

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Saúde da Mulher

Alexon Melgaço Racilan

**LOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7), DO
RECEPTOR MAS E DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA TIPO 2 EM LEIOMIOMAS UTERINOS**

Belo Horizonte

2019

Alexon Melgaço Racilan

**LOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7), DO
RECEPTOR MAS E DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA TIPO 2 EM LEIOMIOMAS UTERINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde da Mulher, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fernando
Marcos dos Reis

Co-orientadora: Prof. Dra. Marilene Vale de
Castro Monteiro

Belo Horizonte

2019

R1211 Racilan, Alexon Melgaço.
Localização e Expressão da Angiotensina - (1-7) do Receptor MAS e da Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2 em Leiomiomas Uterinos [recursos eletrônicos]. / Alexon Melgaço Racilan. - - Belo Horizonte: 2019.
58f.: il.
Forma
to:
PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Fernando Marcos dos Reis.
Coorientador (a): Marilene Vale de Castro Monteiro. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leiomioma. 2. Receptor Tipo 2 de Angiotensina. 3. Peptidil Dipeptidase A. 4. Miométrio. 5. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Monteiro, Marilene Vale de Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 459



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO **ALEXON MELGAÇO RACILAN**

Realizou-se, no dia 23 de agosto de 2019, às 09:00 horas, Sala 171, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **LOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7), DO RECEPTOR MAS E DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA TIPO 2 EM LEIOMIOMAS UTERINOS**, apresentada por ALEXON MELGAÇO RACILAN, número de registro 2017652096, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador (UFMG), Prof(a). Marilene Vale de Castro Monteiro (UFMG), Prof(a). Joao Lucio dos Santos Junior (FASEH), Prof(a). João Vaz da Silva (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 23 de agosto de 2019.

Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (Doutor)

Prof(a). Marilene Vale de Castro Monteiro (Doutora)

Prof(a). Joao Lucio dos Santos Junior (Doutor)

Prof(a). João Vaz da Silva (Doutor)

Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça,
e todas essas coisas serão acrescentadas a vocês.

MATEUS 6 , 33

Dedicatória

Dedico esta dissertação a minha querida
Cláudia, e aos meus filhos Raphael e Henrique,
pela compreensão e incentivo diários, desde sempre!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, início e fim, onipresente e onisciente, motivo de minhas buscas diárias.

À ciência e à fé que andam juntas quando dedicamos muito estudo, oração e ação transformadora.

Ao professor **Fernando**, exemplo de vida e de profissional. Sempre disponível, me ensinou muito, com poucas palavras e muita observação e incentivo.

À professora **Marilene** pelo apoio nas correções e estímulo na coleta inicial de nosso material.

Às “meninas” **Maíra, Wiviane e Cynthia**, colegas da biologia, grandes mestres pesquisadoras e sonhadoras, sem vocês meu trabalho não se desenvolveria.

Aos alunos e amigos da FASEH , em especial **Prof. Erica Soraia, Prof. João Lúcio e Prof. Flávia Ribeiro** pela compreensão e apoio .

Aos colegas **Marco Tulio, Geam Karlo e João Augusto** pela disponibilidade em ajudar na coleta das amostras.

Ao **Dr. Omar de Paula** da Anatomia Patológica Diagnóstica.

A todos os meus familiares, **Vieiras, Melgaços e Racilans**, presentes mesmo na minha ausência, com muito carinho, orações e cuidado sempre.

Aos **meus pais**, sinônimo de amor e exemplo maior. Dividimos alegrias e superamos os momentos difíceis. Amo vocês!

Às minhas queridas irmãs, **Iandra , Amanda e Luciana** , essa conquista é de vocês também.

À minha eterna **Claudíssima**, por ter me dado os maiores presentes de minha vida, nossos Raphael e Henrique e por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia. Seu amor e cafés das madrugadas foram fundamentais para mais essa realização.

Aos meus amados **Raphael e Henrique**, vocês me emocionam em vê-los crescendo em sabedoria e me incentivam em cada abraço que recebo ao chegar cansado em casa.

A todas as pacientes, pela disponibilidade em colaborar com o estudo e pela confiança em mim

A todos vocês, o meu mais sincero e profundo agradecimento. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

RESUMO

EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7), DO RECEPTOR Mas E DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA TIPO 2 EM LEIOMIOMAS UTERINOS E MIOMÉTRIO

Angiotensina (Ang)-(1-7) é um componente do sistema renina-angiotensina que produz efeito vasodilatador, anti-angiogênico e anti-proliferativo em diversos órgãos, e é produzida a partir da clivagem da Ang-II pela enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2). Um dos efeitos bem documentados da Ang-(1-7) é reduzir a fibrose pulmonar e renal. Leiomiomas uterinos são tumores benignos de alta prevalência e morbidade, histologicamente caracterizados por intensa deposição de colágeno e fibrose. O objetivo deste estudo foi avaliar se os principais componentes do eixo da Ang-(1-7) estão presentes no miométrio humano e nos miomas uterinos. Amostras de miomas uterinos e miométrio normal embebidas em parafina foram obtidas de arquivos hospitalares e processadas por imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para Ang-(1-7), MAS e ECA2. A imunomarcagem foi classificada como ausente, fraca, moderada ou forte por dois observadores independentes. Controles negativos tiveram os anticorpos primários substituídos por soro não imune. Foi ainda realizada PCR em tempo real para avaliar a expressão relativa dos ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA) que codificam MAS e ECA2, em amostras de leiomiomas e miométrio de outras pacientes que foram submetidas a histerectomia total por miomatose uterina. Ang-(1-7) foi detectada no citoplasma das células musculares lisas, com ampla distribuição e intensidade moderada, tanto no miométrio normal quanto no mioma uterino. O receptor MAS estava presente nas células musculares lisas normais e fibróticas, com localização nuclear frequente. ECA2 foi detectada no miométrio normal e nos miomas uterinos, sendo particularmente mais concentrada nas regiões de maior densidade celular. Foi demonstrado por PCR em tempo real que os mRNAs tanto do receptor MAS quanto da ECA2 estão presentes em amostras de leiomiomas e miométrio, com expressão semelhante nos miomas uterinos. Esses dados indicam que o miométrio humano e os miomas uterinos contêm os principais componentes do eixo protetor/antifibrótico do sistema renina-angiotensina. A importância funcional desse sistema para o desenvolvimento dos miomas necessita de contínua investigação.

Palavras chaves: angiotensina-(1-7); receptor Mas; leiomiomas; ECA2

ABSTRACT

LOCALIZATION OF ANGIOTENSIN- (1-7), MAS RECEPTOR AND ANGIOTENSIN TYPE 2 CONVERTER IN UTERINE LEYOMIOMAS AND MYOMETRIUM

The "protective" axis of the renin-angiotensin system is composed by Angiotensin (Ang)-1-7, its receptor MAS, and the type-2 angiotensin converting enzyme (ACE2). This axis opposes the actions of Ang-II in many target tissues and biological functions. One of the well documented effects of Ang-(1-7) is to reduce lung and kidney fibrosis. Uterine fibroids are benign tumors with high prevalence and morbidity, whose histological features include collagen deposition and fibrosis. The aim of this study was to evaluate whether the main components of the Ang-(1-7) axis are present in human myometrium and uterine fibroids. Paraffin-embedded samples of uterine fibroids and normal myometrium were obtained from hospital files and processed by immunohistochemistry using specific antibodies to (Ang)-1-7, MAS and ACE2. The immunostaining was graded as absent, weak, moderate or strong by two independent observers. Negative controls had the primary antibodies replaced by non-immune serum. The mRNAs encoding MAS and ACE2 were assessed in another group of fibroid and myometrium samples using real time PCR. Ang-(1-7) was detected in the cytoplasm of smooth muscle cells with wide distribution and moderate intensity, both in normal myometrium and uterine fibroids. MAS receptor was present in both normal and fibrotic smooth muscle cells, with frequent nuclear localization. ACE2 was detected in normal myometrium and uterine fibroids, being particularly more concentrated in regions of higher cell density. Both MAS and ACE2 mRNAs were detected in fibroid and myometrium samples. This study firstly shows that human myometrium and uterine fibroids contain the full protective/antifibrotic axis of the renin-angiotensin system. The functional importance of this system for fibroid development remains to be investigated.

Key-words: angiotensin-(1-7); Mas receptor; leiomyomas; ACE2

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II angiotensina 2

Ang-(1-7) angiotensina 1-7

AT1 receptor de Ang II tipo I

DPMA acetato de medroxiprogesterona

ECA enzima conversora de angiotensina

ECA2 enzima conversora de angiotensina tipo 2

ESGE Sociedade Europeia de Endoscopia Ginecológica

EGF fator de crescimento epidérmico

FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics

IMC índice de massa corporal

mRNA RNA mensageiro

PCNA antigénio nuclear celular

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PR-A receptor de progesterona A

PR-B receptor de progesterona B

rMAS receptor Mas

RNA Ácido ribonucléico

RP receptor de progesterona

rpm Rotações por minuto

SPRMs moduladores seletivos de receptor de progesterona

SRA sistema renina angiotensina

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: classificação FIGO de miomas

Figura 2 - Principais componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (LIMA, M.C, 2011)

FIGURA 3- Um diagrama esquemático de ambos os braços do SRA (SIMOES E SILVA AC , 2009).

FIGURA 4: Diagrama representando as pacientes incluídas no estudo

FIGURA 5: Diagrama representando as pacientes utilizadas para estudo imunohistoquímico

FIGURA 6: Diagrama representando as pacientes utilizadas para estudo de extração de RNA

FIGURA 7: expressão gênica da ECA 2

FIGURA 8: expressão gênica do receptor Mas

FIGURA 9: expressão de ECA2 em miométrio e leiomioma uterino

FIGURA 10: expressão de Ang-(1-7) em miométrio e leiomioma uterino

FIGURA 11: expressão de receptor Mas em miométrio e leiomioma uterino

QUADRO 01: quadro resumo de receptores do sistema Renina Angiotensina

QUADRO 02: localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. LEIOMIOMAS UTERINOS	16
2.1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	16
2.1.2 ETIOPATOGENIA	17
2.1.3 CLASSIFICAÇÃO (PALM-COEIN)	20
2.1.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA	24
2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	27
2.2.1 COMPONENTES(PRECURSORES, PEPETIDEOS, ENZIMAS E RECEPTORES) DO SRA.	28
2.2.2 PARTICIPAÇÃO DO SRA NOS MECANISMOS DE FIBROSE (FIGADO, RINS E PULMÃO).	34
2.2.3 EXPRESSÃO DO SRA NO UTERO	36
2.2.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO MIOMETRIO E NO LEIOMIOMA UTERINO	38
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. OBJETIVO GERAL	41
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5. PACIENTES E MÉTODOS	42
5.1 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	43
5.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	45
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXO	60

1. INTRODUÇÃO

Os leiomiomas uterinos ou fibromas, ou simplesmente miomas-ocorrem em 30 a 80 % das mulheres na idade reprodutiva, afetando a qualidade de vida de muitas dessas pacientes, embora sejam assintomáticos em até 50 % dos casos.(Bulun, S.E. 2013). Quando se tornam motivo de queixas, estão associados com dor pélvica, polaciúria, sangramento uterino anormal, e em 2 a 3% dos casos há relação com infertilidade (Taylor E, Gomel V.2008).

O diagnóstico é normalmente realizado pela ultrassonografia pélvica, ressonância magnética ou tomografia computadorizada; mas pode ser -achado ocasional no exame clínico ou laparoscopia e /ou laparotomia por outros motivos.

Como aproximadamente 30% das mulheres têm ou terão leiomioma uterino, é importante salientar que a maioria delas não precisará de qualquer tratamento(*Wise LA, Laughlin-Tommaso SK. 2016*).Para aquelas que apresentarem sintomas, as opções terapêuticas são variadas, passando pela medicação oral, cirurgia por laparoscopia, laparotomia ou histeroscopia e embolização . O tratamento ideal, seja clínico e/ou cirúrgico deverá ser instituído individualmente, de acordo com a avaliação médica criteriosa.

Na ausência de sintomas e de qualquer outra causa identificada de infertilidade, a remoção do leiomioma não está indicada, visto que o procedimento cirúrgico pode contribuir para o desenvolvimento de outros fatores de infertilidade (aderências e até obstrução das tubas uterinas) .

As evidências atuais demonstram a necessidade de tratamento na presença de miomas que distorçam a porção interna do útero onde a gravidez se desenvolverá. (Whynott RM et al.2017).

Diante dessa gama variada de tratamentos e apresentações clínicas, fica evidenciado que ainda não entendemos bem a etiologia da miomatose uterina. Sendo assim, se torna necessário e promissor o aprofundamento nos mecanismos patogênicos, como procuramos neste estudo, através da descrição da presença e expressão da angiotensina-(1-7), do seu receptor Mas e da enzima conversora de angiotensina tipo 2, novos componentes do sistema renina angiotensina(SRA), nos miomas uterinos e miométrio(McWilliams MM et al.2017).

O SRA vem sendo estudado há mais de um século. Com a aglutinação de novas descobertas, suas funções foram ampliadas, tornando-se então um sistema mais complexo, ocorrendo, inclusive, mudanças conceituais. Esse sistema foi caracterizado no passado como substâncias localizadas nos rins, que agiriam na pressão do sangue (GASPARO et al., 2000). Posteriormente, passou a ser compreendido como um conjunto de substâncias presentes na circulação, algumas das quais atuariam em sítios distantes do local onde foram produzidas (CAMPBELL, 1987). Peptídeos do SRA e seus receptores foram identificados em diversos órgãos, inclusive os reprodutivos, como ovário, útero e testículos (Deliu E et al.2011).

O conceito atual do SRA inclui uma rede complexa de precursores, peptídeos ativos e inativos, enzimas e receptores que formam um sistema endócrino circulante e também um sistema local parácrino/autócrino. Além de seu papel fundamental no controle da pressão arterial e da homeostase, o SRA também atua no processo de regulação da remodelação tecidual, particularmente no aspecto proliferação e hipertrofia, angiogênese e apoptose.. Novas ações de diversos componentes do SRA têm sido identificadas, incluindo aquelas da angiotensina -(1-7) (Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, Hirst JJ, Markus MA, Sarris M, Zakar T, Morris BJ, Lumbers ER. 2011).

Desde a descoberta da Enzima conversora da angiotensina tipo 2(ECA2) e do receptor específico - Mas (rMas), tornou-se-aceito que o SRA é composto de dois eixos. O primeiro, composto de Enzima conversora da angiotensina (ECA), Angiotensina 2 (Ang II) e o receptor de Ang II tipo I (AT1); e o outro, composto de ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas. O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é reconhecidamente capaz de contrarregular a maioria dos efeitos do eixo principal ECA/Ang II/AT1 no sistema cardiovascular. Os mecanismos moleculares exatos responsáveis por esses efeitos são desconhecidos (*Katsi V, Maragkoudakis S, Marketou M, Tsioufis C, Parthenakis F, Tousoulis D.2019*).

A Ang-(1-7) pode exercer efeitos opostos em animais em diferentes situações fisiológicas, como exemplo, efeito natriurético em ratas grávidas e efeito antiurético em ratas virgens (Joyner J, Neves LA, K Stovall, Ferrario CM, Brosnihan KB.2008). Entretanto, o papel da Ang-(1-7) não está limitado ao sistema cardiovascular. Estudos mostram que a deleção genética do receptor

Mas leva a um fenótipo que incluiu disfunção cardíaca, aumento na pressão arterial, disfunção endotelial, microalbuminúria, hiperfiltração, fibrose renal, espermatogênese diminuída, estado semelhante à síndrome metabólica e aumento na trombogênese (Yu J, Wu Y, Zhang Y, Zhang L, Ma Q, Luo X.2018).

Dessa forma, sabemos que o sistema renina-angiotensina está presente em diversos tipos de tecidos, além do sistema cardiovascular. A Ang-(1-7) é um componente do SRA, que produz efeito vasodilatador, anti-angiogênico e anti-proliferativo em diversos órgãos, e é produzida a partir da clivagem da Ang-II pela ECA2 .Ela atua por meio de um receptor acoplado à proteína G específico, o receptor Mas (Casalechi M, Dela Cruz C, LC Lima, Maciel LP, VM Pereira, Reis FM.2018).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEIOMIOMAS UTERINOS

2.1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Miomas uterinos (também conhecidos como leiomiomas ou fibromas) são a forma mais comum de tumores uterinos benignos. Eles são tumores monoclonais do músculo liso uterino, originando-se do miométrio . São compostos de grandes quantidades de matriz extracelular (MEC) contendo colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Khan AT et al. 2014).

Embora a maioria das mulheres com miomas seja assintomática, os miomas são uma importante fonte de morbidade ginecológica e têm um impacto substancial na saúde e na qualidade de vida da mulher . Os sintomas mais comuns são menorragia (sangramento menstrual intenso) e dismenorreia (dor menstrual). O tratamento atual dos miomas inclui terapia médica (por exemplo, acetato de ulipristal), procedimentos minimamente invasivos (por exemplo, embolização da artéria uterina) e cirurgia (por exemplo, miomectomia, histerectomia). Apesar do leque de opções de tratamento, a cirurgia continua a ser a base da terapia. (Wegienka G, Baird DD, Hertz-Picciotto I, Harlow SD, Steege JF, Colina MC, Schectman JM, Hartmann KE. 2003).

O tecido fibróide é constituído principalmente por matriz extracelular caracterizado por um baixo índice mitótico e costuma ser considerado de crescimento lento. No entanto, alguns miomas podem crescer muito (Kawaguchi K, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Nonogaki H e Mori. 1989)

2.1.2 ETIOPATOGENIA

Até o momento, fatores genéticos e epigenéticos, esteroides sexuais, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e componentes da MEC foram identificados como implicados na patogênese dos leiomiomas (Bulun, 2013 ; Islam et al., 2013 ; Marsh et al., 2015 ; Protic et al., 2015 ; Yin et al., 2015).

Muitos fatores de crescimento, ativina e miostatina desempenham um papel nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos leiomiomas (Ciarmela et al., 2011a , b ; Protic et al., 2015).

É bem conhecido que os miomas são sensíveis aos estrogênios, que podem agir para crescer ou manter seu tamanho. Estrogênio, progesterona e fator de crescimento epidérmico (EGF) são considerados essenciais para a formação de miomas (Tsuda H, Kawabata M, Nakamoto .O, Yamamoto K. 1998)

O estradiol e a progesterona induzem células de leiomioma maduras a liberarem estímulos mitogênicos para células imaturas adjacentes , proporcionando, assim, o leiomioma uterino com células indiferenciadas que provavelmente suportarão o crescimento do tumor. A ação da progesterona é necessária para o completo desenvolvimento e proliferação de células de leiomioma , enquanto o estradiol aumenta predominantemente a sensibilidade tecidual à progesterona, aumentando a disponibilidade de receptores de progesterona (PRs). (Reis FM, Bloise E, Ortiga -Carvalho TM.2016) .

Recentemente, Wong et al. (2016) demonstraram que a testosterona foi adicionalmente implicada no crescimento de miomas uterinos. Estudos *in*

vitro também demonstraram que o desenvolvimento de leiomiomas depende da regulação de mRNA de alvos genéticos que afetam os processos celulares (Karmon *et al.*, 2014). O evento inicial que desencadeia os primeiros estágios da tumorigênese envolve, no entanto, mutações somáticas (Kim e Sefton, 2012).

No passado, o estrogênio era considerado o principal fator de crescimento no desenvolvimento do mioma. No entanto, já na década de 1990, vários estudos relataram aumento da expressão tanto do receptor de progesterona A (PR-A) quanto do receptor de progesterona B (PR-B) no tecido do leiomioma (Englund *et al.*, 1998 ; Nisolle *et al.*, 1999) comparado com miométrio normal adjacente. Muito recentemente, Tsigkou *et al.* mostraram que as proteínas PR-B mRNA e PR-A e PR-B estavam mais concentradas nos leiomiomas do que no miométrio pareado (Tsigkou *et al.*, 2015). Os níveis de mRNA do PR-B no tecido do leiomioma estavam diretamente associados ao número de leiomiomas, mas inversamente correlacionados com a intensidade dos sintomas. Além disso, uma maior atividade proliferativa, demonstrada por meio da proliferação de antígeno nuclear celular (PCNA) e o índice mitótico, foi observada em leiomiomas durante a fase lútea (secretora) (Nisolle *et al.*, 1999). Há evidências de estudos pré-clínicos e clínicos, bem como de estudos histológicos e farmacológicos, de que a progesterona e seus receptores desempenham um papel-chave no crescimento dos leiomiomas uterinos (Bouchard *et al.*, 2011 ; Bouchard, 2014 ; Chabbert-Buffet *et al.*, 2011, 2012, 2014 ; Kim e Sefton, 2012 ; Bestel e Donnez, 2014 ; Moravek *et al.*, 2015).

Em um artigo de revisão, Kim e Sefton (2012) descreveram, detalhadamente, a ativação de vias de sinalização em leiomiomas tanto pelo estrogênio quanto pela progesterona. A progesterona é capaz de causar efeitos rápidos, iniciados por membrana, independentes da transcrição gênica, que alteram a produção de segundos mensageiros envolvidos nas vias de transdução da sinalização celular. A via PI3K / AKT é mediada pela progesterona que, através de seus receptores, pode ativar rapidamente essa via, que é cada vez mais considerada um potencial promotor do crescimento do leiomioma. PTEN, por outro lado, deve ser considerado como um regulador negativo da AKT (Kim e Sefton, 2012). As vias de sinalização da progesterona e do fator de crescimento estão interligadas e governam numerosos processos fisiológicos, como proliferação, apoptose e diferenciação.

A progesterona pode modular a expressão de proteínas sinalizadoras do fator de crescimento e está implicada na regulação de genes associados à proliferação e apoptose, mas esses genes ainda não foram totalmente identificados ou estudados em detalhes (Islam et al., 2013; Kim and Sefton, 2012); Moravek et al., 2015).

Há, portanto, evidências de que a progesterona desempenha um papel na leiomiomatose, mas o mecanismo pelo qual promove a proliferação, o repertório de genes envolvidos e como ela cruza com as vias de sinalização do fator de crescimento, todos precisam ser investigados em maior profundidade. A recente descoberta de células-tronco e suas interações parácrinas com populações celulares mais diferenciadas dentro do tecido do leiomioma podem levar ao desenvolvimento de terapêuticas que promovem o

crescimento de leiomiomas, bem como aqueles que os erradicam (Moravek et al., 2015).

Tendo estabelecido o papel da progesterona no crescimento e desenvolvimento dos miomas, podemos modular a via da progesterona por meio do uso de moduladores seletivos de receptor de progesterona (SPRMs) (Chabbert-Buffet et al., 2005, 2011, 2015 ; Bouchard et al., 2011 ; Bouchard, 2014 ; Kim e Sefton, 2012 ; Bestel e Donnez 2014 ; Donnez et al., 2012a, b). SPRMs são compostos sintéticos que exercem tanto um efeito agonista ou antagonista sobre o receptor de progesterona (RP). Sua ligação permite que esses receptores interajam com coativadores e / ou correpressores, e isso é ainda mais impactado pela presença de co- reguladores em um tipo particular de célula, que determinará se um SPRM atua mais como um agonista ou antagonista (Chabbert-Buffet et al., 2005, 2011). Assim, o mecanismo de ação dos SPRMs em RP depende de sua estrutura e de como eles alteram a conformação de RP, resultando em exposição ou inativação de domínios de ligação particulares. Sua atividade também é mitigada por tipos de tecidos e contextos fisiológicos (Donnez et al. , 2012).

O desenvolvimento do leiomioma e sua transformação em tumores benignos fibróticos também pode ocorrer em resposta a reações inflamatórias locais e ao envolvimento de componentes celulares semelhantes, apesar da falta de evidências da existência de inflamação crônica no miométrio. Há razões para acreditar que um ambiente microinflamatório com um suprimento constante de uma variedade de mediadores inflamatórios, ao manter a interação entre as vias extrínseca e intrínseca, poderia promover a transformação celular

miometrial em tumorigênese e fibrinogênese, como nos leiomiomas. Tal inflamação local pode ocorrer em resposta ao estresse celular causado por agentes exógenos ou endógenos, e por células que sofrem apoptose. A inflamação local sustentada pode causar a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem funcionar como efetores químicos em tal microambiente. A migração celular inflamatória e imune para o local inflamado, bem como as células do músculo liso miometrial local, os fibroblastos dentro do tecido conjuntivo e outras vasculaturas, todos expressam vários tipos de mediadores inflamatórios incluindo um grande número de citocinas, quimiocinas, eicosanóides, radicais de oxigênio e nitrogênio e proteases. A hipóxia, condição que promove o estresse celular e a resposta inflamatória, altera a expressão de várias citocinas, quimiocinas e eicosanóides, bem como a expressão de várias proteases e fatores angiogênicos que potencializam o desenvolvimento e a progressão da fibrose. (Islam MS, Protic o, Stortoni P, Grechi G, Mamanna P, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P. 2013)

2.1.3 CLASSIFICAÇÃO (PALM-COEIN)

Há diferentes classificações de leiomiomas uterinos na literatura (Lasmar et al., 2005 ; Stamatellos e Bontis, 2007). Todas elas levam em consideração o grau de extensão intramural e / ou distorção da cavidade uterina , podendo resumi-las em :

Classificação da FIGO :Classificação que categoriza além dos leiomiomas submucosos, categoriza os intramurais, subserosos e transmuraís (Munro MG et al. 2011).

Classificação da ESGE : Classificação que considera apenas o grau de penetração do leiomioma submucoso no miométrio (*Lasmar RB, Barrozo PR, Dias R, Oliveira MA. 2005*).

Classificação de Lasmar : Classificação que inclui a classificação da ESGE; e é utilizada nas histeroscopias para miomectomia (Lasmar RB, Lasmar BP, Celeste RK, da Rosa DB, Dep. Dde B, Lopes RG.2012)

O sistema de classificação dos miomas submucosos da Sociedade Européia de Endoscopia Ginecológica (ESGE) considera o grau de penetração do leiomioma submucoso no miométrio. Esta classificação, originalmente, desenvolvida para histeroscopia, pode ser utilizada tanto para ultrassonografia transvaginal como para histerossonografia. Apresenta a vantagem de ser mais simples: G0 é um leiomioma intrauterino pedunculado, G1 tem sua maior parte (> 50%) na cavidade uterina e G2 tem sua maior parte (> 50%) no miométrio (Wamsteker et al. 1993).

Mais recentemente, a classificação da FIGO descreve oito tipos de leiomiomas, bem como uma classe mista (associação de dois tipos de miomas). Como diferentes tipos de leiomiomas freqüentemente estão presentes ao mesmo tempo (dependendo do local), essa classificação oferece um mapa mais representativo da distribuição dos leiomiomas e será usada ainda mais para o estabelecimento de novos algoritmos (Munro et al. 2011).

Há um novo sistema de classificação utilizado durante miomectomias histeroscópicas, conhecida como classificação de Lasmar, que inclui a classificação da Sociedade Europeia de Endoscopia Ginecológica e é baseada no grau de dificuldade técnica, recomendando uma adequada ação em cada situação através da ultrassonografia. A classificação de Lasmar não apenas classifica os leiomiomas submucosos como também identifica o grau de dificuldade em um procedimento histeroscópico (*Lasmar RB, Lasmar BP, Celeste RK, da Rosa DB, Dep. Dde B, Lopes RG.2012*).

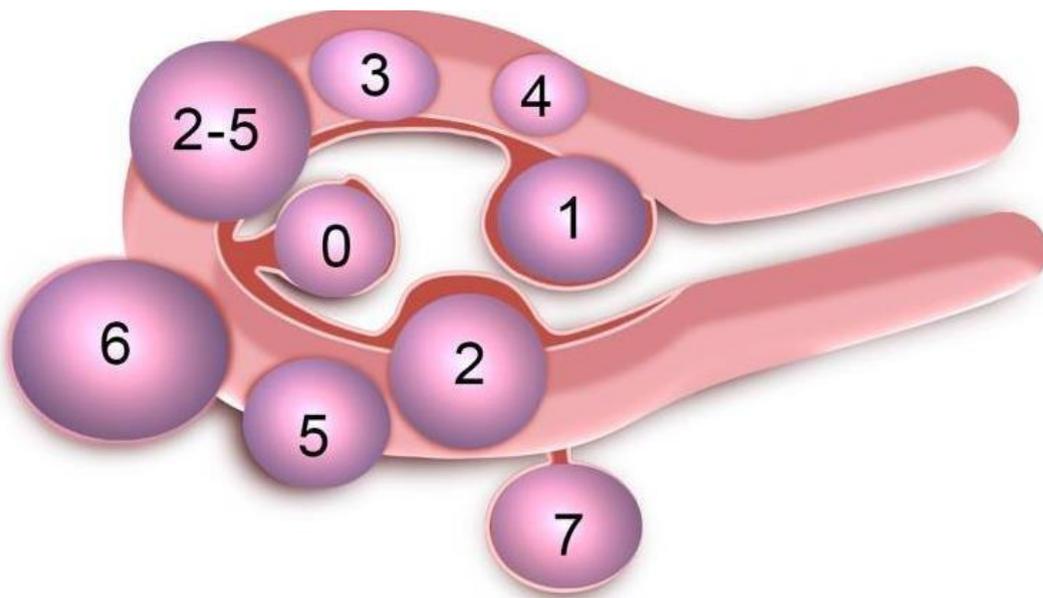


FIGURA 1: Classificação FIGO de miomas uterinos de acordo com Munro et al. (2011) .

Os tipos de leiomiomas variam de 0 a 8.

0 = Pedunculado, intracavitário;

1 = submucoso, <50% intramural;

2 = Submucoso, \geq 50% intramural;

3 = Contato com endométrio, 100% intramural;

4 = intramural;

5 = Subseroso, \geq 50% intramural;

6 = Subseroso, <50% intramural;

7 = Subseroso, pedunculado;

8 = Outros (por exemplo, cervical, parasita).

Quando dois números são dados (por exemplo, 2-5), o primeiro número refere-se à relação com o endométrio, enquanto o segundo número refere-se à relação com a serosa; por exemplo, 2-5 = submucosa e subserosa, cada uma com menos de metade do diâmetro nas cavidades endometrial e peritoneal, respectivamente.

Munro et al. (2011) .

2.1.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA

Os leiomiomas podem ser assintomáticos ou causar uma série de sintomas graves e crônicos. O sintoma de apresentação mais comum é o sangramento menstrual intenso, que pode levar à anemia e a períodos de fadiga e dor. Outros sintomas dos leiomiomas incluem dor não cíclica, protuberância

abdominal, intercurso sexual doloroso ou pressão pélvica e disfunção da bexiga ou intestino, resultando em incontinência ou retenção urinária, dor ou constipação .(Zimmermann,2012).

Podem estar associados a problemas reprodutivos, incluindo comprometimento da fertilidade, complicações e desfechos obstétricos adversos .Ainda são uma das principais causas de internações ginecológicas, sendo a causa mais frequente de histerectomia nos EUA. (Stewart EA, 2013)

Leiomiomas uterinos são as neoplasias mais comuns que afetam as mulheres, e foi postulado que elas ocorrem em mais de 70% das mulheres até o início da menopausa. Estima-se que sejam clinicamente aparentes em 25% das mulheres em idade reprodutiva, causando sintomas graves. (Boosz AS , 2014).

Embora muitos estudos sobre a epidemiologia dos leiomiomas tenham sido publicados, os relatos da incidência e prevalência variam muito, dependendo do método de diagnóstico e da população estudada; por exemplo, as estimativas da incidência de leiomiomas variam de 5,4% a 77% das mulheres em idade reprodutiva (Wise LA, 2016).

Dentre os fatores de risco para desenvolvimento da doença, ser de raça negra aumenta o risco de leiomiomas, com incidência até três vezes maior em mulheres negras do que em mulheres brancas. (Marshall, 1997).

Mais de 30 fatores relacionados a características demográficas, estado reprodutivo, dieta , comorbidades e outras condições ambientais apresentam efeito significativo sobre o risco de leiomiomatose (Pavone D et al.2018)

O fator que exerceu o maior impacto sobre o risco de leiomiomas é a idade, que pode aumentar em até dez vezes em mulheres na quinta ou sexta década, em comparação com as da terceira década, sendo que existe um efeito protetor do status pós-menopausa (Samadi AR, 1996).

A história familiar positiva de leiomiomas aumenta o risco . Esse efeito pode, no entanto, ser devido, pelo menos em parte, ao rastreamento mais frequente em parentes de mulheres com fibromas do que na população geral (Pavone D et al.2018).

Tabagismo reduz o risco da doença, mas apenas em mulheres com um baixo IMC (Wise LA, 2004).

O fator com o maior efeito protetor foi a paridade: o parto foi associado a uma redução de cinco vezes no risco de leiomiomas . A paridade pode resultar em alterações na exposição hormonal devido à gravidez, diminuição do ciclo menstrual, ou da involução e remodelação da isquemia miometrial durante e após o parto (Baird DD, 2003).

O uso de contraceptivo oral também foi encontrado como fator para reduzir o risco de desenvolver leiomiomas em até 70 %, comparando mulheres que usam contraceptivos orais com aquelas que nunca usaram. Além disso, descobriu-se que o uso do contraceptivo injetável DMPA(acetato de medroxiprogesterona) protege contra o desenvolvimento de leiomioma, reduzindo em mais de 50 % o risco da doença . O mecanismo de ação dos contraceptivos esteroidais responsáveis por esse efeito não está claro (Lumbiganon P , 1996).

Finalmente, hipertensão, dieta rica em carboidratos e gorduras, ausência de atividade física e consumo de leite de soja estão relacionados com aumento do risco de leiomiomas (Shen Y , 2013).

2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante é um sistema endócrino que promove a liberação de angiotensina (Ang) II, a qual exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos (PEACH, 1977; LEUNG, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

A Ang II é gerada pela ação da renina, uma enzima produzida pelos rins, sobre o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo Ang I (Asp1 -Arg2 -Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 -Pro7 -Phe8 -His9 - Leu10), que é clivado na ligação Phe8 - His9 pela enzima conversora de Ang I, presente em abundância no endotélio pulmonar, liberando o octapeptídeo ativo Ang II (Asp1 - Arg2 -Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 -Pro7 -Phe8) (LIMA, M.C, 2011).

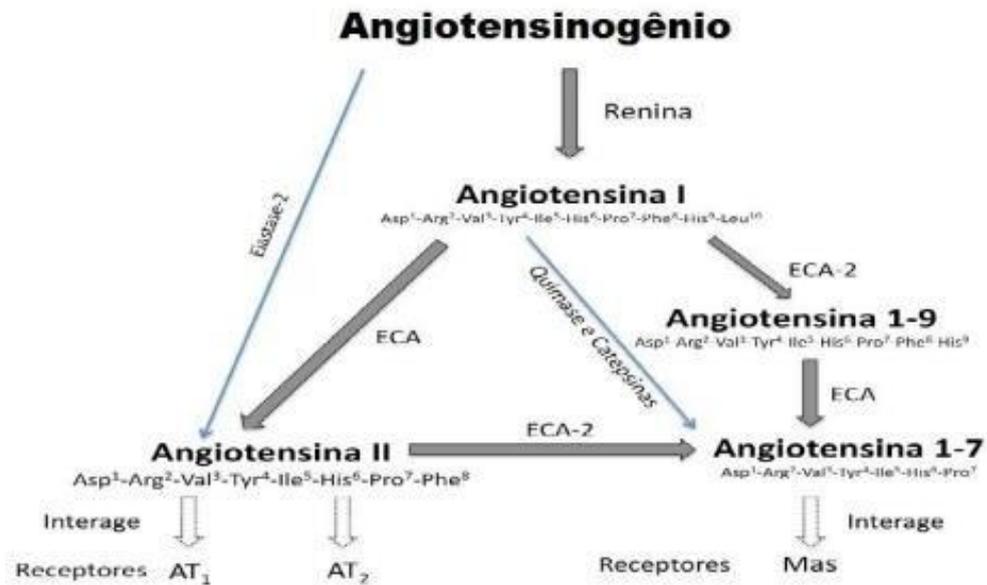


Figura2 - Principais componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (LIMA, M.C, 2011)

2.2.1 COMPONENTES(PRECURSORES, PEPETIDEOS, ENZIMAS E RECEPTORES) DO SRA

Renina

A enzima renina é uma glicoproteína de 340 aminoácidos, sendo sintetizada e armazenada sob a forma inativa, denominada pró-renina nas células justaglomerulares dos rins, que são células musculares lisas modificadas localizadas nas paredes das arteríolas aferentes (OLIVEIRA, M et al. 1999).

Com a queda de pressão arterial, reações intrínsecas nos próprios rins fazem com que muitas moléculas de pró-renina sejam clivadas liberando a renina. A

secreção da renina é controlada por 3 mecanismos: 2 agem predominantemente nos rins (mecanismo de mácula densa e mecanismo barorreceptor infra-renal) e o terceiro que age por meio do SNC (mecanismo do receptor β -adrenérgico). O mecanismo denominado de feedback negativo de alça curta consiste no fato de que elevações da secreção de renina aumentam a formação de Ang II, que, interagindo com seus receptores renais, inibe a liberação de renina nas células justaglomerulares. O mecanismo de feedback negativo de alça longa consiste na inibição da liberação da renina devido a aumentos da pressão arterial induzidos pela Ang II (JACKSON; GARRISON, 1995).

Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina humana, uma metaloprotease de ligação de membrana, contém 1.278 resíduos de aminoácidos e possui 2 domínios homólogos, cada um com um local catalítico e com uma região de ligação do zinco (SOUBRIER et al., 1988; BERSTEIN et al., 1989). A ECA é encontrada abundantemente no endotélio dos vasos pulmonares (RYAN et al., 1975, 1976) e também no plasma e em diversos tecidos orgânicos como: endotélio vascular (CALDWELL et al., 1976; RYAN et al., 1976), cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (HALL et al., 1976; ERDÖS; SKIDGEL, 1986; SCHULZ et al., 1988).

Angiotensina I

A angiotensina I é um peptídeo de 10 aminoácidos (Asp1 -Arg2 -Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 -Pro7 -Phe8 -His9 -Leu10) desprovido de propriedades

vasoconstritoras para produzir alterações funcionais significativas na função circulatória; serve como substrato para vias enzimáticas formadoras de Ang II (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Angiotensina II

Pela ação da ECA, há a liberação dos 2 últimos aminoácidos da Ang I (His9 - Leu10), formando a Ang II, um octapeptídeo (Asp1 -Arg2 -Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 -Pro7 -Phe8). A Ang II é considerada o principal peptídeo efetor do SRA . Além do seu efeito vasoconstritor e estimulatório sobre a secreção de aldosterona, a Ang II tem uma ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (PEACH, 1977). Em adição aos seus efeitos no sistema cardiovascular, tem-se demonstrado que a Ang II está envolvida em outras funções, tais como mitogênese de fibroblastos da pele, síntese de DNA por células do ligamento periodontal, regulação da formação óssea, crescimento celular, apoptose, geração de espécies reativas ao oxigênio, secreção hormonal, ações prófibrogenéticas, tônus vascular e indução da liberação de prostaglandina E2 (PGE2) em fibroblastos gengivais humanos (LUNDERGAN et al., 1999; HIRUMA et al., 1997; HAGIWARA et al., 1998; LAMPARTER et al., 1998; LEUNG, 2004; SEGAWA et al , 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Vários estudos têm mostrado a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II. Também é observado a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. URATA et al,1990 demonstraram in vitro um duplo caminho para a formação de Ang II em homogenatos de coração humano. Esses autores observaram que aproximadamente 80% da formação total de Ang II associava-se à presença de

uma serino-protease até então desconhecida, enquanto a atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA era responsável somente por aproximadamente 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi posteriormente purificada e identificada como um novo membro da família quimase e, desde então, denominada de quimase do coração humano (URATA et al., 1990b).

Angiotensina-(1-7).

A Ang.-(1-7) é um componente bioativo do SRA, sendo um heptapeptídeo (Asp1 -Arg2 -Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 -Pro7) amino-terminal formado a partir da Ang I por ação de endopeptidases neutras, ou seja, por uma via independente da ECA (SANTOS, R et al., 1988; SANTOS; COMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

Algumas destas enzimas como a neprilisina estão envolvidas no metabolismo do fator natriurético atrial e bradicinina. A ECA também tem sido envolvida no metabolismo e quebra da Ang.-(1-7), sugerindo uma interação entre diferentes sistemas de peptídeos cardiovasculares (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). A Ang.-(1-7) tem ações contra-regulatórias com a Ang II, como a proliferação celular da Ang II e ações anti-proliferativas da Ang.-(1-7). Enquanto a Ang II tem efeitos vasoconstritores, a Ang.-(1-7) tem efeitos vasodilatadores. A Ang.-(1-7) pode regular a pressão sanguínea, a função cardíaca e o crescimento celular, sendo talvez importante futuramente no tratamento de doenças cardíacas, câncer, doença renal e pré-eclampsia (TRASK; FERRARIO, 2007).

Receptores da Angiotensina.

A Ang II possui interações com diferentes tipos de receptores, conhecidos como AT1 e AT2. No músculo esquelético vascular, o receptor AT1, membro da família de receptores ligados à proteína G, possui 7 regiões transmembrânicas com 359 aminoácidos, é mediador da angiogênese e possui propriedades vasoconstritoras, enquanto que o receptor AT2 tem 363 aminoácidos, possuindo propriedades vasodilatadoras e inibindo a angiogênese. Os subtipos de receptores AT1 e AT2 apresentam estruturas genômicas e localizações diferentes, e também expressão e regulação específicas para cada tecido. Em quimiorreceptores do corpo da carótida, o receptor AT1 pode mediar a liberação de cálcio intracelular. As funções da Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT1. Em ratos e camundongos, dois subtipos de receptores AT1 foram clonados e caracterizados: AT1a e AT1b (LINDERMAN; GREENE, 2001; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; LAM; LEUNG, 2002; HIRASAWA et al., 2002; INAGAMI et al., 1994; de GASPARO; SIRAGY, 1999; de GASPARO et al., 2000; SPETH; THOMPSON; JOHNS, 1995; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008) .

Há evidências de um receptor de angiotensina adicional denominado AT4, que interage com um peptídeo de Ang truncado, a Ang IV ou Ang 3-8 (Val3 -Tyr4 -Ile5 -His6 - Pro7 -Phe8). AT4 foi originalmente definido como específico tendo local de ligação de alta afinidade para Ang IV (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006) e parece estar relacionado à consolidação da memória, fluxo sanguíneo, reabsorção tubular renal e proliferação celular (WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

O protooncogene Mas é sugerido como um receptor funcional de angiotensinas (JACKSON, et al., 1988). O Mas é caracterizado como um receptor acoplado à proteína G, originalmente descrito como um fator envolvido na tumorigênese. Os efeitos do receptor Mas podem ser mediados por Ang 1-7 ou outros peptídeos de angiotensina, o que sugere alguma relevância funcional in vivo (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

RECEPTOR	NOME	LIGANTES	FUNÇÃO
AT1	Receptor do tipo 1 de angiotensina II	Angiotensina II e angiotensina III	Vasoconstrição, liberação da aldosterona, estimulação do crescimento celular, inflamação
AT2	Receptor do tipo 2 de angiotensina II	Angiotensina II	Antagonismo aos efeitos de AT1; estimulação da apoptose; sinergismo provável com os processos inflamatórios.
AT4	Receptor da angiotensina IV	Angiotensina IV	Vasodilatação, diminuição do transporte tubular renal de sódio
Mas	Receptor Mas	Angiotensina -(1-7)	Vasodilatação, antagonista de AT1, antidiurético, inibidor de células de crescimento

QUADRO 1: quadro resumo de receptores do SRA

2.2.2 PARTICIPAÇÃO DO SRA NOS MECANISMOS DE FIBROSE (FIGADO, RINS E PULMÃO)

Muitos estudos mostraram agora que Ang- (1-7), agindo via receptor Mas, exerce efeitos inibitórios sobre a inflamação e sobre os mecanismos de crescimento vascular e celular. A Ang- (1-7) também demonstrou reduzir as principais vias de sinalização e moléculas consideradas relevantes para a fibrogênese. (*Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM.2013*).

Zhang BN et al, 2019 , demonstraram que que o tratamento preventivo com Ang- (1-7) diminuiu a perda de peso, a inflamação e a deposição de colágeno, aumentou a sobrevida e melhorou a função pulmonar. O tratamento terapêutico com Ang- (1-7), diminui a inflamação, a deposição de colágeno e melhora na função pulmonar em modelo experimental.

Vários estudos mostraram que o eixo ACE2 / Angiotensina- (1-7) / Mas reduz a liberação de citocinas e inibe as vias de sinalização da fibrose tecidual em modelos experimentais de doenças humanas, incluindo aterosclerose, isquemia cerebral, obesidade, doença renal crônica, doenças hepáticas e asma.(Rodrigues Prestes TR , Rocha NP , Miranda AS , Teixeira AL , Simões-E-Silva AC .2017)

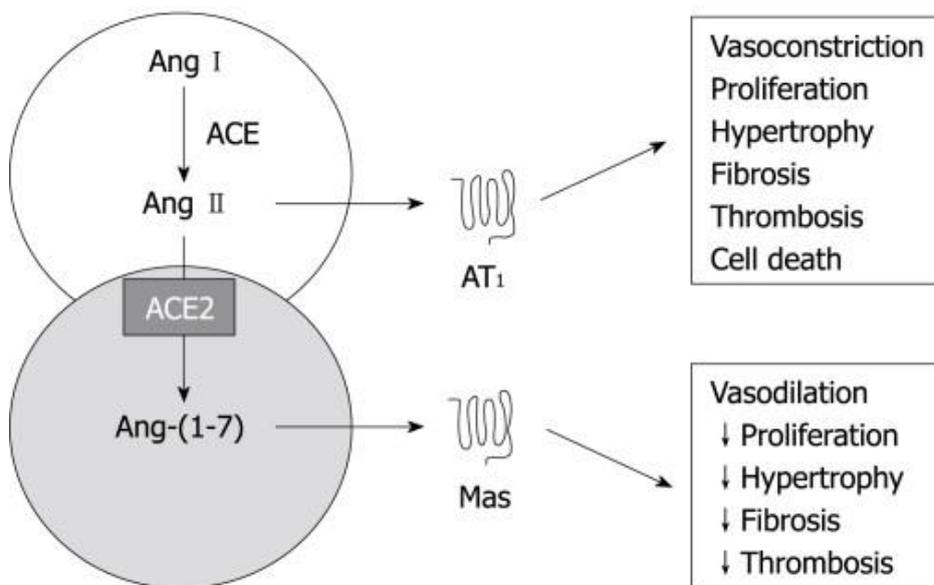


FIGURA 3- Um diagrama esquemático de ambos os braços do SRA (SIMOES E SILVA AC , 2009).

Vários estudos mostraram que o eixo ECA2 / Angiotensina- (1-7) / Mas reduz a liberação de citocinas e inibe as vias de sinalização da fibrose tecidual em modelos experimentais de doenças humanas, incluindo aterosclerose, isquemia cerebral, obesidade, doença renal crônica, doenças hepáticas e asma. Por outro lado, poucos dados foram fornecidos por estudos clínicos(SIMOES E SILVA AC, 2017)

Em modelos experimentais de doenças cardíacas e renais, Ang- (1-7), Ang- (1-9) e Alamandina produziram vasodilatação, inibição do crescimento celular, efeitos anti-trombóticos, antiinflamatórios e antifibróticos. Estratégias farmacológicas recentes têm sido propostas para potencializar os efeitos ou para melhorar a formação de Ang- (1-7) e Ang- (1-9), incluindo ativadores de

ECA2, Ang- (1-7) em hidroxipropil- β -ciclodextrina, ciclizados na forma de agonistas dos receptores Mas sintéticos Ang- (1-7) e não peptídicos (TEIXEIRA MM, 2016).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um importante regulador da cirrose e da hipertensão portal. À medida que a fibrose hepática progride, os níveis dos componentes do SRA (Ang) II, Ang- (1-7), ECA e receptor tipo II da Ang II (AT1R) estão aumentados. O efator primário Ang II regula a vasoconstrição, homeostase de sódio, fibrose, proliferação celular e inflamação em várias doenças, incluindo cirrose hepática, através do eixo ECA / Ang II / AT1R no SRA clássico. A ACE2 / Ang- (1-7) / Mas receptor os eixos ACE2 / Ang- (1-9) / AT2R constituem o SRA alternativo e promovem efeitos vasodilatadores, antiproliferativos, proapoptóticos e antiinflamatórios; assim, contrariando os efeitos do eixo clássico do SRA para reduzir a fibrogênese hepática e a hipertensão portal. Pacientes com hipertensão portal foram tratados com antagonistas dos receptores SRA, como inibidores da ECA, bloqueadores dos receptores Ang e antagonistas da aldosterona, com resultados hemodinâmicos muito promissores. (BAIK SK, 2019)

2.2.3 EXPRESSÃO DO SRA NO UTERO

Dados do SRA uterino são de natureza descritiva e principalmente limitados ao endométrio. Estudos que investigam a relevância funcional do SRA no útero são raros (Casalechi M et al, 2018).

Sendo uma parte indispensável do trato reprodutivo, o endométrio sustenta uma mudança cíclica de crescimento e degradação. Basicamente, todos os

elementos do SRA tecidual no útero, são expressos no endométrio, entretanto essa expressão diversifica durante o ciclo (WULFF, 2013).

A angiotensina II subjaz variâncias cíclicas dentro do endométrio e é aumentada durante a fase proliferativa e diminuída durante a fase secretora. A angiotensina (1-7) e seu receptor MAS também estão presentes durante todo o ciclo menstrual, mas aumentam no endométrio glandular na fase secretora intermediária e tardia. Embora AT1R e AT2R sejam expressos no endométrio, a expressão de AT2R é mais frequente e variada e é regulado para baixo durante a gravidez.

Está demonstrado que Ang-(1-7) e seu receptor Mas são expressos no endométrio humano. O peptídeo Ang-(1-7) e a enzima ECA2 têm sua expressão aumentada na fase secretora do ciclo menstrual (da Silva JV e t al, 2008).

A expressão de AT2R é assim mais proeminente no miométrio (até 90%) em comparação com a expressão de AT1R (até 10%). Infelizmente, os dados referentes aos efeitos funcionais do SRA no útero são raros (Marques FZ, Pringle KG, Conquista A, Hirst JJ, Markus MA, M Sarris, Zakar T, Morris BJ, Lumbers ER. 2011)

Os estudos que investigam a relevância funcional do SRA no útero não gravídico mostram uma série de efeitos parácrinos além da circulação e sugerem que os peptídeos do SRA podem estar envolvidos na fisiopatologia das doenças proliferativas e fibróticas. O câncer endometrial está associado ao aumento da expressão de Ang II, enzima conversora de Ang 1 e AT₁ no tecido

tumoral em comparação com o endométrio não neoplásico vizinho, e também com um polimorfismo genético que aumenta o AT₁ sinal. A Ang II induz as células endometriais humanas a se transdiferenciarem em células com fenótipo de miofibroblastos e a sintetizar componentes da matriz extracelular que possam contribuir para a fibrose endometrial (Casalechi M, Dela Cruz C, LC Lima, Maciel LP, VM Pereira, Reis FM. 2018).

2.2.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO MIOMETRIO E NO LEIOMIOMA UTERINO

Os receptores AT1 e AT2 são expressos no miométrio humano e no leiomioma uterino, sendo que o receptor AT2 é predominante. A expressão do gene do receptor AT2 é regulada negativamente durante a gravidez, possivelmente mediada por esteróides sexuais.(MATSUMOTO , 1996).

O sistema renina-angiotensina é regulado em mulheres grávidas e pode desempenhar um papel na hipertrofia miometrial durante a gravidez (Cui XL, Chang B, Myat. 2010).

Resultados experimentais in vitro mostram a presença de regulação complexa da proliferação de células de leiomioma induzida por Ang II e aldosterona (Isobe A, Takeda T, Wakabayashi A, Tsuiji K, Li B, M Sakata, Yaegashi N, Kimura T. 2010)

Foi confirmada a proliferação de leiomiomas in vitro induzida por Ang II e estradiol, assim como a expressão de RNAm de receptor de Ang II tipo 1 (AT (1) R) e AT (2) R. O telmisartan bloqueador AT (1) R, efetivamente reprimiu a proliferação celular induzida por Ang II e induzida por estradiol (Isobe A, Takeda T, M Sakata M, Miyake A, T Yamamoto, Minekawa R, F Nishimoto, Oskamoto Y, Walker CL, Kimura T.2008) .

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O eixo "protetor" do sistema renina-angiotensina composto por Angiotensina (Ang) -1-7, seu receptor MAS, e a enzima conversora de angiotensina tipo2 (ECA2), se opõe às ações da Angiotensina II em muitos tecidos-alvo e funções biológicas (*Katsi V, Maragkoudakis S, Marketou M, Tsioufis C, Parthenakis F, Tousoulis D.2019*).

Um dos bem documentados efeitos da Ang- (1-7) é reduzir a fibrose pulmonar e renal. Se este sistema for também capaz de inibir a deposição de colágeno e fibrose no útero pode tornar-se um potencial agente terapêutico para prevenir o crescimento dos leiomiomas (*Rago F, Melo EM, Kraemer L, Galvão I, Cassali GD, RAS Santos, Russo RC, Teixeira MM. 2019*).

Portanto, decidimos investigar a presença de Angiotensina (Ang) -1-7, seu receptor MAS, e a enzima conversora de angiotensina tipo2 (ECA2) em amostra de leiomiomas e de miométrio sadio. Na hipótese de o receptor MAS estar presente e a produção local de Ang-(1-7) estar reduzida, tal achado abriria a possibilidade de se testar o uso farmacológico dos já conhecidos inibidores da ECA1 ou de potencializadores da ECA2 com o objetivo de diminuir a formação e/ou crescimento de leiomiomas uterinos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Determinar a expressão da Ang-(1-7), do receptor Mas e da ECA2 no miométrio humano e em leiomiomas uterinos.

4.2 Objetivos específicos

- a) Comparar a expressão gênica (mRNA) do receptor Mas e da ECA2 no tecido miometrial sadio e no leiomioma uterino;
- b) Verificar a localização imunohistoquímica da Ang-(1-7), ECA2 e receptor Mas nas células miometriais e nos miomas uterinos.

5. PACIENTES E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Projeto: CAAE – 60375616.5.0000.5149 (ANEXO A) .

Participaram do estudos, 24 pacientes com miomatose uterina que foram submetidas a histerectomia e/ou miomectomia. Dessas pacientes, 15 tinham lâminas parafinadas e armazenadas em um laboratório de anatomia patológica de Belo Horizonte, MG- Brasil e foram coradas para estudo imunohistoquímico. As outras 9 pacientes tiveram amostras coletadas durante a cirurgia e os fragmentos de miométrio e miomas, foram preparados para extração de mRNA.

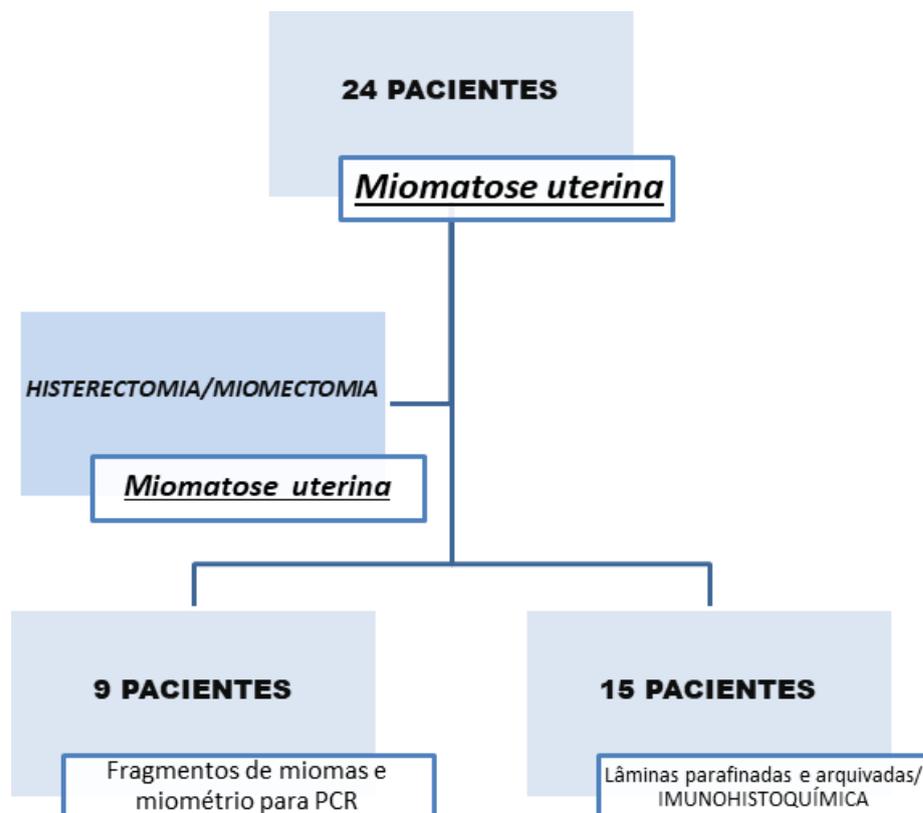


FIGURA 4: Diagrama representando todas as pacientes incluídas no estudo

5.1 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram incluídas no estudo quinze pacientes submetidas a histerectomia total e/ou miomectomia, com amostras parafinadas e arquivadas em um laboratório de anatomia patologia situado em Belo Horizonte, MG. Não havia critérios de exclusão das pacientes.

Dessas quinze pacientes, analisamos por imuno-histoquímica 18 amostras de leiomioma uterino e 9 amostras de miométrio normal extraídas das mesmas peças cirúrgicas. Todas as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina e revisadas por um patologista. Outros cortes foram corados com Tricrômio de Masson, específico para evidenciar colágeno.

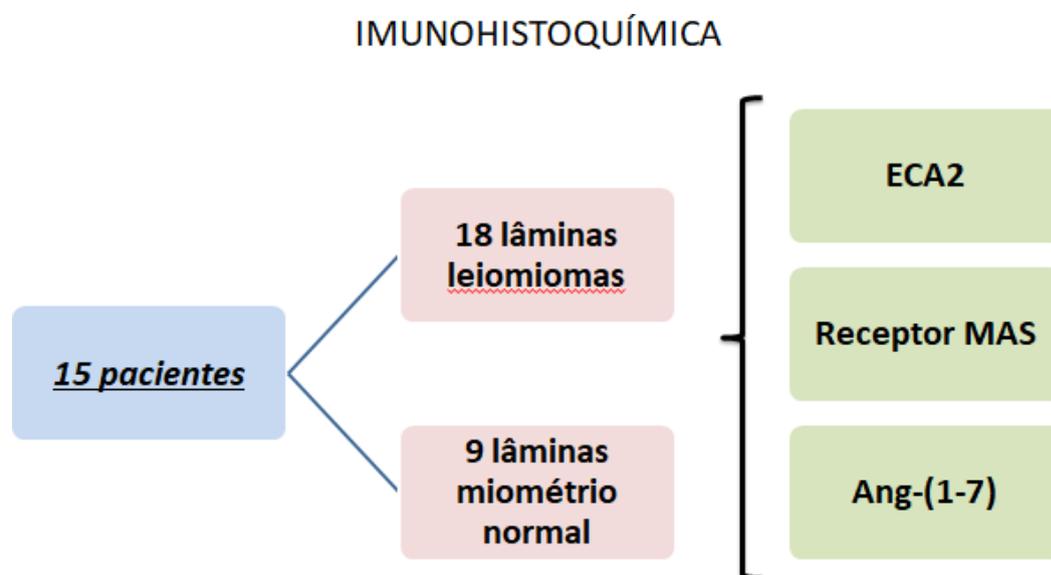


FIGURA 5: Diagrama representando as pacientes utilizadas para estudo imunohistoquímico

Cortes dos tecidos incluídos em parafina foram colocados em lâminas silanizadas e submetidos à coloração imuno-histoquímica utilizando polímeros não biotinilados através do *kit* Novolink (Novocastra, New Castle Upon Tyne, Reino Unido) para detecção dos receptores anti-MAS (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-ANG (1-7) (Phoenix Pharmaceuticals Inc, California, US) e ECA2 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos à recuperação antigênica em solução tampão EDTA 0,01M pH 8,0, aquecidos em forno micro-ondas por 5 minutos. Após esfriamento, os cortes foram lavados com PBS e, então, submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com solução com o reagente peroxidase block seguido da incubação com o reagente protein block. Após essa etapa de bloqueio, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, overnight. Como controle negativo, os cortes foram incubados apenas com PBS. Após lavagens, foi realizada incubação com o post primary, seguido de incubação com o polymer (5µg/mL).

A imunomarcação foi visualizada com a reação com 3,3'diaminobenzidina contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão do próprio kit. Os cortes foram finalmente contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados, para posterior observação e documentação.

5.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Além das pacientes que tiveram lâminas parafinadas avaliadas, também foram incluídas no estudo, outras 9 pacientes submetidas a histerectomia total e/ ou miomectomia, que tiveram fragmentos de miomas e miométrio normal analisados. Dessas nove pacientes, analisamos por PCR a expressão gênica de ECA2 e do receptor MAS de 15 fragmentos de tecidos coletados durante as cirurgias, sendo 9 fragmentos de miomas e 6 fragmentos de miométrio normal.

PCR para EXPRESSÃO GÊNICA: ECA2 e rMAS

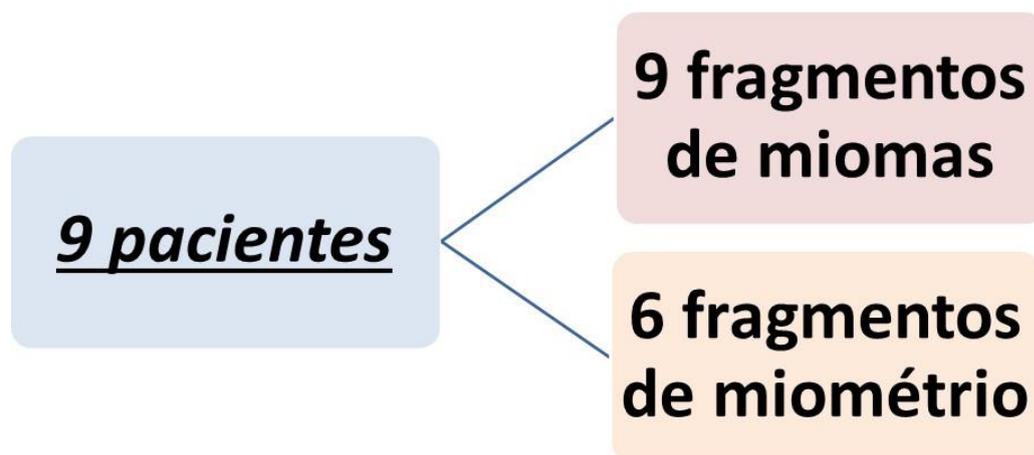


FIGURA 6: Diagrama representando as pacientes utilizadas para estudo de extração de RNA

A expressão do receptor Mas e ECA2 foi avaliada por PCR em tempo real após a extração de RNA-mensageiro (mRNA). Para a extração do RNA total o fragmento dos miomas e miométrio, foram macerados e sonicados em 1 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações.

Ao término do protocolo, o RNA total era ressuspensão em água diethylpyrocarbonate (H₂O DEPC), livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular e quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), utilizando alíquota de 2 µL. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amplification grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e em seguida requantificadas no NanoDrop.

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total tratado com DNase em 20 µL de volume da reação final (20 ng RNA/µL), utilizando o kit Superscript IV first-strand system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sem alteração do protocolo original.

Os primers (oligonucleotídeos) iniciadores designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real foram estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no GeneBank, obtida no Blastb. As sequências foram posteriormente analisadas no site da empresa Integrated DNA Technologies (IDT) c, que permitiu a elaboração dos primers para as regiões-alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada primers. Como gene de referência para correção da expressão dos genes-alvo na PCR em tempo real, foi utilizado o gene que codifica a proteína

ribossomal S26. Os primers foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em H₂O DEPC, livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/ μ L (concentração para estoque). Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/ μ L (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da PCR em tempo real. Para o aliquotamento dos primers, foram empregadas ponteiras com barreira e todo o manuseio foi realizado utilizando-se luvas e máscara. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas no QUADRO 02.

Primers	Sequência de Nucleotídeos	Tamanho
ECA2reverse	TCCATTTACAGGCCCTTCTTCC	22nt
ECA2foward	GGATGGAGTACCGACT	16nt
rMASreverse	ATGAAAGGGTTGGCGCTACT	20nt
rMASfoward	TTGGTCGACCTTTGGGAACC	20nt
S26reverse	GGGTGGAAATGCGTTCCTAGT	22nt
S26foward	CCGCCATCCGGCTAAATAGT	21nt

QUADRO 02: localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados

A PCR foi realizada como descrito anteriormente em um Sistema de Detecção de Sequência ABI-Prism 7500, com o uso do corante fluorescente Power SYBR Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os parâmetros da PCR foram:[estágio 1] um ciclo de 95 ° C / 10min; [estágio 2] 40 ciclos de 95 ° C / 15 segundos, 60 ° C / 15 segundos e 72 ° C / 20 segundos;

[estágio 3] 95/15 segundos, 54/15 segundos e 95/15 segundos. O gene que codifica a proteína ribossômica S26 foi usado como controle interno . A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada por curvas de fusão de dissociação de pico único. Nenhuma amplificação de fragmentos ocorreu em amostras de controle negativo preparadas sem transcriptase reversa.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados da análise de mRNA, expressos como diferença do ciclo limiar (*cycle treshold*, CT) entre o gene alvo e o controle interno (Δ CT), foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que o número de casos não foi suficiente para testar se a distribuição seguia o padrão da curva normal. A expressão gênica relativa (relação entre leiomioma e miométrio) foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ é o Δ CT apurado para cada gene alvo nas amostras de leiomioma menos o Δ CT do mesmo gene nas amostras de miométrio. Diferenças estatisticamente significativas foram definidas como aquelas com valor de p inferior a 0,05.

6 RESULTADOS

Foi demonstrado pela PCR em tempo real que tanto o receptor MAS , quanto a ECA2 estão presentes em amostras de leiomiomas e miométrio com expressão semelhante nos dois tecidos.

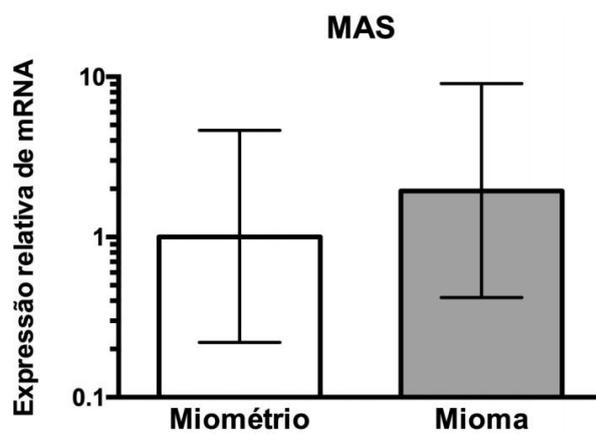


FIGURA 7: expressão gênica de mRNA do receptor MAS

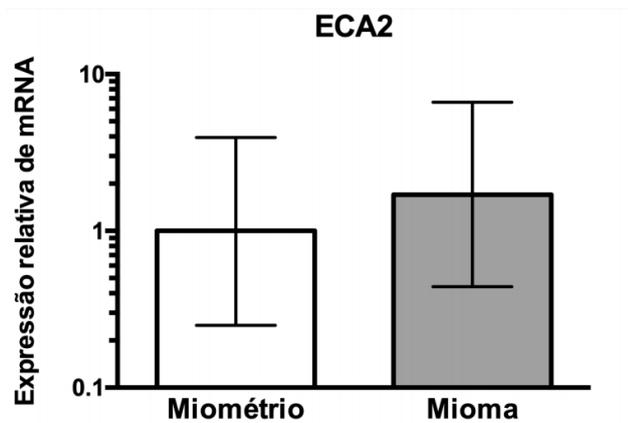


FIGURA 8: expressão gênica de mRNA da ECA2

A Ang-(1-7) foi detectada no citoplasma das células musculares lisas, com ampla distribuição e intensidade moderada, tanto no miométrio normal quanto no mioma uterino.

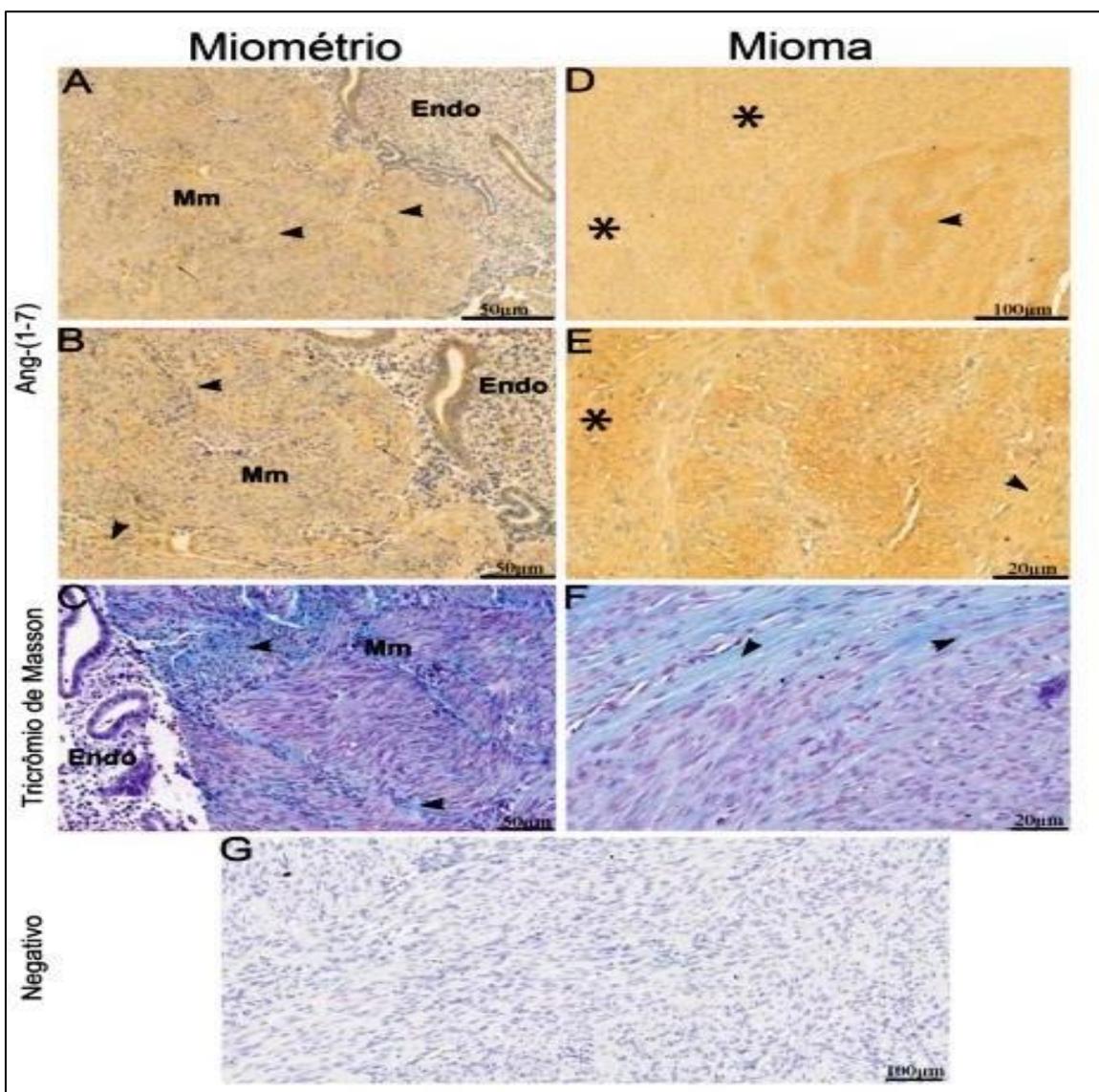


FIGURA 9: expressão de Ang-(1-7) em miométrio e em leiomioma uterino.

(A,B,D,E) imunomarcção específica para Ang-(1-7);

(A e B): cabeças de seta evidenciam presença da Ang-(1-7), no citoplasma de células musculares lisas miometriais e seta fina mostra Ang-(1-7) no epitélio vascular;

(D e E): asteriscos demonstram a presença de Ang-(1-7) em miofibroblastos difusamente no leiomioma e a cabeça de seta evidencia a imunomarcção em região com maior densidade celular e no epitélio vascular

(G) controle negativo da imunohistoquímica em leiomioma;

(C,F) coloração de miométrio e leiomioma com tricrômio de Masson, evidenciando colágeno em azul nas cabeças de seta;

Endo= endométrio; Mm= miométrio.

A ECA2 foi detectada no miométrio normal e nos miomas uterinos, sendo particularmente mais concentrada nas regiões de maior densidade celular.

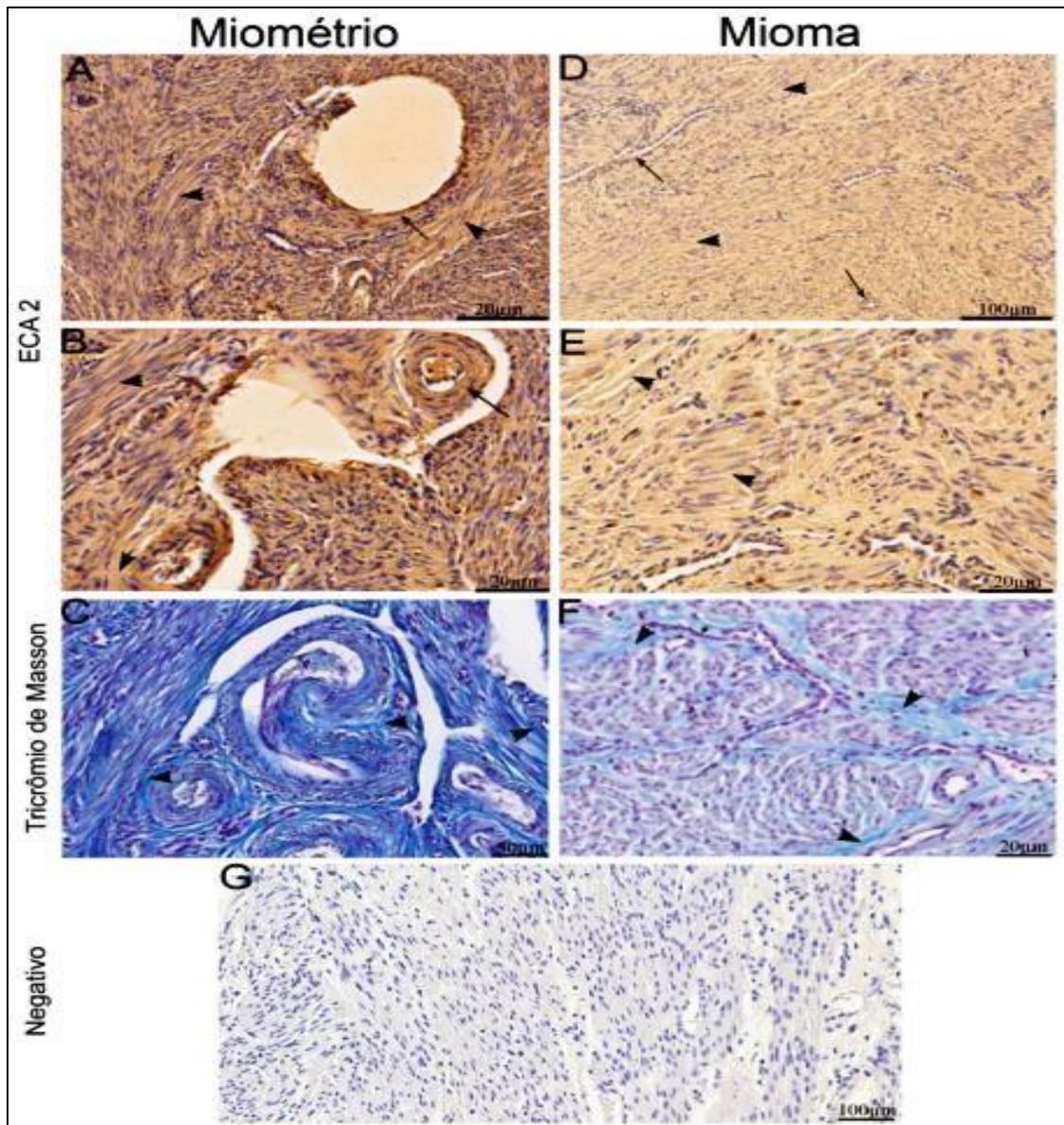


FIGURA10 - Expressão de ECA2 em miométrio e em leiomioma uterino. (A-E) imunomarcção específica para ECA2 em miomas e miométrio. Cabeças de seta evidenciam presença da ECA2 no citoplasma de células do miométrio e imunomarcção de ECA2 em região com maior densidade celular no leiomioma (A, B, D e E). Setas demonstram ECA2 no epitélio vascular do tecido miometrial e no epitélio vascular de leiomioma (A, B e D). G = controle negativo. (C e F) = coloração de miométrio e leiomioma com tricromo de Masson, evidenciando colágeno em azul (cabeças de seta).

O receptor MAS estava presente nas células musculares lisas normais e fibróticas, com localização nuclear frequente.

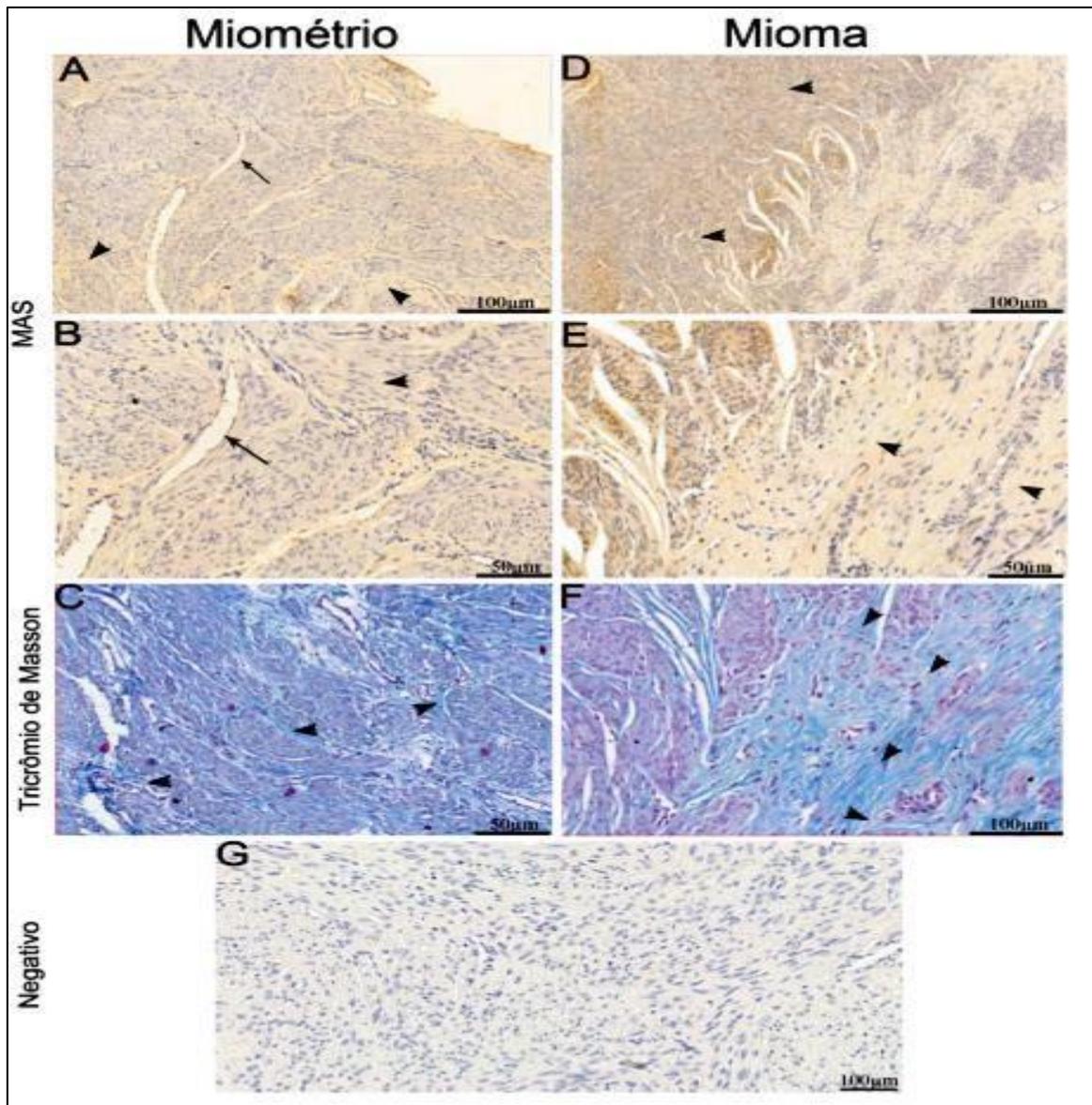


FIGURA11 - Expressão de receptor Mas em miométrio e em leiomioma uterino. (A-E) imunomarcção específica para receptor Mas em miomas e miométrio. (A e B): Cabeças de seta evidenciam presença do receptor Mas nas células musculares lisas do miométrio e nas células miomatosas, especialmente em região perinuclear (A, B, D e E). Setas demonstram a presença de rMAs no epitélio vascular do tecido miometrial (A e B). G = controle negativo. (C e F) = coloração de miométrio e leiomioma com tricromo de Masson, evidenciando colágeno em azul (cabeças de seta).

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Neste estudo demonstramos que o miométrio humano e os leiomiomas uterinos contêm o eixo protetor completo do sistema renina-angiotensina. Foi demonstrado que tanto o receptor MAS , quanto a ECA2 estão presentes em amostras de leiomiomas e miométrio com expressão semelhante nos dois tecidos.

Detectamos a presença de Ang-(1-7) no citoplasma das células musculares lisas, com ampla distribuição e intensidade moderada, tanto no miométrio normal quanto no mioma uterino.

Evidenciamos que a ECA2 está presente no miométrio normal e nos miomas uterinos, sendo particularmente mais concentrada nas regiões de maior densidade celular.

Demonstramos também que o receptor MAS está presente nas células musculares lisas normais e fibróticas, com localização nuclear frequente.

Podemos observar que a expressão gênica do receptor Mas e da ECA2 no miométrio e nos miomas , demonstram de forma inédita, a presença deste eixo protetor do SRA nos fibromas uterinos, uma vez que outros estudos mostraram a presença desta via apenas no endométrio humano (Vaz-Silva J, Carneiro MM, Ferreira MC, Pinheiro SV, Silva DA, Silva-Filho AL, Witz CA, Reis AM, Santos RA, Reis FM. 2009).

Ao evidenciarmos a presença da via alternativa ECA2/Ang-(1-7) nos leiomiomas nesse estudo inicial, podemos inferir que o eixo alternativo do SRA, mesmo presente no tecido uterino, não foi capaz de inibir o desenvolvimento da miomatose uterina, embora já esteja bem documentado o papel desses peptídeos como uma via protetora e antifibrótica (*Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM.2013*).

O eixo ACE2- angiotensina - (1-7) -Mas é protetor e atua para contrabalançar os efeitos deletérios do receptor ACE- angiotensina II (Ang II) -Ang II tipo 1 e exerce efeitos antifibróticos. Aqui neste trabalho, demonstramos que ECA2/Ang- (1-7) estão presentes mesmo em tecido com deposição de colágeno e diferenciação miofibroblástica .

Por imunohistoquímica, a Ang (1-7) já havia sido localizada no endométrio ao longo do ciclo menstrual, sendo mais concentrada no epitélio glandular da fase secretor média e tardia (*Vaz-Silva J, Carneiro MM, Ferreira MC, Pinheiro SV, Silva DA, Silva-Filho AL, Witz CA, Reis AM, Santos RA, Reis FM. 2009*).

No nosso trabalho, podemos observar na coloração imunohistoquímica que este peptídeo está localizado também no miométrio humano e nos leiomiomas.

A Ang- (1-7), mediada pelo receptor Mas, tem efeitos inibitórios sobre a inflamação renal e a fibrose em diabetes em modelo experimental (*Cassis P, Locatelli M, D Corna, Villa S, D Rottoli, Cerullo D, Abbate M, Remuzzi G, Benigni A, Zoja C. 2019*). No entanto, Ang- (1-7) tem uma meia-vida curta no plasma, e ao detectarmos a presença deste peptídeo em tecidos fibróticos uterinos, percebemos que outros mecanismos proliferativos de matriz extracelular intrauterina, podem se sobrepor ao efeito antifibrose neste tecido.

A patogênese dos leiomiomas, ainda não totalmente esclarecida, envolve muitos fatores genéticos e epigenéticos, papel importante dos esteróides sexuais associados a fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e matriz extracelular e seu envolvimento na proliferação celular, processos fibróticos, apoptose e angiogênese. (Ciarmela P, Islam MS, Reis FM, Gray PC, Bloise E, Petraglia F, Vale W, Castellucci M. 2011) . A existência da via ECA2/Ang- (1-7), agora bem documentada por nosso estudo, estando presente no mioma e miométrio, se torna mais um caminho na busca de entendimento melhor da miomatose uterina.

Optamos por utilizar um grupo de pacientes para descrição do eixo alternativo do SRA através de estudo imunohistoquímico, e outro grupo distinto para extração de RNAm e avaliação da expressão gênica do receptor Mas e ECA2, devido a dificuldade de extração de RNAm em lâminas parafinadas já preparadas anteriormente e arquivadas em serviço da anatomia patológica. Tratando-se de um trabalho descritivo, o número das amostras analisadas foi suficiente para concluirmos sobre a presença ou não da via ECA2/Ang-(1-7) no miométrio e leiomiomas, entretanto sabemos que podemos aumentar nosso número de pacientes para tentarmos avaliar quantitativamente com maior significância a existência dos peptídeos envolvidos no eixo protetor do SRA em leiomiomas uterinos.

Devido a importância clínico/epidemiológica da miomatose uterina, já explorada em nossa revisão bibliográfica, é paradoxal que tão pouco se saiba sobre a biologia de um tumor que tem uma morbidade tão expressiva.

Notamos progressos substanciais feitos na identificação e compreensão do ambiente molecular em torno dos leiomiomas e parece que o crescimento e a regressão do leiomioma são determinados pela taxa de proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese, produção de protease e deposição de MEC. Não podemos esquecer do papel dos esteróides ovarianos e vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, hormônios peptídicos e fatores de estresse, e assim por diante, como os principais reguladores de muitos desses processos. No entanto, as funções biológicas de muitas destas moléculas no leiomioma permanecem desconhecidas e dessa forma que pretendemos contribuir com essa descrição inédita da presença da expressão da Ang-(1-7), do receptor Mas e da ECA2 em leiomiomas uterinos e miométrio humano, estimulando maiores estudos nessa área.

Concluimos que o miométrio humano e os miomas uterinos contêm os principais componentes do eixo protetor/antifibrótico do sistema renina-angiotensina. Sendo assim a importância funcional desse sistema para o desenvolvimento dos miomas necessita de contínua investigação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Islam MS, et al. Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*. 2013;100(1):178–193.
2. Islam MS, et al. *Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(3):921–934.
3. Ciarmela P, et al. Management of leiomyomas in perimenopausal women. *Maturitas*. 2014;78(3):168–73
4. Downes E, et al. The burden of uterine fibroids in five European countries. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2010;152(1):96–102.
5. Ciavattini A, et al. Uterine Fibroids: Pathogenesis and Interactions with Endometrium and Endomyometrial Junction. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013;2013:11.
6. Flake GP, et al. The natural history of uterine leiomyomas: light and electron microscopic studies of fibroid phases, interstitial ischemia, inanesis, and reclamation. *Obstet Gynecol Int*. 2013;2013:528376
7. Ciavattini A, et al. Growth trend of small uterine fibroids and human chorionic gonadotropin serum levels in early pregnancy: an observational study. *Fertil Steril*. 2016;105(5):1255–1260.
8. da Silva AP, et al. Histopathological and Digital Morphometrical Evaluation of Uterine Leiomyoma in Brazilian Women. *Obstet Gynecol Int*. 2016;2016:2968410.
9. Yoshino O, et al. Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. *Hum Reprod*. 2010;25(10):2475–9.
10. Leppert PC, et al. *Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium*. *Fertility and Sterility*. 2004;82(Suppl 3):1182–1187.
11. Islam MS, et al. Role of activin-A and myostatin and their signaling pathway in human myometrial and leiomyoma cell function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(5):E775–E785
12. Norian JM, et al. Transforming growth factor beta3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. *Reproductive Sciences*. 2009;16(12):1153–1164
13. Stewart EA, et al. Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994;79(3):900–906.
14. Leppert PC, Catherino WH, Segars JH. A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(2):415–420
15. Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science*. 2005;308(5728):1589–1592.

16. Noda H. Partial specific volume of collagen. *J Biochem.* 1972;71(4):699–703.
17. Coan P, et al. Characterization of osteoarthritic and normal human patella cartilage by computed tomography X-ray phase-contrast imaging: a feasibility study. *Invest Radiol.* 2010;45(7):437–44.
18. Ciavattini A, et al. Number and size of uterine fibroids and obstetric outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(4):484–8.
19. Ciavattini Andrea, Delli Carpini Giovanni, Serri Matteo, Vignini Arianna, Sabbatinelli Jacopo, Tozzi Alessandra, Aggiusti Alice, Clemente Nicolò. Hypovitaminosis D and “small burden” uterine fibroids. *Medicine.* 2016;95(52):e5698.
20. Moore AB, et al. Stimulatory and inhibitory effects of genistein on human uterine leiomyoma cell proliferation are influenced by the concentration. *Hum Reprod.* 2007;22(10):2623–2631
21. Di X, et al. A low concentration of genistein induces estrogen receptor-alpha and insulin-like growth factor-I receptor interactions and proliferation in uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod.* 2008;23(8):1873–83.
22. Di X, et al. A high concentration of genistein down-regulates activin A, Smad3 and other TGF- β pathway genes in human uterine leiomyoma cells. *Experimental & molecular medicine.* 2012;44(4):281–292.
23. Castro, L. *et al.* A High Concentration of Genistein Induces Cell Death in Human Uterine Leiomyoma Cells by Autophagy. *Expert Opin Environ Biol*, 5(Suppl 1) (2016).
24. Giampieri, F. *et al.* Romina: A powerful strawberry with *in vitro* efficacy against uterine leiomyoma cells. *J Cell Physiol* (2018).
25. Islam MS, et al. Omega-3 fatty acids modulate the lipid profile, membrane architecture, and gene expression of leiomyoma cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):7143–7156.
26. Islam MS, et al. An anthocyanin rich strawberry extract induces apoptosis and ROS while decreases glycolysis and fibrosis in human uterine leiomyoma cells. *Oncotarget.* 2017;8(14):23575–23587.
27. Islam MS, et al. Molecular targets of dietary phytochemicals for possible prevention and therapy of uterine fibroids: Focus on fibrosis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2017;57(17):3583–3600.
28. Islam MS, et al. Dietary phytochemicals for possible preventive and therapeutic option of uterine fibroids: Signaling pathways as target. *Pharmacological Reports.* 2016;69(2017):57–70.
29. Day Baird D, et al. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2003;188(1):100–107.

30. Cardozo ER, et al. The estimated annual cost of uterine leiomyomata in the United States. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012;206(3):211. e1–211. e9.
31. Islam MS, et al. Antiproliferative effect of tranilast on human myometrial and leiomyoma cells. *Biological and Biomedical Reports*. 2012;2(5):321–327.
32. Islam MS, et al. Tranilast, an orally active antiallergic compound, inhibits extracellular matrix production in human uterine leiomyoma and myometrial cells. *Fertility and sterility*. 2014;102(2):597–606
33. Islam Md Soriful, Akhtar Most Mauluda, Ciavattini Andrea, Giannubilo Stefano Raffaele, Protic Olga, Janjusevic Milijana, Procopio Antonio Domenico, Segars James H., Castellucci Mario, Ciarmela Pasquapina. Use of dietary phytochemicals to target inflammation, fibrosis, proliferation, and angiogenesis in uterine tissues: Promising options for prevention and treatment of uterine fibroids? *Molecular Nutrition & Food Research*. 2014;58(8):1667–1684.
34. Islam MS, et al. Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Hum Reprod Update*. 2018;24(1):59–85.
35. Rafique S, Segars JH, Leppert PC. Mechanical Signaling and Extracellular Matrix in Uterine Fibroids. *Semin Reprod Med*. 2017;35(6):487–493.
36. Thorne JT, et al. Dynamic reciprocity between cells and their microenvironment in reproduction. *Biol Reprod*. 2015;92(1):25.
37. Leppert PC, Jayes FL, Segars JH. The extracellular matrix contributes to mechanotransduction in uterine fibroids. *Obstet Gynecol Int*. 2014;2014:783289.
38. Protic O, et al. Activin A in Inflammation, Tissue Repair, and Fibrosis: Possible Role as Inflammatory and Fibrotic Mediator of Uterine Fibroid Development and Growth. *Semin Reprod Med*. 2017;35(6):499–509.
39. Protic O, et al. Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell & Tissue Research*. 2016;364:415–427.
40. Leppert, P., M. Fouany & J. H. Segars Understanding uterine fibroids, in *Fibroids*, J.H. Segars, Editor. 2013, John Wiley & Sons, Ltd: Oxford. p. 1–10.
41. Ciarmela P, et al. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*. 2011;17(6):772–790.

9. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 60375616.5.0000.5149

Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de outubro de 2016, o projeto de pesquisa intitulado **“Expressão e sinalização de miostatina em leiomiomas uterinos”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG