appearing myometrial tissues biopsied at 2 cm from a leiomyoma, aromatase mRNA was not detectable in myometrial tissues from disease-free uteri. The presence of aromatase in uterus with myoma could contribute

of in situ estrogen production, namely estrogen synthesized in leiomyoma cells. In our study we found similar aromatase protein expression in leiomyoma and myometrium, and we have no data on disease free uteri.

It has been previously demonstrated that ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA expression in uterine leiomyomas and adjacent myometrium did not differ (Jakimiuk *et al.*, 2004). However, mRNA levels do not precisely reflect the protein expression of the receptors and their actual status. Possibly, the crosstalk between both receptors and not quantity changes of ER are responsible for fibroid growth (Jakimiuk *et al.*, 2004).

Similar data has been presented by Lessl *et al.* (1997), when ER protein expression was analyzed immunohistochemically. Our results showed no significant differences in the average amount of protein present in tumor and normal tissues.

Aromatase activity was shown to be present in human uterine leiomyomas and it has been suggested that it may contribute to the development of these tumors (Bulun *et al.*, 1994). Sumitani *et al.* (2000) and Ishikawa *et al.* (2009) found higher levels of aromatase in leiomyoma when compared with adjacent myometrium.

It seems that there is a marked variation in receptor levels in different tumors even if collected from the same patient, which emphasizes the need to use the patient as its own control (Englund *et al.*, 1998). In our study, we analyzed myomas from twelve patients and used their normal adjacent myometrium as controls. We did not find significant difference in protein expression of aromatase between myomas and normal myometrium.

The presence of aromatase transcripts in myometrium adjacent to myomas and the absence of this transcript in myometrium from uteri without leiomyomas may lead us to speculate that leiomyomas may preferentially develop in myometrial tissues capable of expressing aromatase (Bulun *et al.*, 1994).

## **CONCLUSIONS**

This study evaluated protein expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and aromatase in uterine leiomyomas compared to adjacent myometrium. In our study, there was no statistical difference in protein expression of both estrogen receptor isoforms between these tissues. The exact way in which estrogen exerts its effects on tumor proliferation remains unclear. It is possible that a crosstalk between both receptors and not quantitative changes in ER is the responsible for fibroid growth. Regarding aromatase, our results are more difficult to explain. Our data does not support the theory that higher levels of aromatase expressed in leiomyomas are somehow responsible for its growth. Although the growth of leiomyomas is believed to be dependent on estrogen, this and other *in vitro* studies in human tissues show conflicting results. This suggests that estrogens may exert their growth-stimulatory effects on leiomyomas only intermediated by other elements, such as cytokines and growth or apoptosis factors. In conclusion, the effect of estrogen on the growth and development of fibroids is complex and far from being completely understood.

## **REFERENCES**

1. Al-Hendy A, Salama S. Ethnic distribution of estrogen receptor-alpha polymorphism is associated with a higher prevalence of uterine leiomyomas in black Americans. *Fertil Steril* 2006; 86: 686-693.
2. Bakas P, Liapis A, Vlahopoulos S, Giner M, Logotheti S, Creatsas G, Meligova AK, Alexis MN, Zoumpourlis V. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 1878-1885.
3. Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honoré JC, Mignot TM, Vacher-Lavenu MC, Chapron C, Ferré F. Estrogen receptors (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 39:E1112-8.
4. Branchini G, Schneider L, Cericatto R, Capp E, Brum IS. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas. *Endocrine* 2009; 35(3): 459-66.
5. Brandon D D, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1876-1881.
6. Bulun SE, Simpson ER, Word RA. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:736-743.
7. Cericatto R, Pozzobon A, Morsch DM, Menke CH, Brum IS, Spritzer PM. 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): 153-60.

8. Englund K, Blanck A, Gustavsson I, Lundkvist U, Sjoblom P, Norgren A, Lindblom B. Sex Steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4092-6.
9. Folkard EJ, Newton CJ, Davidson K, Anderson MC, James VHT. Aromatase activity in uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1984; 20:1195-1200.
10. Hilario SG, Bozzini N, Borsari R, Baracat EC. Action of aromatase inhibitor for treatment of uterine leiomyoma in perimenopausal patients. *Fertil Steril* 2009; 91:240-243.
11. Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, Usui H, Shozu M, Bulun SE. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(5):1752–56.
12. Jakimiuk AJ, Bogusiewicz M, Tarkowski R, Dziduch P, Adamiak A, Wróbel A, Haczynski J, Magoffin DA, Jakowicki JA. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression in uterine leiomyomas from premenopausal women. *Fertil Steril* 2004; 82(3):1244-1249.
13. Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor ( $\alpha$  and  $\beta$ ) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(11):1085-1091.



14. Lessl M, Klotzbuecher M, Schoen S, Reles A, Stockemann K, Fuhrmann U. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2596-2600.
15. Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz G, Barbieri RL, Stampfer MJ, Hunter DJ. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998; 70(3):432-9.
16. Schneider L, Branchini G, Cericatto R, Capp E, Brum IS. Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue. *Endocrine* 2009; 35(1): 118-22.
17. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001; 357(9252): 293-8.
18. Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang H, Shimada K, Inoue M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology* 2000; 141:3852-60.
19. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Myomas and reproductive function. *Fertil Steril* 2006; 86(5 Suppl):S194-9.
20. Villanova FE, Andrade PM, Otsuka AY, Gomes MTV, Leal ES, Castro RA, Girão MJBC, Nishimura E, Baracat EC, Silva IDCG. Estrogen receptor alpha polymorphism and susceptibility to uterine leiomyoma. *Steroids* 2006; 71:960-965.

Figure 1

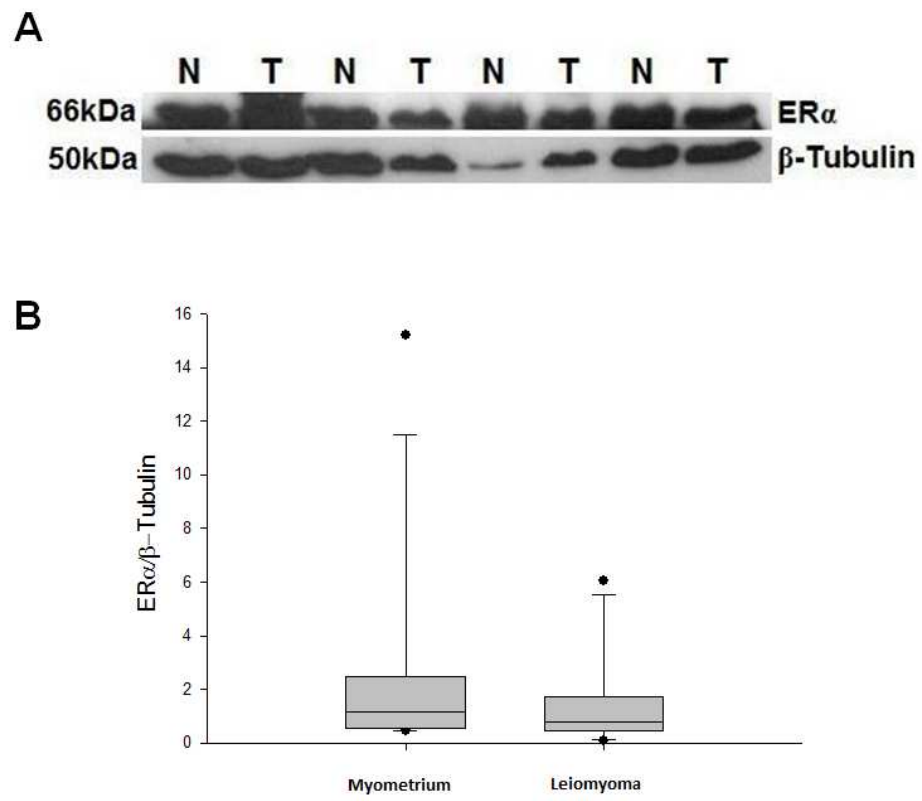


Figure 2

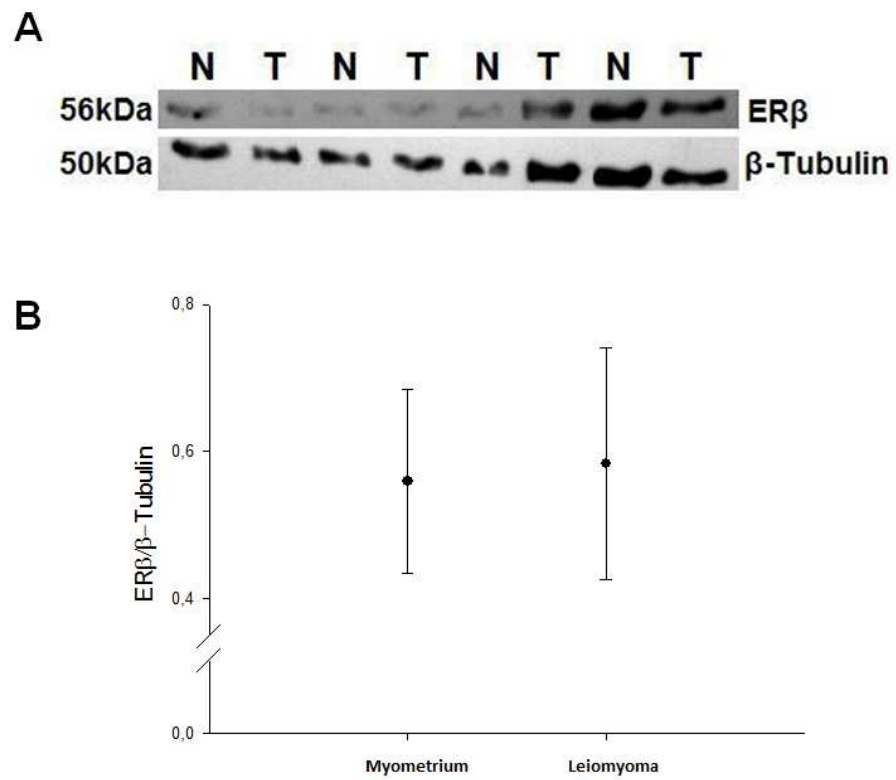
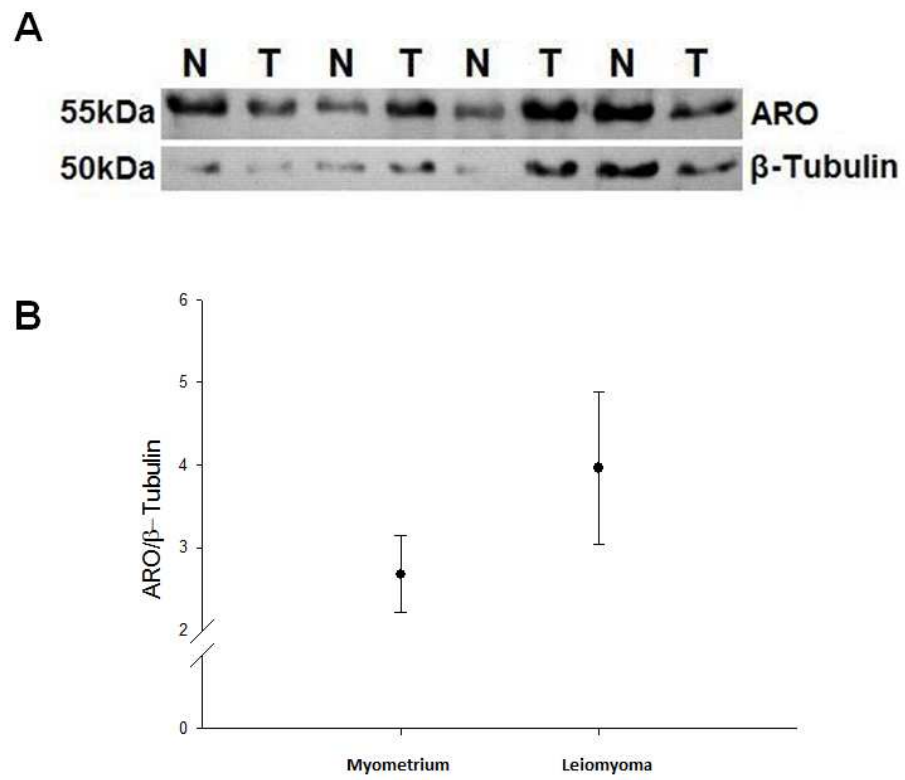


Figure 3



## LEGENDS

Figure 1. Analysis of ER $\alpha$  protein in leiomyoma and myometrium. (A) Autoradiography of the representative *Western blot* for ER $\alpha$  (66 kDa) in samples of myometrium (N) and uterine leiomyoma (T) normalized with the band corresponding to  $\beta$ -Tubulin (50 kDa). (B) Graph representing the quantification of the bands expressed as a ratio ER $\alpha$ / $\beta$ -Tubulin (median and interquartile range 25-75), in arbitrary units. \* P = 0.239

Figure 2. Analysis of ER $\beta$  protein in leiomyoma and myometrium. (A) Autoradiography of the representative *Western blot* of ER $\beta$  protein (56 kDa) in samples of myometrium (N) and uterine leiomyoma (T) normalized with the band corresponding to  $\beta$ -Tubulin (50 kDa). (B) Graph representing the quantification of the bands expressed as a ratio ER $\beta$ / $\beta$ -Tubulin (mean  $\pm$  SEM) arbitrary units.\* P= 0.695

Figure 3. Analysis of aromatase protein in leiomyoma and myometrium. (A) Autoradiography of the representative *Western blot* of aromatase protein (55 kDa) in samples of myometrium (N) and uterine leiomyoma (T) normalized with the band corresponding to  $\beta$ -Tubulin (50 kDa). (B) Graph representing the quantification of the bands expressed as a ratio aromatase/ $\beta$ -Tubulin (mean  $\pm$  SEM) arbitrary units.\* P= 0.203

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Leiomiomas uterinos são tumores benignos frequentes em pacientes em idade reprodutiva, causando grande morbidade e gerando altos custos, uma vez que o tratamento definitivo geralmente envolve procedimentos cirúrgicos. A origem destes tumores é multifatorial e os fatores responsáveis pelo crescimento dos tumores em relação ao miométrio são motivo de inúmeras pesquisas. O papel hormonal no crescimento dos miomas é embasado em evidências clínicas. No presente estudo, investigamos o papel do estrogênio na proliferação dos miomas. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão protéica dos receptores de estrógeno alfa e beta e na expressão protéica da aromatase. Os estudos realizados até o momento em relação a este assunto são controversos e o assunto está longe de ser esclarecido.

## ANEXOS

### **Anexo 1 - Protocolo de estudo de técnicas de Western blot na avaliação de Miomas e do Miométrio Normal**

Caso N°:

Registro Prontuário:

Iniciais do Nome:

Data do Procedimento Cirúrgico:

Idade:

Peso:

Altura:

Idade da Menarca (primeira menstruação):

Paridade: G \_\_\_ P \_\_\_ C \_\_\_ Ab \_\_\_

Primeira gestação no termo aos \_\_\_ anos

Data de término da última gestação: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Método Anticoncepcional atual:

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

1- \_\_\_ / \_\_\_ / 200\_, fluxo de \_\_\_ dias;

2- \_\_\_ / \_\_\_ / 200\_, fluxo de \_\_\_ dias;

3- \_\_\_ / \_\_\_ / 200\_, fluxo de \_\_\_ dias.

Fase do ciclo em que foi realizada a cirurgia:

1- ( ) Fase folicular inicial;

2- ( ) Fase folicular tardia;

3- ( ) Fase lútea inicial;

4- ( ) Fase lútea tardia;

5- ( ) Uso de método anticoncepcivo hormonal.

## **Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título do estudo:** “Expressão Protéica das isoformas dos receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  e da aromatase em miométrio normal e mioma 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 o Prof Dr. Edison Capp (51 99144166), a Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da



Silva (51 33163671 ou 51 99969044), e Anelise Olmos Grings (51 93667212). 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 \_\_\_\_\_