



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**



MARIA SIMONE OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA VITAMINA D
NO LEIOMIOMA UTERINO E NO MIOMÉTRIO NÃO NEOPLÁSICO**

**TERESINA
2019**

MARIA SIMONE OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA VITAMINA D
NO LEIOMIOMA UTERINO E NO MIOMÉTRIO NÃO NEOPLÁSICO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

Coorientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

**TERESINA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

L732a Lima, Maria Simone Oliveira.
Avaliação da expressão do receptor da vitamina D no
Leiomioma Uterino e no Miométrio não neoplásico. /
Maria Simone Oliveira Lima. – 2019.
59 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-
Graduação em Ciências e Saúde, Universidade Federal
do Piauí, Teresina, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa”.

1. Receptor da vitamina D. 2. Mioma.
3. Miométrio não neoplásico. 4. Imunoistoquímica. I.
Título.

CDD 618.14

MARIA SIMONE OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA VITAMINA D
NO LEIOMIOMA UTERINO E NO MIOMÉTRIO NÃO NEOPLÁSICO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Data da defesa: 06 de junho de 2019

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

1º Examinador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

2º examinador: Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos

Suplente: Prof. Dr. Ione maria Ribeiro Soares Lopes

Dedico primeiramente à **Deus**, por estar sempre guiando meus caminhos e ter me concedido saúde, força e disposição para me permitir alcançar mais esta realização em minha vida.

À minha mãe **Maria Lúcia de Oliveira Lima**, por ser minha fortaleza em todos os momentos, ao meu pai **Martinho Cardoso Lima** “In Memoriam” que tenho certeza que estaria muito feliz com tamanha realização. Aos meus irmãos **Martogil de Oliveira Lima, Marlúcia Oliveira Lima e Mariéle Oliveira Lima** e suas respectivas famílias por todo amor, carinho, apoio, paciência e alegrias proporcionadas durante esta jornada.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa**, meu orientador e ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, Coorientador, que foram verdadeiros mestres, essenciais em minha formação como pesquisadora, agradeço pela brilhante ideia de pesquisa e orientação deste estudo, pela acolhida, incentivo e confiança, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Aos **professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições.

Aos diretores **do Hospital Getúlio Vargas** pela autorização para coletarmos material em suas dependências para o desenvolvimento de nossa pesquisa nesta conceituada instituição.

À secretária do Setor de Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas, **Eugênia** que foi essencial para realização desta pesquisa, obrigada de coração por imensa colaboração, apoio e amizade.

Aos colegas do grupo de pesquisa dentre eles **Emerson Brasil, Walberto Filho e Eduardo** agradeço pela amizade, ajuda, apoio e parceria. Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges, em especial, **João Paulo, Diego, Danylo, Conceição, Luana e Camila**, agradeço por toda ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe **do Centro Cirúrgico do Hospital Getúlio Vargas** por toda atenção e disposição dispensadas na realização das coletas.

À equipe **do Setor de Patologia do Hospital Getúlio Vargas** pela acolhida, em especial agradeço a **Joed** por toda atenção, paciência, explicações e ensinamentos.

À todos os **familiares e amigos** que estiveram presentes ao longo deste período, na torcida, com toda paciência, carinho, incentivo e atenção, o meu muito obrigada!

Introdução: Os miomas uterinos são os tumores pélvicos sólidos benignos mais frequentes nas mulheres em idade reprodutiva. Atualmente, a presença de miomas uterinos constitui a principal indicação de histerectomia devido a morbidade que ocasionam sangramento intenso, compressão nos órgãos adjacentes, dor e infertilidade. Alguns estudos mostram que a expressão do receptor de vitamina D (VDR) se correlaciona com a etiologia dos leiomiomas uterinos. **Objetivo:** Avaliar a expressão do receptor da vitamina D no leiomioma uterino e no miométrio não neoplásico. **Pacientes e Métodos:** estudo transversal controlado, envolvendo 40 mulheres, atendidas no Setor de Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas que se submeteram à cirurgia de histerectomia abdominal para comparar a expressão imunoistoquímica do VDR nas amostras teciduais de leiomioma uterino e tecido miometrial não neoplásico. A expressão do VDR foi avaliada através da contagem das células com núcleo corados em marrom de forma quantitativa, por meio de um microscópio óptico, acoplado a um computador com sistema de imagemlab, sendo o nível de confiança de 95% e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. **Resultados:** Observou-se células com núcleos corados pelo anti-VDR no miométrio e leiomioma de 79,52% e 60,22%, respectivamente ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Observou-se níveis reduzidos de receptor de vitamina D em miomas uterinos humanos em comparação com o miométrio não neoplásico, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Palavras chaves: Receptor da vitamina D. Mioma. Miométrio não neoplásico, imunoistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Uterine fibroids are the most common benign solid pelvic tumors in women of reproductive age. Currently, the presence of uterine fibroids is the main indication for hysterectomy due to morbidity that causes intense bleeding, compression in adjacent organs, pain and infertility. Some studies have shown that vitamin D receptor (VDR) expression correlates with the etiology of uterine leiomyomas. **Objective:** To evaluate the expression of the vitamin D receptor in the uterine leiomyoma and the non neoplastic myometrium. **Patients and methods:** A cross-sectional, controlled study involving 40 women attended at the Gynecology Sector of Hospital Getúlio Vargas who underwent abdominal hysterectomy surgery. We compared the immunohistochemical expression of VDR between tissue samples from uterine leiomyoma and non neoplastic, myometrial tissue. VDR expression was assessed by counting the cells with positively stained nuclei quantitatively, by means of an optical microscope, coupled to a computer with image system, with 95% confidence level and $p < 0.05$. Results: Were observed cells with nuclei stained by anti-VDR in the myometrium and leiomyoma of 79.52% and 60.22%, respectively ($p < 0.0001$). **Conclusion:** Reduced vitamin D receptor levels were observed in human uterine fibroids compared with non neoplastic myometrium, with this difference being statistically significant ($p < 0.0001$).

Key words: Vitamin D Receptor, Mioma, Non neoplastic myometrium, Immunohistochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Tipos de leiomiomas.....	23
FIGURA 2 - Efeitos da ativação do receptor da vitamina D nos fenômenos celulares.....	26
FIGURA 3 - Núcleos corados expressando VDR em leiomioma e miométrio Normal adjacente	38
FIGURA 4 - Boxplots da porcentagem de células coradas expressando VDR no mioma e miométrio normal adjacente	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características das pacientes	37
TABELA 2 - Porcentagem média de núcleos corados com anti-Vitamina D receptor no mioma e miométrio normal adjacente	38

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ECM	Massa Extracelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
MMPs	Metaloproteinases
EUA	Estados Unidos da América
VDR	Receptor de Vitamina D
RNs	Receptores nucleares
RXR	Receptor de ácido Retinóico X
LBD	Domínio de ligação ao ligante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
VDRE	Elementos responsivos à Vitamina D
RNA pol	Ácido ribonucleico polimerase
CoA	Coenzima A
BSA	Soroalbumina Bovino
PBS	Phosphate Buffered Saline

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	29
3	PACIENTES E MÉTODOS	31
3.1	Tipo de estudo e local de realização	32
3.2	Critérios de inclusão da amostra	32
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra	32
3.4	Cálculo Amostral	32
3.5	Métodos	33
3.5.1	Coleta de Material Tecidual	33
3.5.2	Método Histopatológico	33
3.5.3	Método Imunoistoquímico	33
3.5.4	Método Quantitativo	34
3.5.5	Método Estatístico	35
3.6	Aspectos Legais e Éticos	35
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICES	53
	APÊNDICE A - Instrumento de Coleta de Dados	54
	ANEXOS	55
	ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí	56
	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	57
	ANEXO C - Comprovante de aceite do Artigo Científico, na Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)	59

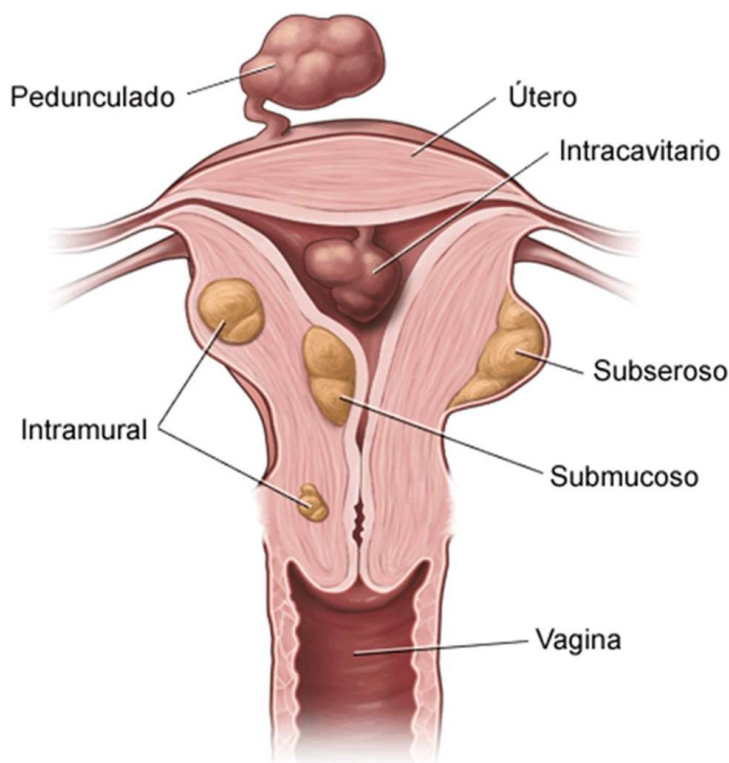
Os miomas uterinos, também conhecidos por leiomiomas ou fibromas uterinos, são os tumores pélvicos sólidos benignos mais frequentes nas mulheres em idade reprodutiva (WALLACH; VLAHOS, 2005). São geralmente detectados entre 30 e 40 anos de idade, sendo relativamente raros em mulheres jovens e na pós-menopausa. Eles são normalmente sintomáticos em 20% a 50% das mulheres em idade reprodutiva (BOZZINI et al., 2004)

Tais fibromas são formações nodulares que se desenvolvem na camada muscular lisa do útero e tem como constituintes o músculo liso e matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e fibronectina). Normalmente, estão relacionados com alterações biológicas de crescimento e desenvolvimento e geralmente influenciadas pelos hormônios sexuais, principalmente o estrogênio, além de outros fatores, como mudanças genéticas e fatores de crescimento (HERNANDEZ et al., 2013; PARKER, 2007)

A forma de apresentação clínica dos tumores uterinos é variável e depende, principalmente, do tamanho, da localização e do número de nódulos miomatosos (KISILEVZKY, MARTINS, 2003). Atualmente, a presença de miomas uterinos constitui a principal indicação de histerectomia, devido a morbidade. São responsáveis por mais de 600.000 histerectomias e de cerca de 42.000 miomectomias por ano nos Estados Unidos da América - EUA (FARIA; GODINHO; RODRIGUES, 2008).

Os miomas podem ser únicos ou múltiplos, sendo classificados segundo a sua localização anatômica (GANTE, 2017). A maioria surge no corpo do útero e uma minoria ao nível do colo uterino ou ligamento largo e podem ser classificados em subserosos, intramurais ou submucosos. Os subserosos situam-se imediatamente abaixo da serosa e podem estar ligados ao corpo uterino. Os intramurais encontram-se predominantemente na espessura do miométrio, podendo distorcer a cavidade uterina ou o contorno exterior do útero e os submucosos localizam-se imediatamente abaixo do endométrio (FARIA; GODINHO; RODRIGUES, 2008) (FIGURA 1)

FIGURA 1. Tipos de fibromas uterinos



Fonte: Adaptado da página do Stanford Children's Health. Disponível em: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=fibroides-uterinos-85-Z-P03653>> access on 25 Jan. 2019.

Os leiomiomas podem provocar um impacto significativo na qualidade de vida de mulheres em idade reprodutiva, dependendo de sua posição anatômica, quantidade e tamanho, esses tumores podem ocasionar alguns sintomas como, irregularidade menstrual em cerca de 30% dos casos, sendo a hemorragia o mais frequente deles (BOCLIN; FAERSTEIN, 2013). Os quatro principais sintomas dos leiomiomas que são indicação apropriada para intervenção são o sangramento intenso, a dor, a compressão nos órgãos adjacentes e a infertilidade (CUNHA, 2006; SILVA et al., 2005)

Miomas subserosos tendem a causar sintomas compressivos e distorção anatômica de órgãos adjacentes, os intramurais causam sangramento e dismenorreia, enquanto que os submucosos produzem sangramentos irregulares com maior frequência (CORLETA, 2007). Além disso, observou-se que esses últimos estão mais associados à disfunção reprodutiva causando infertilidade e desfechos gestacionais adversos, como abortos espontâneos, anomalias fetais, partos prematuros e aumento na indicação de cesarianas. (BOCLIN, 2013; PRITTS; PARKER; OLIVE, 2009).

A etiologia dos leiomiomas ainda não foi completamente esclarecida e mais recentemente tem sido sugerido que a vitamina D pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento deles. Várias evidências experimentais *in vitro* e *in vivo* apoiam esta visão (HALDER, 2013).

Os leiomiomas são caracterizados por deposição excessiva de matriz extracelular (ECM), bem como um aumento na proliferação celular (BAIRD, 2013). Alterações neste processo de degradação e remodelação podem contribuir na gênese do leiomioma. As principais enzimas envolvidas nessa degradação são as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são por sua vez são regulados por inibidores teciduais de metaloproteinases (HALDER, 2013).

As metaloproteinases de matriz são uma família de proteinases dependentes de zinco estrutural e fisiologicamente relacionadas por sua capacidade de degradar a matriz extracelular (CHIA; KUMARI; CASEY, 2014). Elas possuem envolvimento no funcionamento normal de vários tecidos durante o crescimento, desenvolvimento e envelhecimento. É importante destacar que a expressão de MMP é induzida por uma série de fatores, incluindo citocinas inflamatórias, hormônios, fatores de crescimento e oncogêneses (STOELTZING et al., 2003; GIGANTI et al., 2016).

As MMPs causam a degradação da matriz extracelular e regulam a adesão de células (AMĂLINEI et al., 2010). A MMP-9, em particular, degrada e destrói a matriz adjacente e cria dano vascular na barreira endotelial tumoral, levando a diminuição do impedimento estérico, aumentando permeabilidade vascular e o extravasamento de nutrientes (MARTIN; MATRISIAN, 2007). Estas alterações da matriz proporcionam espaço para a neovascularização das neoplasias uterinas e promovem o crescimento tumoral (COSTA et al., 2016).

O metabolito ativo da vitamina D, reconhecido com um hormônio esteroide, tem sido demonstrado como inibidor da proliferação de células e produção de matriz extracelular em culturas de tecido fibroide, reduzindo o volume de mioma. A vitamina D exerce os seus efeitos através da ativação do seu receptor celular, receptor de vitamina D (VDR), que por sua vez altera as taxas de transcrição dos genes alvo responsáveis por várias respostas biológicas (HALDER, 2011; ZHANG, 2006).

A vitamina D proveniente de fontes alimentares ou da pele, entra na circulação e se liga à proteína ligadora de vitamina D (DBP), através da qual é transportada ao fígado, onde sofre sua primeira hidroxilação no carbono 25 pela ação da enzima 25

hidroxilase, resultando na formação de 25-hidroxivitamina D (25(OH) D) ou Calcidiol (SHIL, 2009). Forma mais abundante deste hormônio no organismo que será secretada no plasma (BONETI, 2013; CUPPARI,2009).

Para se tornar ativa, a 25(OH) D sofre hidroxilação mediada pela enzima 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilase, expressada nos rins, formando a 1,25 hidroxivitamina D (1,25(OH)2D) ou calcitriol, que é a forma ativa da vitamina D no organismo, cuja ação é responsável pela regulação do metabolismo dos minerais cálcio e fósforo no intestino e nos ossos, além da regulação das funções imunológicas e do crescimento celular em vários tecidos alvos (BELLAN; PIRISI; SAINAGHI, 2017; HATO CASTRO, 2016).

Com o entendimento de vários aspectos da fisiologia da vitamina D a partir de estudos bioquímicos e moleculares, sua forma ativa, a 1 α ,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)2D), é um hormônio integrante de um fascinante eixo metabólico: o sistema endocrinológico vitamina D que é formado pelas várias moléculas que compõem o grupo vitamina D, dos quais, sua proteína carreadora (DBP, vitamin D binding protein), seu receptor (VDR, vitamina D receptor) e pelas diversas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação celular (CASTRO,2011).

O receptor de vitamina D é um receptor hormonal intracelular e um membro da família de receptores nucleares. Estes estão envolvidos em diversos eventos celulares e são a maior classe de reguladores transcricionais, podendo agir como monômeros ou formando dímeros, (ROBINSONRECHAVI et al., 2003). Dentro desta superfamília estão os receptores ativados por hormônios esteroides e vitamina D, a exemplo do VDR. (GRONEMEYER et al., 2004).

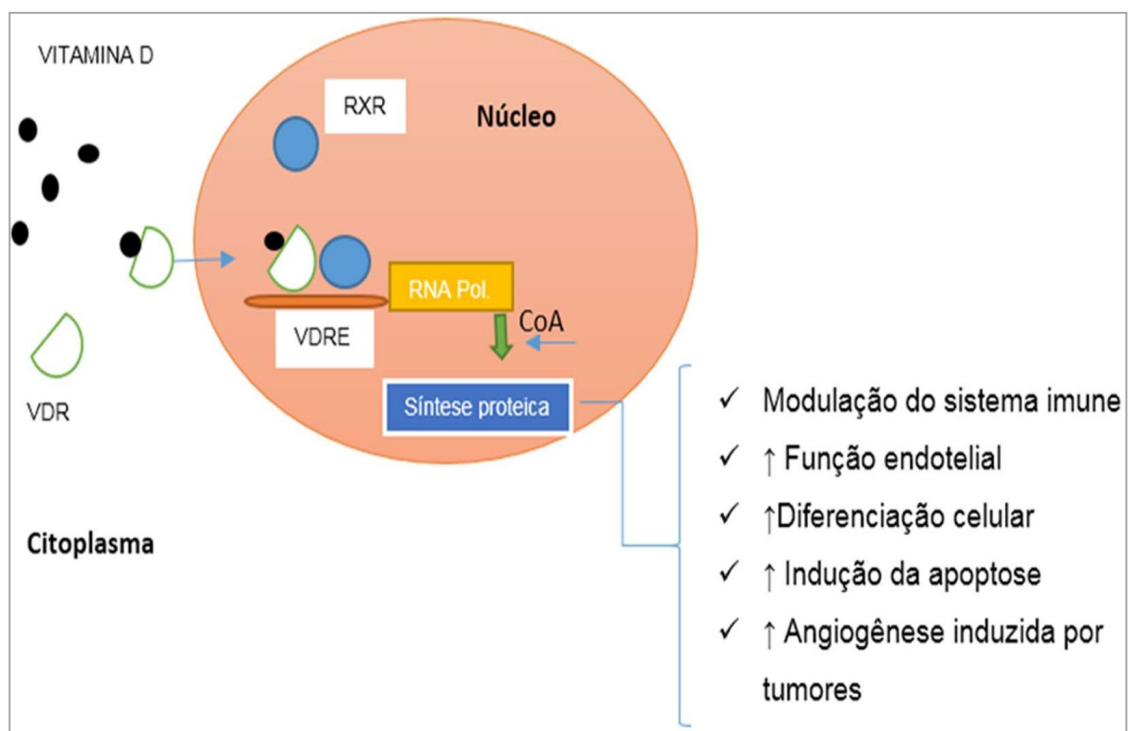
O VDR é sintetizado a partir de um gene localizado no cromossomo 12, conhecido como gene VDR e que apresenta associação com a vitamina D. (PAFFONI, 2013; SABRY, 2012). O receptor da vitamina D pode se ligar à forma ativa da vitamina D, 1,25dihidroxivitamina ou calcitriol e a certos homólogos dela através de sítio de ligação no seu LBD (JIANG, 2004; TOCCHINI-VALENTINI, 2001).

Quando ativado pelo seu ligante, o VDR transloca-se para o núcleo onde irá interagir com as regiões promotoras as quais apresenta afinidade (elementos responsivos) no DNA, neste ponto irá atuar como fator de transcrição gênica, modulando a expressão de genes alvos e assim produzindo múltiplos efeitos biológicos (ISSA et al., 1998; BAKER et al., 1988; RACZ; BARSON, 1999).

No núcleo das células-alvo, esse complexo se liga ao receptor de ácido

retinóico, formando heterodímeros que atuam nos elementos-resposta da vitamina D (VDRE), iniciando, assim, a cascata de interações moleculares que modulam a transcrição de genes específicos (CASTRO, 2011; BARRAL; ARAUJO, 2007). Forma-se, então, um complexo de transcrição em conjunto com a RNA polimerase (RNA pol.) e um coativador (CoA) capaz de induzir ou reprimir a transcrição de genes (BELLAN; PIRISI; SAINAGHI, 2017). FIGURA 2.

FIGURA 2. Possíveis efeitos da ativação do Receptor de Vitamina D nos fenômenos celulares



Fonte: Próprio autor, 2017.

O VDR atua na modulação gênica de diversas células, estimulando a transcrição ou inibindo-a através da sua ligação com os elementos de resposta à vitamina D. (ISSA et al., 1998). A presença do VDR em tecidos diversos sugere a sua participação em processos fisiológicos como atividades imunomoduladoras, antiproliferativas, pródiferenciadoras e antineoplásicas (NEGPAL et al., 2005; KOCHUPILLAI, 2008). Podendo conduzir ações como, à inibição da proliferação celular, indução de diferenciação e a apoptose celular, entre outras. Estes processos em última instância podem levar a uma proteção de células a partir de transformação maligna, bem como a inibição de crescimento celular (BRAKTA et al., 2015)

A produção local de 1,25 (OH) 2D depende de níveis precursores circulantes, o que pode explicar a associação da deficiência sérica de vitamina D com várias doenças e suas diversas funções confirmadas pela presença de VDR em uma ampla gama de tecidos humanos, incluindo pele, cérebro, pâncreas, mama, bem como em células ósseas, intestinais, células do sistema reprodutivo feminino (útero, ovário, placenta), masculino (testículo e próstata) e nas células do sistema imune também (DUSSO, 2005; NORMAN, 2010).

Estudos sugerem existir uma associação de polimorfismos do receptor nuclear da vitamina D (VDR) ao prognóstico de alguns tipos de neoplasias, como câncer de mama, pulmão, tireoide, células renais (BOUILLON et al., 2006), bem como em neoplasias benignas também como a leiomiomatose uterina. Estudos recentes avaliaram a expressão do VDR tanto no miométrio quanto no endométrio do útero humano, ao longo do ciclo menstrual, além dos tecidos de mioma uterino (SABRY, 2013; FENG, 2010).

Chakraborty et al. (2009) pesquisaram a associação entre ações da vitamina D que são mediadas via receptor de vitamina D (VDR) e os polimorfismos desse gene com o risco e à progressão do carcinoma de mama no norte da Índia. Os resultados indicaram que o polimorfismo VDR poli-A está significativamente associado ao risco de câncer de mama, especialmente na doença de início precoce. Outra pesquisa recente estudou o polimorfismo do gene VDR como fator de mau prognóstico para o câncer papilar de tireoide e observaram que o alelo FokI T do gene VDR e o genótipo TT se correlacionaram com a agressividade do câncer, podendo assim, ser útil como um mau fator prognóstico para avaliar o alto risco de câncer papilar de tireoide (BEYSEL et al., 2018).

Feng et al. (2010) realizaram um estudo para determinar a expressão de VDR em miomas uterinos. Foram avaliadas amostras teciduais de mioma intramural e miométrio em diferentes sítios de 5 mulheres que realizaram histerectomia, onde percebeu-se uma alta expressão de receptor de vitamina D na parte central dos fibromas quando comparada com o miométrio. Já a expressão do VDR na margem do fibroma não foi diferente quando comparada ao miométrio central e adjacente. Mostrando diferentes níveis de expressão do VDR dependendo da localização e sugerindo um papel da sinalização de vitamina D na biologia do fibroma.

Um outro estudo mais recente realizado por Al-Hendy et al. (2015) avaliou o papel da 1,25 (OH) 2D3 na expressão de receptores de esteróides sexuais em

células de fibromas uterinos humanos de 14 pacientes. Neste, as células foram tratadas com 1,25 (OH) 2D3 e analisadas quanto à expressão e localização dos receptores usando Western blot, imunohistoquímica, imunofluorescência e ensaios de imunoprecipitação. Foi identificada uma correlação entre os níveis reduzidos de receptor de vitamina D com o mioma, a expressão do VDR foi menor em 60% dos casos (oito de 14) comparado ao miométrio adjacente.

A identificação da expressão do receptor de vitamina D na maioria das células têm mostrado evidências de sua importância como marcador celular que se correlaciona com a presença dos leiomiomas uterinos, porém as pesquisas avaliando a influência deste biomarcador na leiomiomatose uterina são escassas, o que nos levou à concepção do presente estudo.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a expressão do receptor de vitamina D no leiomiomas uterino e no miométrio não neoplásico.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo e local da realização

Trata-se de um estudo transversal controlado e analítico em mulheres portadoras de leiomiomatose uterina sintomática que se submeteram ao procedimento à histerectomia abdominal na Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas, no período de abril a dezembro de 2017.

3.2 Critérios de inclusão da amostra

Foram incluídos neste estudo mulheres em idade reprodutiva de 18 a 45 anos, portadoras de leiomiomatose uterina sintomática e que realizaram a cirurgia de histerectomia abdominal.

3.3. Critérios de não-inclusão da amostra

- Mulheres na pós menopausa;
- Pacientes portadoras de doenças hepáticas, metabólicas, cardiovasculares e renais;
- Pacientes com relatos de outros tipos de malignidade;
- Mulheres que já tenham realizado algum tratamento hormonal ou cirúrgico para o leiomioma;

3.4. Cálculo Amostral

A determinação do tamanho da amostra para o estudo foi obtido a partir da fórmula:

$$n = \frac{N \cdot \hat{p} \cdot \hat{q} \cdot (Z_{\alpha/2})^2}{\hat{p} \cdot \hat{q} \cdot (Z_{\alpha/2})^2 + (N - 1) \cdot E^2}$$

Onde:

n = Numero de indivíduos na amostra

Z_{α/2} = Valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado.

p = Proporção de indivíduos que pertence a categoria que estamos interessados em Estudar.

q = Proporção de indivíduos que não pertence a categoria que estamos interessados em estudar (q = 1 — p).

N= Tamanho da população

E = Margem de erro

O tamanho amostral foi calculado baseado na prevalência de 5,4%, com nível de confiança de 95% e erro amostral de 5% e o n foi estimado em 66 pacientes. (BORGFELDT; ANDOLF, 2000),

3.5. Métodos

3.5.1 Coleta de Material Tecidual

Foram coletadas amostras teciduais com cerca de um centímetro de diâmetro de leiomiomas uterino e de tecido miometrial, este em região uterina livre de miomas e distando no mínimo cinco centímetros de qualquer mioma, por ocasião do procedimento de histerectomia abdominal.

3.5.2 Método histopatológico

As amostras teciduais foram fixadas pelo método clássico descrito por MASSON (1956) em formol tamponado (pH = 7,4), desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 ° C. Após este processo, parte da amostra foi submetida a cortes seriados consecutivos de quatro micrômetros, mantidos em lâminas e corados com hematoxilina-eosina para confirmação diagnóstica de leiomiomatose uterina e tecido miometrial normal. Os blocos de parafina ficaram então armazenados para posterior avaliação imunoistoquímica. Todas as lâminas foram analisadas por um patologista experiente da Universidade Federal do Piauí.

3.5.3 Método Imunoistoquímico

Foi utilizado um anticorpo anti-Vitamin D3 Receptor, policlonal de coelho para o biomarcador Receptor de vitamina D na diluição de 1:25 com soroalbumina bovina (BSA).

Os cortes foram desparafinados em banho de xilol a 110° C e, banhos subsequentes à temperatura ambiente. Após esse processo, os cortes foram colocados em álcool etílico nas concentrações 100, 80 e 50 por cento consecutivamente e lavados em água corrente e destilados. A Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em três banhos de H₂O₂ a 10 volumes, durante três minutos, seguida de lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 a 7,6.

Para recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor T-fall, com o objetivo de desmascarar antígenos. As lâminas foram colocadas em tampão citrato de sódio pH 6,0 durante 30 minutos a 95 °C e, após tempo para resfriamento de 20 minutos, foram lavadas em água corrente e colocadas em tampão PBS. A seguir foram incubadas com anticorpo primário específico “overnight” a 4° C.

Após a incubação, as lâminas foram submetidas a três lavagens em PBS, secadas e incubadas com “Em Vision TM System (DAKO, Código K 1672)” por 1 hora a 37° C. Mais uma vez as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e contra coradas com hematoxilinas de Mayer por 30 segundos. Os cortes foram embebidos de álcool a 100% e xilol para desidratação e em seguida colocadas em lamínulas e resina Entellan.

3.5.4 Método Quantitativo

A expressão dos biomarcadores foi avaliada por dois observadores que estavam cegos em relação a identificação das amostras. Estes observadores contaram as células com núcleo corados positivamente (sob aumento de 400 x), de forma quantitativa, usando um microscópio óptico conectado a uma videocâmara.

Para quantificação dos biomarcadores nucleares, foram contadas 500 células em cada lamina, calculando-se a percentagem de células coradas obtida a partir da razão entre o número de células com núcleos corados e o total de células multiplicada por 100, como na formula abaixo:

$$\text{Porcentagem de células coradas} = \frac{\text{células com núcleos corados}}{\text{Total de células}} \times 100$$

3.5.5 Método Estatístico

O resultado dos dois grupos foram analisados a partir das médias e erro padrão, sendo utilizado o teste t student. A significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$ (KUTNER, et al. 2004).

Foi utilizado o programa R para todas as análises(library epitools).

3.6. Aspectos Legais e Éticos

O estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí obedecendo a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado com o número CAAE 65345917.9.0000.5214. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, prévio ao estudo.

4. RESULTADOS

O estudo incluiu 47 mulheres, porém devido às perdas de amostras e atendendo aos critérios de exclusão, a análise envolveu 40 pacientes, das quais foram analisadas 40 amostras de miomas e 40 de miométrio não neoplásico. A média de idade foi de 40,7 anos variando de 30 a 45 anos. Quanto à paridade, 35 pacientes tiveram filhos e 5 não tiveram nenhuma gestação. Em relação a etnia, 27 pacientes eram afro-brasileiras e 13 eram brancas. A média do IMC foi 26,26 variando de 21,3 a 32,9, de modo que 17 (42,5%) pacientes estavam com o peso adequado (19 a 24,9), 17(42,5%) com sobrepeso (25 a 29,9) e 6 (15%) encontravam-se obesas. A média de tamanho dos miomas foi de 7,61cm variando de 1,3 a 83,1cm. A média do volume uterino foi de 370,2cm³ variando de 76,8 a 1438,0cm³. (TABELA 1).

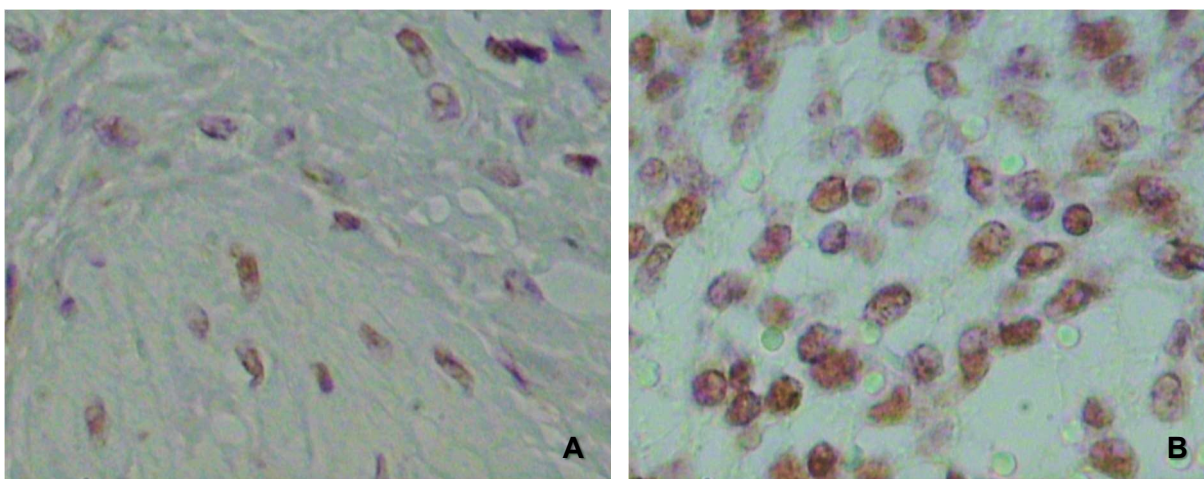
TABELA 1. Características das pacientes

	N	%
Idade		
30 - 39	14	35
40 - 45	26	65
Paridade		
Sim	35	87,5
Não	5	12,5
Etnia		
Branca	13	33
Afro-brasileira	27	67
Índice de massa corpórea		
Eutrófica	17	42,5
Pré-obesa	17	42,5
Obesa	6	15
Tamanho do mioma (cm)		
Menor que 5cm	22	55
De 5cm a 10 cm	15	37
Maior que 10 cm	3	8
Volume uterino (cm³)		
Menor que 160	6	15
De 161 a 500	28	70
Maior que 500	6	15

Fonte: Própria autora

Quanto a expressão do receptor de vitamina D (VDR) no mioma e no miométrio adjacente, haviam células positivas em todas as amostras incluídas (FIGURA 3). A média da expressão do VDR no miométrio foi de 79,52% e em leiomiomas de 60,22% ($P < 0,0001$), como descrito na tabela 2 e representados na FIGURA 4.

FIGURA 3: Expressão do VDR em células do mioma e miométrio não neoplásico.



Células com núcleo corados positivamente para VDR vistas usando um microscópio óptico no mioma uterino (A) e miométrio normal adjacente (B). (Aumento de 400x).

TABELA 2. Porcentagem média de núcleos corados com anti-Vitamina D Receptor no Mioma e miométrio não neoplásico.

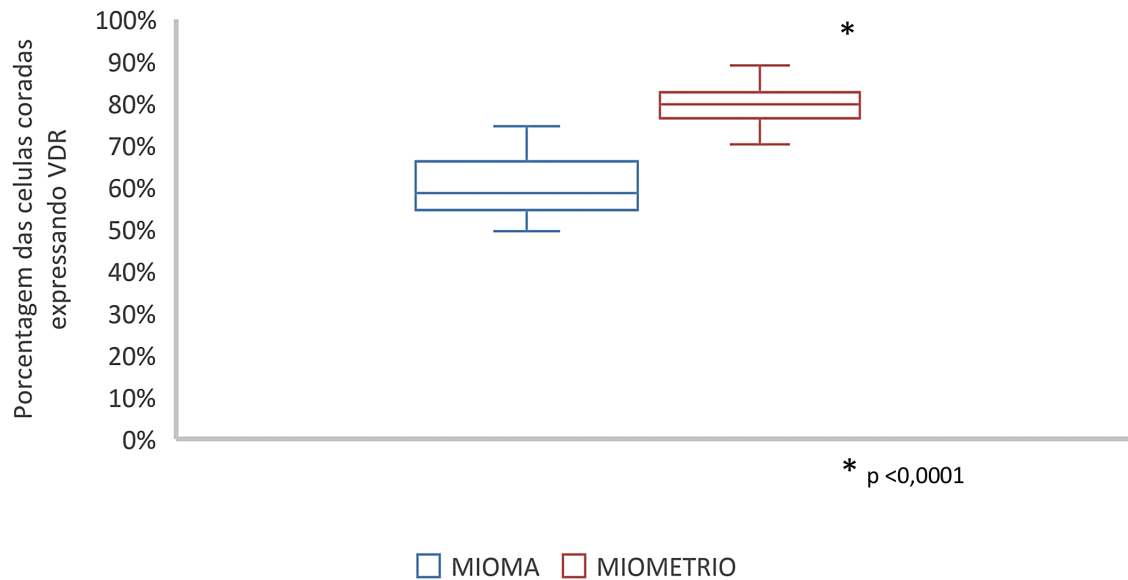
Grupo	N	Média	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor*
Controle (I ¹)	40	79,52	4,32	79,91	70,00	89,00	0,0001
Estudo (II ²)	40	60,22	7,24	58,55	50,00	75,00	

Fonte: Própria autora

1-Miométrio 2- Mioma

*p-valor do teste T para igualdade de médias

FIGURA 4: Boxplots da porcentagem de células coradas expressando VDR no mioma e no Miométrio não neoplásico.



Fonte: Própria autora

Os níveis de expressão da proteína VDR foi analisada por imunistoquímica em miomas e miométrio não neoplásico (N=40). Todas as amostras de mioma apresentaram níveis reduzidos de VDR quando comparado ao miométrio. Os valores normalizados representam a variação dos níveis de expressão de VDR com mediana que foram usados para gerar o gráfico. O teste t de Student foi usado para calcular o nível de significancia ($p < 0,0001$) com nível de confiança (IC) de 95%.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a expressão do biomarcador, Receptor de Vitamina D em miomas uterinos humanos e comparamos essa expressão com a apresentada no miométrio não neoplásico. Analisamos um total de 40 miomas uterinos e seu miométrio e encontramos expressão deste biomarcador em todas as amostras teciduais tanto do mioma quanto do miométrio (FIGURA 3). Foi possível observar que em todas as pacientes o nível de expressão do receptor da vitamina D foi inferior no mioma quando comparado ao miométrio adjacente e que o percentual médio de expressão do VDR foi significativamente diferente entre mioma e miométrio estudados ($p < 0,0001$), como mostra a FIGURA 4.

O mioma uterino é um tumor mesenquimatoso, benigno e monoclonal, com origem nas células musculares lisas do miométrio. Sua verdadeira incidência é desconhecida dado que muitas mulheres são assintomáticas. Estima-se, no entanto, que a sua incidência varie entre 5 e 80% dependendo da idade e da raça, com uma prevalência de 20-40% nas mulheres em idade reprodutiva e de 70- 80% aos 50 anos. (FLAKE; ANDERSEN; DIXON, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Um grande estudo transversal foi realizado envolvendo 21.746 mulheres entre 15 e 49 anos de sete países – Brasil, Canadá, França, Alemanha, Itália, Coreia do Sul, Reino Unido- e entre 18 e 49 anos dos Estados Unidos. Os autores encontraram prevalência de 7% de mioma relatado pelas mulheres brasileiras (ZIMMERMANN, 2012). Segundo a literatura a incidência dos miomas é 2 a 3 vezes superior na raça negra, sendo mais vezes sintomáticos, maiores e múltiplos (WALLACH; VLAHOS, 2004). No presente estudo, todas as mulheres avaliadas encontravam-se em idade reprodutiva, portanto com taxas hormonais em alta e 67% eram afrodescendentes, apresentando assim, características favoráveis a etiologia dos tumores uterinos como mostram as pesquisas.

Na etiologia dos miomas, além dos fatores genéticos, de crescimento e hormonais envolvidos, outros fatores também estão sendo considerados favoráveis como idade, história familiar, obesidade, hipertensão arterial, nuliparidade e alimentação (carnes vermelhas, álcool, cafeína (DONNEZ; DOLMANS, 2016; NAIR; AL-HENDY, 2011). A obesidade está associada ao aumento da secreção de adipocinas que influenciam significativamente o crescimento e a proliferação de estroma tumoral e células malignas. As adipocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), são produzidas no tecido adiposo e a produção aumentada e sustentada de citocinas está associada alterações no crescimento e diferenciação celular (NAIR,

2011). Nossos resultados mostram que 57,5% encontravam-se acima do peso e que cinco delas eram nulíparas.

A identificação da expressão do receptor de vitamina D na maioria das células e o reconhecimento que algumas células apresentam capacidade para produzir formas ativas da vitamina D têm mostrado evidências da influência desta vitamina na patogenia de fibromas uterinos (PAFFONI, 2013; HALDER; GOODWIN; AL-HENDY, 2010)

Al Handy et al. (2015) pesquisaram o papel da 1,25 (OH) 2D3 na expressão de receptores de esteroides sexuais em células de leiomiomas uterinos humanos e perceberam que a desregulação dos hormônios esteroides e seus receptores é pensado como um fator primordial para o crescimento do mioma uterinos, uma vez que ele tem ação de inibir o VDR, enquanto que 1,25 (OH) 2D3 atua como um agente antiestrogênico nessas células. Neste estudo as células de leiomiomas foram tratadas com 1,25 (OH) 2D3 e analisadas quanto à expressão e localização dos receptores e observou-se que o tratamento com 1,25 (OH) 2D3 diminuiu significativamente os níveis de receptores estrogênicos ($p < 0,05$). Em contraste, a 1,25 (OH) 2D3 induziu seu próprio VDR. Sugerindo que a 1,25 (OH) 2D3 funciona como um antagonista dos receptores de hormônios, com funções antiestrogênica e antiprogesterônica.

Essa influência antiestrogênica da vitamina D foi estudada também por Halder et al. (2011), quando examinaram, in vitro, o efeito da 1,25-dihidroxitamina D3 na expressão de proteína relacionada à fibrose em células de leiomioma uterino humano induzida por TGF-3. As células do mioma foram tratadas com TGF-3 com ou sem vitamina D e identificou-se que o TGF-3 induziu fibronectina e expressão de proteína de colágeno tipo 1 em células de mioma e esse efeito foi suprimido pela vitamina D, sendo esta considerada um fator antifibrótico na terapêutica miomas uterinos benignos.

Paffoni et al. (2013), estudaram os níveis séricos de vitamina D em mulheres com mioma e revelaram que a concentração de vitamina D foi significativamente mais baixa em mulheres com mioma quando comparada com o grupo controle (18,0ng/ml e 11,1ng/ml respectivamente, $p < 0,010$, OR= 2,2). Resultados semelhantes foram encontrados por Baird et al. (2013), que avaliaram vitamina D e o risco de miomas uterinos, onde encontram que mulheres com vitamina D suficiente tiveram uma estimativa de 32% de redução de miomas em comparação com aqueles

com insuficiência de vitamina D (OR = 0,68).

Em um outro estudo realizado por Sabry et al. (2013) foi investigado se os baixos níveis séricos de vitamina D estão correlacionados com o aumento do risco e a ocorrência de miomas uterinos e encontraram que níveis séricos reduzidos de 25-(OH) vitamina D foram significativamente associados com a ocorrência de miomas ($p < 0,01$). Também foi observada uma correlação inversa estatisticamente significativa entre os níveis séricos de 25-(OH) vitamina D e o volume total do mioma ($p < 0,002$) dentro da coorte de casos.

A vitamina D é um hormônio esteroide que tem um papel bem documentado na homeostase do cálcio e mineralização óssea. Evidência coletiva de estudos pré-clínicos e epidemiológicos indica que o status da vitamina D também está inversamente associado ao risco de vários cânceres e mortalidade por câncer (GIOVANNUCCI, 2005; PILZ et al., 2009). Ela atua através de vias genômicas e não genômicas inibindo a proliferação celular, ativam vias apoptóticas, inibem a angiogênese e exercem efeitos pró-diferenciação em uma grande variedade de cânceres. A via genômica é mediada pelo VDR, um membro da superfamília de receptor de hormônios esteroide presente em vários tecidos (DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007). O VDR é expresso por tipos de células normais e neoplásicas e é localizado principalmente no núcleo (BEER; MYRTHUE, 2004).

Os efeitos anticancerígenos da vitamina D são mediados principalmente pelo seu metabolito ativo (calcitriol), através da sinalização do receptor da vitamina D (MALINI et al., 2011). Outros estudos epidemiológicos mostram uma associação entre o baixo nível circulante de 25 (OH) D, um biomarcador de exposição à vitamina D e aumento do risco de ampla variedade de câncer, incluindo câncer de colón, reto, da mama, da próstata e câncer de pulmão (BERTONE-JOHNSON, 2005; AHONEN, 2000)

Malini et al. (2011) analisaram a associação entre a expressão nuclear de receptor de Vitamina D com à sobrevivência melhorada no câncer de pulmão, usando análise imunohistoquímica. Avaliaram a expressão do VDR, separadamente no núcleo e no citoplasma, em amostras de câncer de pulmão em pacientes com carcinoma de células não-tumorais sem terapia prévia e investigou a associação entre a expressão do VDR e a sobrevida global. A expressão de VDR nuclear alta foi associada com melhor sistema operacional após ajuste para idade, gênero, estadiamento, tabagismo e histologia (RO= 0,36). Os resultados sugerem que o

status de VDR nuclear pode ser um marcador de prognóstico em câncer de pulmão.

Em um estudo realizado por Halder et al. (2013) corroboram nossos resultados, eles avaliaram o risco associado dos níveis reduzidos de proteína VDR com tumores uterino benignos e determinaram a função biológica do 1,25 (OH) 2D3 na regulação de proteínas associadas à matriz extracelular, que são fundamentais na formação do fibroma e identificaram que mais de 60% dos tumores uterinos analisados mostraram redução níveis de VDR em comparação com o miométrio adjacente, neste estudo os níveis reduzidos de VDR nos miomas uterinos foram estatisticamente significativos ($p < 0,0002$) em comparação com os níveis no miométrio adjacente, resultados semelhante ao nosso.

Esses estudos apontam que a perda de funções da vitamina D, devido à redução dos níveis de vitamina D3 e/ou expressão reduzida do VDR, podem estar associado com o crescimento e desenvolvimento de diversos tipos de câncer. E nossos resultados reforçam a hipótese de que a baixa expressão do VDR pode sim estar associado com o crescimento e desenvolvimento dos miomas, apresentando – se com um importante biomarcador nessa patologia. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a real importância da expressão do receptor da vitamina D na etiopatogenia dos leiomiomas uterinos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, observamos expressão reduzida de receptor de vitamina D em miomas uterinos humanos em comparação com o miométrio não neoplásico, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS

AHONEN, M.H. et al. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). **Cancer Causes Control**. v.11, p.847– 852. 2000.

AI-HENDY, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulates Expression of Sex Steroid Receptors in Human Uterine Fibroid Cells. **J Clin Endocrinol Metab**. v.100, n. 4, p.E572–E582, April 2015.

AMÃLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**. v.51, n.2, p.215-28, 2010.

BAIRD, D.D. et al. Vitamin d and the risk of uterine fibroids. **Epidemiology**. v.24, n. 17, p.447–53, 2013.

BAKER, A. R. et al. Cloning and expression of fulllengthc DNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 85, n. 10, p. 32943298,1988.

BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAUJO, R. P. C. D. Vitamin D: A Molecular Approach. *Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clinica Integrada*. v.7, n. 3, p.309-315, 2007.

BEER, T.M.; MYRTHUE, A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol Cancer Ther*. v.3, p.373–81, 2004.

BELLAN, M.; PIRISI, M.; SAINAGHI, P. P. Osteoporose na artrite reumatoide: papel do sistema vitamina D/hormônio paratireóideo. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 256-263, June 2015.

BERTONE-JOHNSON, E.R. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.14, p.1991–7, 2005.

BEYSEL, S. et al. VDR gene FokI polymorphism as a poor prognostic fator for papillary thyroid cancer. **Tumour Biol**. v. 40, n.11, nov, 2018.

BOCLIN, K. L. S.; FAERSTEIN, E. Prevalência de diagnóstico médico auto relatado de miomas uterinos em população brasileira: Padrões demográficos e socioeconômicos no Estudo Pró-Saúde. **Rev. Bras. Epidemiol**. v.16, n.2, p.301-13, 2013.

BORGFELDT, C.; ANDOLF, E. Transvaginal ultrasonographic findings in the uterus and the endometrium: low prevalence of leiomyoma in a random sample of women age 25-40 years. **Acta Obstet Gynecol Scand**. v.79, n.3, p.202-7, 2000.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and cancer. *J steroid Biochem mol Biol*. v.102, n.1-5, p.156-62, 2006.

BOZZINI, N. Leiomioma uterino; Manual de Orientação- FEBRASGO. São Paulo. Ponto, 2004.

BRAKTA, S. et al.; role of vitamin D in uterine fibroid biology. *Fertility and sterility*. v. 104 n. 3, September, 2015.

BONETI, R. S.; FAGUNDES, R. B. Vitamina D e câncer. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 1, p. 71-77, 2013.

CASTRO, L. C. G.. The vitamin D endocrine system. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

CHAKRABORTY, A. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism(s) and breast cancer risk in north Indians. *Cancer Detect Prev*. v.32, n. (5-6), p.386-94, 2009.

CHIA, C.Y.; KUMARI, U.; CASEY, P.J. Breast cancer cell invasion mediated by Gα12 signaling involves expression of interleukins-6 and -8, and matrix metalloproteinase-2. *J Mol Signal*. 2014

CORLETA, H. V. E. et al. Tratamento atual dos miomas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 6, p. 324-328 June 2007.

COSTA, S. S. et al. Anexina A1 e metaloproteínas de matriz em neoplasias uterinas. **CuidArte enfermagem**.v.10, n. 2. P. 96-101, Jul.-Dez, 2016.

CUNHA, M. T.; RM na Caracterização dos Leiomiomas Uterinos -*Acta Radiológica Portuguesa*, v. 23, n. 69, p. 119-123, Jan.-Mar, 2006.

CUPPARI, L.; LOPES, M.G.G.; UNGER, M.D. Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da deficiência de vitamina D. *Diagnósticos da fome oculta*. 2009; v.26, n.2, p.85-95, 2009.

DEEB, K.K. TRUMP, D.L. JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**. v.7, p.684–700, 2007.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Uterine fibroid management: from the present to the future. **Human Reproduction Update**. p.1-22, July, 2016.

DUSSO, A.S.; BROWN, A.J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. v.289, n.1, p. F8–F28, 2005.

FARIA, J.; GODINHO, C.; RODRIGUES, M. Miomas uterinos – revisão da literatura. *Acta Obstet. Ginecol. Port*. v. 2, n.3, p.131-142, 2008.

FENG, L. et al. Vitamin D receptor (VDR) is over- expressed in the center of uterine

fibroids. *Fertil Steril*. v.94, n.4, p. S75, 2010.

FLAKE, G.P.; ANDERSEN, J.; DIXON, D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. ***Environ Health Perspect***. V. 111, n.8, p. 1037-54, 2003.

GANTE, C. B. Hysterectomies in Portugal (2000-2014). What has changed? In: Consenso Nacional sobre Miomas Uterinos. Capítulo 1. Clínica e diagnóstico. *EJOG & RB* v.208, p. 8-17, 2017.

GIGANTI, M.G. et al. Physical exercise modulates the level of serum MMP-2 and MMP-9 in patients with breast cancer. *OncolLett*. v.12, n.3, p.2119– 2126, 2016.

GIOVANNUCCI, E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control*. v.16, p.83–95, 2005.

GRONEMEYER, H. et al. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. ***Nat. Rev. Drug. Discov***. v. 3, n. 11, p. 95064, 2004.

HALDER, S.K.; GOODWIN, J. S.; AI-HENDY, A. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 reduces TGF- beta3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. v.96, n.4, p. E754–E762, 2011.

HALDER, S.K.; GOODWIN, J. S.; AI-HENDY, A. Vitamin D exhibits antiestrogenic effects in human uterine leiomyoma cells. *Fertil Steril*. v.94, n.4, p. S219–S220, 2010.

HALDER, S. K.; OSTEEN, K. G.; AI-HENDY, A. 1, 25-Dihydroxyvitamin d3 reduces extracellular matrix-associated protein expression in human uterine fibroid cells. ***Biology of reproduction***, v. 89, n. 6, p. 150, 2013.

HATO CASTRO, M. T. Relevancia de la vitamina D3 en la reproducción. U.O, 2016 10 de julho, 82 f. Tese de mestrado, Universidade de Oviedo, Espanha, 2016.

ERNANDEZ, V. M. V. E. et al, Leiomiomatosis uterina. Aspectos epidemiológicos, fisiopatogénicos, reproductivos, clínicos y terapéuticos ***Rev Hosp Jua Mex***. v.80, n.3, p. 173-182, 2013.

ISSA, L. L. et al. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. ***Inflamm. Res***. v. 47, n. 12, p. 45175,1998.

JIANG, F. Molecular Mechanism of Vitamin D Action and its Implications in Ovarian Cancer Prevention and Therapy. Dissertation (Doctor of Philosophy) – University of South Florida, Florida, May, 2004.

KISILEVZKI, N. H.; MARTINS, M. S. Embolização uterina para tratamento do mioma sintomático. ***Radiol. Bras***. v. 36, n. 3, p.129-140, 2003.

KOCHUPILLAI, N. The physiology of vitamin D: Current concepts. *Indian J. Med. Res.*, v. 127, p. 256-262, 2008.

KUTNER, M. et al. *Applied Linear Statistical Models*, 2004.

MALINI, S. et al. Nuclear Vitamin D Receptor Expression is Associated with Improved Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* v.123, n.(1-2), p. 30–36, January, 2011.

MARTIN, M.D.; MATRISIAN, L.M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. **Cancer Metastasis Rev.** v.26, n.(3-4), p. 717-24, 2007.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Embolização de artéria uterina em pacientes que visam a preservação do útero. Belo Horizonte Julho/ 2012

NAGPAL, S. et al. VDR Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands *Endocrine Reviews*, v. 26, n. 5, p. 662–687, 2005.

NAIR, S.; AI-HENDY, A. Adipocytes enhance the proliferation of human leiomyoma cells via TNF- α proinflammatory cytokine. **Reproductive Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1186-1192, 2011.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Exp Biol Med** (Maywood). v. 235, n. 9, p.1034–1045, 2010.

PAFFONI, A. et al. Vitamin D status in women with uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab.* V. 98, p. E1374–8, 2013.

PARKER, W.H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas - Fertility and sterility, 2007.

PILZ, S. et al. Epidemiology of vitamin D insufficiency and cancer mortality. **Anticancer Res** v. 29, p.3699–3704, 2009.

PRITTS, E. A.; PARKER, W.H.; OLIVE, D.L. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril.* v.91, n.4, p.1215-23, Apr, 2009.

RACZ, A.; BARSONY, J. Hormoneindependent translocation of vitamin d receptors is linked to transactivation. *J. Bio. Chem.*, v. 274, n. 27, p. 19352–19360, 1999.

ROBINSONRECHAVI. et al. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell.*

SABRY, M.; AI-HENDY, A. “Innovative oral treatments of uterine leiomyoma.” *Obstetrics and gynecology international* vol. 2012 , 2012.

SABRY, M. et al. Serum vitamin D3 level inversely correlates with uterine fibroid volume in different ethnic groups: a cross-sectional observational study. *Int J Womens Health*. v.5, p. 93– 100, 2013.

SHIL, M. E. (Coord.). *Nutrição Moderna: na saúde e na doença*. 10. Ed. Barueri: Manole, 2009.

SILVA, A. L. B. et al. Miomas e infertilidade: bases fisiopatológicas e implicações terapêuticas. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, Recife, v.5, n.1, p. 13-18, jan. / mar., 2005

STOELTZING, O. et al., Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. **Cancer Res**. v.63, p.3370–3377, 2003.

TOCCHINI-VALENTINI, G. et al. Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20epi ligands. *PNAS*, v. 98, n. 10, p. 5491–5496, 2001.

WALLAC, E. E.; VLAHOS, N. F. Uterine myomas: an overview of development, clinical features and management. **Obstet Gynecol**. v.104, n.2, p. 393 – 406, 2004.

WALLACH, E. E.; VLAHOS, N. F. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. **Obstet Gynecol**. v.105, p.217, 2005.

ZHANG, X.; NICOSIA, S.V.; BAI, W. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*. v.6, n.3, p. 229–244, 2006.

ZIMMERMANN, A. et al. Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women. *BMC Womens Health*. V.12, n.6, 2012.

APENDICES

APÊNDICE A- Instrumentos de coleta de dados.**(FICHA DE IDENTIFICAÇÃO)**
N ° PRONTUÁRIO**IDENTIFICAÇÃO**

Data de nascimento: _____ Idade: _____ Profissão: _____

HISTÓRIA CLÍNICA**1. Número de gestação:** 0 () 1 () 2 () 3 ou + ()**2. Tamanho dos miomas (US)**
_____**3. Volume uterino (US)**
_____**4. Intensidade da sintomatologia (Anamnese) Sangramento:** leve ()moderado () severo () **Dor:** leve () moderada () severa ()**Hemoglobina (g%) :** < 7 (); 7 a 9 (); > 9 ()**5. Doenças Associadas:** Sim () Não ()() Doença Renal () Doenças Hepáticas () Doenças Cardiovasculares () Hipertensão Arterial Sistêmica () Obesidade () outras:
_____**6. Uso de Medicamentos:** Sim () Não ()

Quais? _____

7. Uso de Suplementos Nutricionais: Sim () Não ()

Quais? _____

8. Etnia: Branco () Não branco ()**9. Peso atual:** __ **Altura:** _____ **IMC:** _____**10. Renda familiar, R\$** _____

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de biomarcadores no leiomioma uterino e no miométrio normal

Pesquisador: Pedro Vitor Lopes Costa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 65345917.9.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.061.409

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, controlado e analítico que contará com a participação de mulheres portadoras de leiomiomatose uterina sintomática que se submeterão ao procedimento cirúrgico de histerectomia abdominal na Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas, TeresinaPI, no período de Abril de 2017 a Dezembro de 2017. Serão coletadas amostras teciduais com cerca de um centímetro de diâmetro de leiomioma uterino e de tecido miometrial, este em região uterina livre de miomas e distando no mínimo Os miomas uterinos, também conhecidos por leiomiomas ou fibromas uterinos, são os tumores pélvicos sólidos benignos mais frequentes nas mulheres em idade reprodutiva. São frequentemente detectados entre 30 e 40 anos de idade, sendo relativamente raros em mulheres jovens e na pós-menopausa.

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

Título do Projeto: Avaliar a expressão do receptor de biomarcadores no leiomioma uterino e no miométrio normal adjacente, que será defendido como tese no programa de pós-graduação em Ciências e Saúde.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa
Telefone para contato: (86) 3221-3040 Ramal: 233

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, nesta pesquisa. Este documento lhe dará informações sobre o projeto. Esta pesquisa está sendo conduzida pela professor Dr. **Pedro Vitor Lopes Costa** do Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde/UFPI, e pela pesquisadora participante: Maria Simone Oliveira Lima. Após os esclarecimentos, se consentir participar do estudo, assine ao final deste documento. Em caso de recusa você não será penalizado (a), podendo ainda desistir a qualquer momento em que desejar.

O estudo pretende avaliar a expressão do receptor de biomarcadores no leiomioma uterino e no miométrio normal adjacente. A coleta de dados será feita no setor de ginecologia do Hospital Getúlio Vargas em Teresina, Piauí, serão coletadas informações de prontuários, bem como amostras teciduais do tecido miometrial para análise em laboratório.

O estudo de biomarcadores no leiomioma e no tecido miometrial normal poderá permitir um melhor entendimento da etiopatogenia e fisiopatologia da leiomiomatose uterina, podendo ser útil no acompanhamento do tratamento dessa patologia, bem como, na elaboração de estratégias terapêuticas para o tratamento desses tumores. Serão colhidas informações sobre a história clínica da paciente através do prontuário, bem como será retirada uma amostra do mioma e do miométrio durante o procedimento.

Os riscos da pesquisa são mínimos, visto que as amostras para a pesquisa serão extraídas durante o procedimento cirúrgico de histerectomia abdominal por indicação médica. Poderá ocorrer hemorragia, bem como infecção do trato urinário,

riscos que poderão ser contornados pela equipe assistencial que a acompanhará no pós-operatório, através de medicação apropriada e reposição sanguínea conforme indicação médica.

Esta pesquisa é isenta de custo para a participante, bem como também não implicará em nenhuma remuneração. Se a senhora concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo, à pesquisa interessam os dados obtidos, sem identificação individual, preservando a privacidade. A participação será voluntária e você pode ficar, à vontade, para pedir outros esclarecimentos ao comitê de Ética em Pesquisa para tirar qualquer dúvida no endereço citado abaixo. A senhora deverá assinar este documento em duas (02) vias, sendo uma para o participante e a outro devendo ficar com pesquisador.

Endereço CEP

Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI. Campus Universitário Ministro Petrônio
Portella - Bairro Ininga.
Pró Reitoria de Pesquisa - PROPESQ. CEP: 64.049-550 - Teresina - PI.

Telefone: 86 3237-2332

E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br

Assinatura do responsável

Pesquisador (a) responsável

Teresina (PI), ____ / ____ / ____

ANEXO C- Comprovante de aceite do Artigo Científico de Revisão, na Revista da associação Médica Brasileira (RAMB).

—— Mensagem original ——

Assunto:Revista da Associação Médica Brasileira - Decision on Manuscript ID
RAMB-2017-0389.R1

Data:03/12/2017 17:28

De:Carlos Serrano Jr <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Para:pvlcosta@ig.com.br

Responder para:editor@amb.org.br

03-Dec-2017

Dear Dr. Lopes-Costa:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EFEITOS DA VITAMINA D NO LEIOMIOMA UTERINO" in its current form for publication in the Revista da Associação Médica Brasileira. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista da Associação Médica Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Carlos Serrano Jr

Editor-in-Chief, Revista da Associação Médica Brasileira

editor@amb.org.br