



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

ÉMERSON DAVI DO NASCIMENTO BRAZIL

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR IGF-I NO LEIOMIOMA UTERINO E NO
MIOMÉTRIO ADJACENTE**

TERESINA

2019

ÉMERSON DAVI DO NASCIMENTO BRAZIL

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR IGF-I NO LEIOMIOMA UTERINO E NO MIOMÉTRIO
ADJACENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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 Vítor Lopes Costa

Coorientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processos Técnicos

B827e Brazil, Émerson Davi do Nascimento.
Expressão do receptor IGF-I no leiomioma uterino e no
miométrio adjacente / Émerson Davi do Nascimento Brazil. -- 2019.
70 f. : il.

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

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

“Coorientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.”

1. Útero - Doenças. 2. Mioma uterino. 3. Miométrio. 4. Receptor
IGF-I. 5. Imunoistoquímica. I. Costa, Pedro Vítor Lopes. II. Silva,
Benedito Borges da. III. Título.

CDD 618.14

ÉMERSON DAVI DO NASCIMENTO BRAZIL

EXPRESSÃO DO RECEPTOR IGF-I NO LEIOMIOMA UTERINO E NO MIOMÉTRIO ADJACENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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: 16 de dezembro de 2019.

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa
(UFPI - Orientador)

1º Examinador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva
(UFPI - Membro Interno)

2º Examinador: Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos
(UESPI - Membro Externo)

Prof.^a Dr.^a Ione Maria Ribeiro Soares Lopes
(UFPI - Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus** e aos amigos do plano espiritual por estarem presentes nessa jornada do início ao fim, sempre me guiando e emanando força e vibrações positivas para que eu conseguisse superar todos os obstáculos.

À minha família, em especial aos meus pais **Benedito Emanuel da Silva Brazil** e **Maria de Fátima do Nascimento Brazil** e ao meu irmão **Douglas Natanael do Nascimento Brazil** pelo apoio e amor incondicionais.

Dedico também aos meus avós paternos **Benedito da Silva Brasil** (*in memoriam*) e **Antônia Batista França Brasil** (*in memoriam*) e maternos, **Martinho Otaviano do Nascimento** (*in memoriam*) e **Maria Francisca do Nascimento** (*in memoriam*). Obrigado por sempre mostrarem a importância e o poder transformador dos estudos, e por serem grandes incentivadores na busca pelo conhecimento. Somos profundamente gratos pela educação, amor, carinho e dedicação que dispuseram todos esses anos à nossa família. Vocês são e serão sempre carinhosamente lembrados como nossos modelos a serem seguidos.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

First of all, I would like to thank **Dr. Lauren (Warren) Foster** for all the support that was given to me in Canada. You were one of the most important persons in this journey and I would never have accomplished what I have today without your help. Thank you for sharing your knowledge and your passion about science.

I also would like to thank **Dr. Jocelyn Wessels** for offering to help out with this project. I really appreciate your willingness to assist.

I would like to thank **McMaster University, Global Affairs Canada International Scholarships Program** and **Emerging Leaders in the Americas Program** for the amazing opportunity of doing research in Canada.

Furthermore, I also would like to thank **Antonella Masciantonio** (McMaster), **Flavielle Morais** and the **Canadian Bureau for International Education** for all the support regarding the management of my scholarship.

Additionally, I would like to thank my bro **Suraj Mukesh Parwani**. You have helped me in so many ways you cannot even imagine. I'll be forever grateful. Thank you for your friendship.

A special thank you for my lab crew **Anna Leonova, Shay Freger, Victoria Turpin** and **Annia Alejandra**. Doing research has never been so fun! Our adventures will always have a special place in my heart!

I cannot forget about my friend **Tais Araujo**! Thank you for all the support and companionship!

Also, I would like to thank **Tina and Sam Tinebra** for their hospitality. Thank you for being so friendly, accommodating and generous. I can never forget the warm reception that you guys gave me. Thank you for everything!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa**, agradeço pelo acolhimento, apoio e incentivos constantes. Graças à sua dedicação e disposição, conseguimos elevar nossa pesquisa ao nível internacional. Obrigado por ter aberto as portas do grupo de pesquisa do qual faz parte e por ter sido um mestre amigo, conduzindo a orientação deste trabalho com competência e segurança.

Ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, agradeço pela disposição em sempre ajudar e compartilhar sua vasta experiência. Muito obrigado por sua dedicação e paciência e por compartilhar a importância da pesquisa científica não só para o meio acadêmico, mas também para a sociedade.

À **Dra. Lina Gomes dos Santos**, agradeço por toda ajuda e disposição. Obrigado por me receber de portas abertas e também por todas as palavras de incentivo que me foram dadas.

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

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitora da Universidade Federal do Piauí** pelo incentivo e apoio que vêm proporcionando à pesquisa e pós-graduação na UFPI.

A **Diretora do Centro de Ciências e Saúde** pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições sem as quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

À **Edilene Oliveira Soares** por todo seu empenho, ajuda e amizade, sempre prontamente nos assistindo na coordenação do programa.

Meus agradecimentos ao **Hospital Getúlio Vargas** e seus colaboradores, em especial **Eugênia Rebêlo, Joed Lillian e Dra. Jerúsia Ibiapina**.

Aos colegas do grupo de pesquisa, dentre eles **Simone Oliveira, Eduardo Soares e Walberto Filho**. Obrigado pela amizade, apoio e parceria na execução e desenvolvimento deste trabalho.

Ao **MSc. José Maria Marques**, sem o qual eu jamais teria dado o primeiro passo dessa jornada, muito obrigado pelo incentivo dado do início ao fim.

Agradeço também aos meus amigos do Colégio Certo, **Clariana Costa, Catarina Flores, Elias Júnior, Daniel Santos, Jéssica Fontinele, Yana Leal, Yasmim Macário, Thyago Patrício e Emanuele Madeira**. Obrigado pela amizade

incondicional e por dividirem comigo todos os momentos de vitórias, tristezas e alegrias! “Papai valeu a pena”!!

Aos meus tios e tias: **Paulo Brasil, Luís Antônio Brasil, Daniel Brasil, Serrate Brasil, Karla Brasil, Paula Brazil, Rachel Brasil, Auxiliadora Brasil e Maria das Dores Nascimento.** E aos meus primos, em especial **Kassia Brasil, Denise Brasil, Tércia Brasil, Laércio Brasil, Gabriel Brasil, Dahiara Brazil, Jeslei Brazil, Liliane Brazil, Lidiane Nascimento, Lindalva Nascimento e Lindinalva Nascimento.** Agradeço imensamente por todo o carinho e amizade!! Obrigado por torcerem sempre por mim! Sem essa base sólida de amor eu jamais teria completado essa jornada!

"Being a scientist is like doing a jigsaw puzzle in a snowstorm at night, with some pieces missing, and with no idea what the finished picture looks like."

(Anonymous)

RESUMO

Introdução: Os miomas uterinos são tumores sólidos benignos que acometem principalmente mulheres em idade reprodutiva, sendo responsável por um grande número de histerectomias realizadas anualmente em todo o mundo. Apesar de amplamente estudados, possuem etiologia ainda desconhecida, a qual vem sendo associada a fatores hormonais, estilo de vida, histórico clínico e fatores de crescimento, como o IGF-I. Estudos têm mostrado uma associação entre a superexpressão dos receptores desse fator de crescimento (IGF-IR) com os miomas uterinos. **Objetivo:** Avaliar a expressão de receptores IGF-I em miomas uterinos e no miométrio adjacente. **Pacientes e métodos:** estudo transversal envolvendo 50 mulheres diagnosticadas com leiomiomatose uterina e que, em razão disto, foram submetidas ao procedimento de histerectomia total em um hospital público de referência na cidade de Teresina- PI. Cortes histológicos de 4 μ m foram usados na técnica de imunohistoquímica utilizando-se anticorpos policlonais para o receptor IGF-I e analisadas através do método “*quickscore*”, que tem como base a avaliação semiquantitativa da intensidade de coloração e da porcentagem de células coradas positivamente nos tecidos. A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de Wilcoxon e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. **Resultados:** O score médio de células coradas no miométrio e no mioma, para receptores IGF-I, foi de $11,36 \pm 5,61$ e $7,60 \pm 4,46$, respectivamente. **Conclusão:** observou-se uma menor expressão do receptor IGF-I no tecido leiomiomatoso em comparação com o tecido miometrial uterino não neoplásico, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Palavras-chave: Mioma Uterino, Miométrio, Receptor IGF-I, Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Uterine fibroids are benign solid tumors that affect mainly women of reproductive age, being responsible for a large number of hysterectomies performed annually worldwide. Although widely studied, their etiology is unknown. However, it has been associated with hormonal factors, lifestyle, clinical history and growth factors, such as IGF-I. Studies have shown an association between overexpression of IGF-I receptors and uterine fibroids. **Objective:** To evaluate the expression of IGF-I receptors in uterine fibroids and adjacent myometrium. **Patients and methods:** Cross-sectional study involving 50 women diagnosed with uterine leiomyomatosis, who underwent total hysterectomy at a public hospital in the city of Teresina, State of Piauí, Brazil. Serial sections of 4 μm were used to perform immunohistochemistry using polyclonal antibodies for IGF-I receptor and analyzed using the “quickscore method”, which is based on the semi-quantitative evaluation of staining intensity and percentage of positively stained cells in tissues. Statistical data analysis was performed using the Wilcoxon test and the significance level was established at $p < 0.05$. **Results:** The mean quickscores for IGF-I receptors in the myometrium and fibroids were 11.36 ± 5.61 and 7.60 ± 4.46 , respectively. **Conclusion:** A lower expression of IGF-I receptor was observed in fibroid tissues, when compared with myometrial samples, and that difference was found to be statistically significant.

Keywords: Uterine Fibroid, Myometrium, IGF-I Receptor, Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema de classificação para miomas uterinos da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia	26
Figura 2. Representação dos aminoácidos homólogos da família IGF	28
Figura 3. Eixo GH-IGF-1 e seu papel desempenhado no organismo	29
Figura 4. Dissociação do complexo ternário IGFBP/IGF-1/ALS	30
Figura 5. Cascata de sinalização do receptor IGF-1	32
Figura 6. Microscópio Nikon eclipse E200 para dois observadores	41
Figura 7. Fotomicrografia de cortes histológicos de miométrio uterino.....	45
Figura 8. Fotomicrografia de cortes histológicos de mioma uterino	46
Figura 9. Boxplot da expressão do receptor IGF-1 no mioma e no miométrio.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas descritivas dos scores obtidos através da análise das amostras de mioma e miométrio	47
--	----

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µm	Micrometro
aFGF	<i>Acid Fibroblast Growth Factor</i>
ALS	<i>Acid-Labile Subunit</i>
APTS	<i>3-Aminopropyltriethoxysilane</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetros
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
g	Gramas
GH	<i>Growth Hormone</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
HB-EGF	<i>Heparina-Binding Growth Factor</i>
IGFBPs	<i>Insulin-like Growth Fator Binding Protein</i>
IGF-I	<i>Insulin-like Growth fator 1</i>
IGF-II	<i>Insulin-like Growth fator 2</i>
IGF-IIR	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor 2</i>
IGF-IR	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor 1</i>
IR	<i>Insulin Receptor</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrates</i>
kD	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
°C	Grau Celsius
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Plated Derived Growth Factor</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
RNA _m	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>

Shc	<i>Src Homology and Collagen</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor Alfa</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UFPI	Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVO	34
3	PACIENTES E MÉTODOS	36
3.1	Tipo de estudo e local de realização	37
3.2	Critérios de inclusão	37
3.3	Critérios de não inclusão.....	37
3.4	Cálculo amostral.....	37
3.5	Métodos.....	38
3.5.1	Coleta de material biológico.....	38
3.5.2	Método histológico.....	38
3.5.3	Método imunistoquímica	39
3.5.4	Método quantitativo	41
3.5.5	Método estatístico	42
3.6	Aspectos legais e éticos.....	42
4	RESULTADOS.....	43
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICES	61
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
	ANEXOS	64
	ANEXO A - Carta convite para o “ <i>Global Affairs Canada International Scholarships Program</i> ”	65
	ANEXO B - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí.	66
	ANEXO C – Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na revista PLOS ONE	70

O útero é um órgão fibromuscular piriforme pertencente ao aparelho reprodutor feminino. Ele possui aproximadamente 7,5 cm de comprimento e 5cm de diâmetro máximo, chegando a pesar entre 30g e 40g. Sua parede é formada por três camadas sobrepostas (perimétrio, miométrio e endométrio) e mede, aproximadamente, 2cm a 2,5 cm de espessura (MARTINI; TIMMONS; TALLITSCH, 2009; OLIVEIRA, 2009;).

O miométrio constitui a camada muscular e é formado por fibras musculares lisas fusiformes dispostas em três planos sobrepostos. Durante o ciclo reprodutivo feminino, gravidez e menopausa ele passa por modificações fisiológicas naturais. No entanto, alterações são observadas em condições patológicas tumorais, como por exemplo, na presença de leiomiossarcomas (neoplasia maligna rara) e leiomiomas (CIARMELA et al., 2011).

Leiomiomas uterinos são tumores sólidos que se originam a partir de células da camada tecidual muscular lisa (miométrio). Além disso, expressam uma grande quantidade de proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina, colágeno e proteoglicanas. Foi descrito inicialmente pelo médico e patologista Matthew Baillie, em 1793. Também denominados de miomas ou fibróides, estes possuem origem monoclonal (a partir de uma célula ancestral única) e são caracterizados como benignos. Além disso, representam a neoplasia que mais comumente afeta mulheres em idade reprodutiva. São a causa de aproximadamente 200.000 histerectomias realizadas anualmente apenas nos Estados Unidos. (BORAHAY et al., 2015; GKIOKA et al., 2015; PENG et al., 2009).

A nível nacional, há uma precariedade em relação ao relato de casos diagnosticados. No Estado de São Paulo, foram registrados cerca de 10,5 mil casos no ano de 2008. Já em 2012, foi reportado um aumento de cerca de 15%, totalizando uma média de 12 mil casos registrados (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2013).

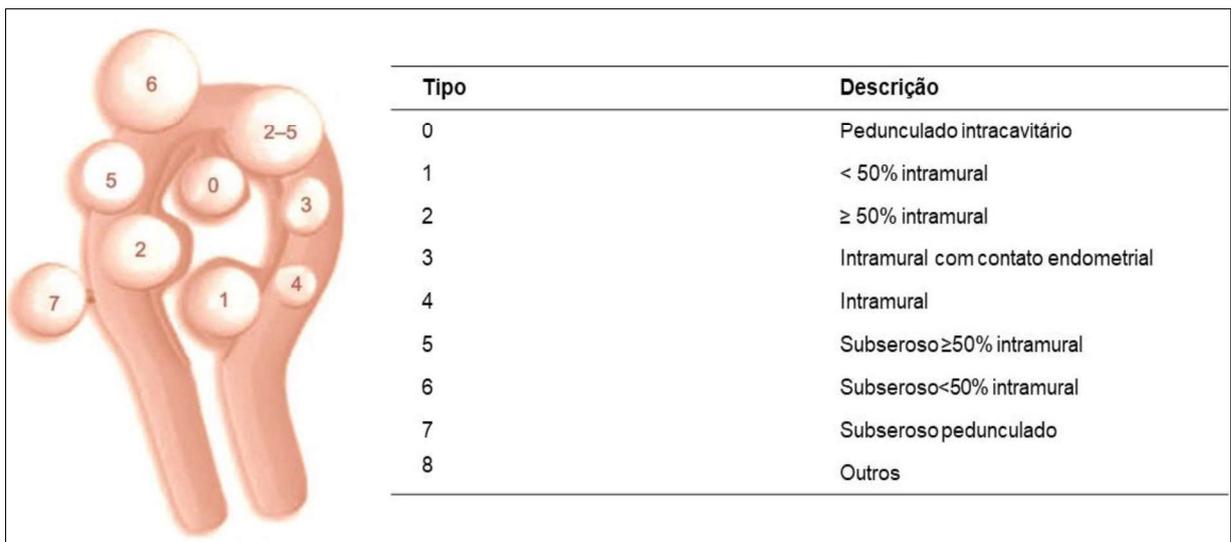
Segundo dados do Hospital Getúlio Vargas (Teresina – PI), entre os anos de 2016 e 2018, uma média de 149 pacientes/ano se submeteram à histerectomia abdominal total por conta do diagnóstico de leiomiomatose uterina (HOSPITAL GETÚLIO VARGAS, 2019).

Os miomas uterinos representam a quinta maior causa de internações ginecológicas não relacionadas à gravidez. Apesar de possuírem uma alta incidência (20% a 40% das mulheres em idade reprodutiva), não são sintomáticos em sua

maioria, onde apenas cerca de 20% destas apresentam alguma sintomatologia, sendo esta influenciada principalmente pelo tamanho, número e localização dos tumores. (FARIA; GODINHO; RODRIGUES, 2008; PENG et al., 2009).

Os leiomiomas podem ser classificados de acordo com sua localização, como pode ser observado na Figura 1. Os submucosos (incidência de 5%) localizam-se logo abaixo do endométrio, ocasionalmente projetando-se na cavidade uterina, podendo deslocar ou distorcer a camada endometrial; os subserosos (incidência de 20%) localizam-se por baixo da membrana serosa uterina e os intramurais (incidência de 75%) estão situados no miométrio. Dentre estes, os tumores submucosos são responsáveis pelo maior grau de sintomatologia (BRASILEIRO; LOPES J.; LOPES, V., 2017; SOCIEDADE PORTUGUESA DE GINECOLOGIA, 2017).

Figura 1 - Sistema de classificação para miomas uterinos da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia.



Fonte: adaptado de Mas et al., 2017.

Nos casos sintomáticos, os miomas estão associados a casos de hemorragia uterina ou prolongamento do ciclo menstrual, o que pode levar a paciente a desenvolver um quadro de anemia ferropênica; além disso, podem provocar fadiga, dor pélvica, aumento do volume abdominal, relações sexuais desconfortáveis e disfunções na bexiga e no intestino. Na função reprodutiva, estão associados à infertilidade, anomalias fetais, abortos espontâneos, partos prematuros e aumento da indicação de cesarianas (BOCLIN; FAERSTEIN, 2013; STEWART et al., 2017).

Embora as causas exatas para a ocorrência e o desenvolvimento de miomas ainda não sejam totalmente esclarecidas, existem certos mecanismos e fatores de risco associados a estes tumores. Vários estudos relatam o papel fundamental dos hormônios esteroides sexuais femininos na etiologia dos miomas, já que sua ocorrência é rara antes da menarca. Além disso, apresentam significativa regressão durante a pós-menopausa bem como durante o tratamento com análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Estudos também demonstraram uma maior concentração de receptores de estrogênio e progesterona nos miomas, se comparada ao miométrio adjacente (FLAKE; ANDERSEN; DIXON, 2003; MANTA et al., 2016; PENG et al., 2009;).

Outros fatores predisponentes associados foram descritos, como por exemplo: idade, menarca precoce, gravidez e paridade (declínio da incidência de acordo com o número de nascidos vivos), obesidade, dieta, falta de exercício físico e etnia (maior incidência em mulheres com descendência africana) (MCWILLIAMS; CHENNATHUKUZZHI, 2017).

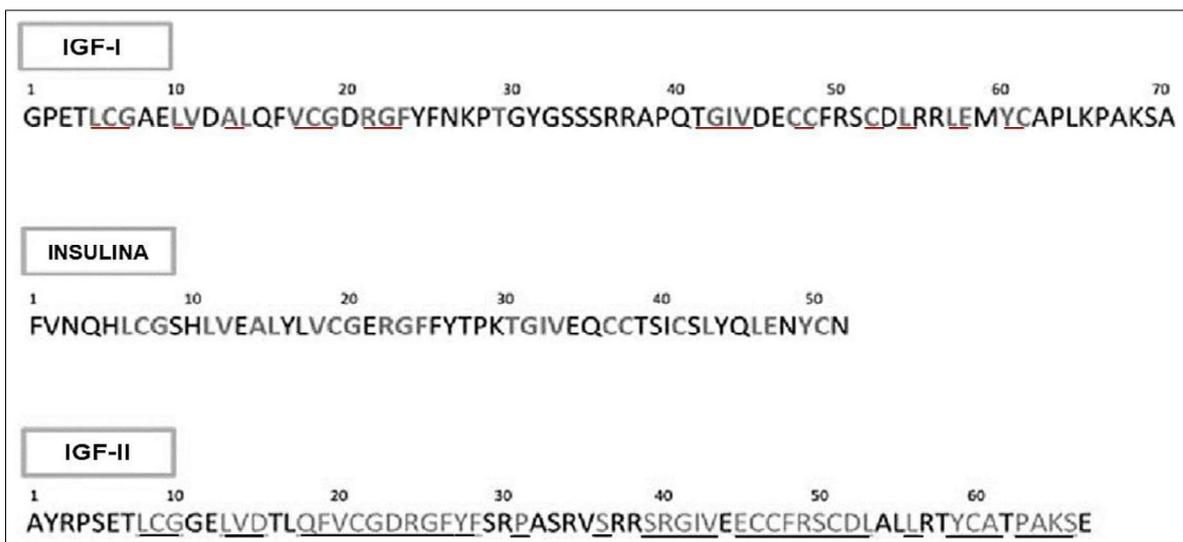
Proteínas, como os fatores de crescimento, também estão associados com a patogênese dos miomas uterinos. Estes são polipeptídeos secretados em espaços extracelulares, por uma variedade de tipos celulares, e que atuam de maneira autócrina e/ou parácrina. Eles desempenham seu papel nas células alvo através da ligação com receptores de membrana, resultando em subsequente ativação e modulação de múltiplos sinais de transdução relacionados a diferentes processos celulares, tais como: angiogênese, proliferação, diferenciação, inflamação, reparo e sobrevivência celular (BORAHAY et al., 2015; CIARMELA et al., 2011; ISLAM et al., 2016).

Vários fatores de crescimento relacionados a esta doença têm sido descritos na literatura, destacando-se: TGF- α (*Transforming Growth Factor Alfa*), TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Plated Derived Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), IGF-I and IGF-II (*Insulin-like Growth Gactor 1 e 2*), aFGF (*Acid Fibroblast Growth Factor*), HB-EGF (*Heparina-Binding Growth Factor*), activina e miostatina. Acredita-se também que, além destes fatores de crescimento, mutações genéticas somáticas também desempenham um papel na patogênese de miomas uterinos (FARIA; GODINHO; RODRIGUES, 2008; ISLAM et al., 2016).

Dentre estes fatores de crescimento, pode-se destacar o IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1). Ele foi descrito originalmente em 1957 por Salmon e Daughaday e caracteriza-se por ser um polipeptídeo de cadeia única, constituído por 70 aminoácidos, e codificado pelo seu respectivo gene localizado no cromossomo 12. O IGF-I circulante no organismo é produzido principalmente pelo fígado, ocorrendo secundariamente em outros órgãos, como rins, ovários, testículos, placenta, pele, pulmões e pâncreas (BONEFELD; MOLLER, 2011; BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; DELAFONTAINE; SONG; LI, 2004).

Além do IGF-I, o IGF-II (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 2) também compõe a família IGF. Juntamente com esses dois ligantes, também fazem parte dessa família seus respectivos receptores de membrana (IGF-IR e IGF-IIR – *Insulin-like Growth Factor Receptor 1 and 2*) receptores 1 e 2 dos fatores de crescimento semelhantes à insulina) e suas 6 proteínas de ligação (IGFBPs – *Insulin-like Growth Factor Binding Protein* – proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina). Ambas as proteínas ligantes possuem semelhança estrutural à da insulina; o IGF-I compartilha 50% de homologia com a pró-insulina e mais de 60% de homologia com o IGF-II (Figura 2) (BLECHER et al., 2017; MARTÍN-ESTAL; DE LA GARZA; CORTÁZAR, 2016).

Figura 2 - Representação dos aminoácidos homólogos da família IGF.

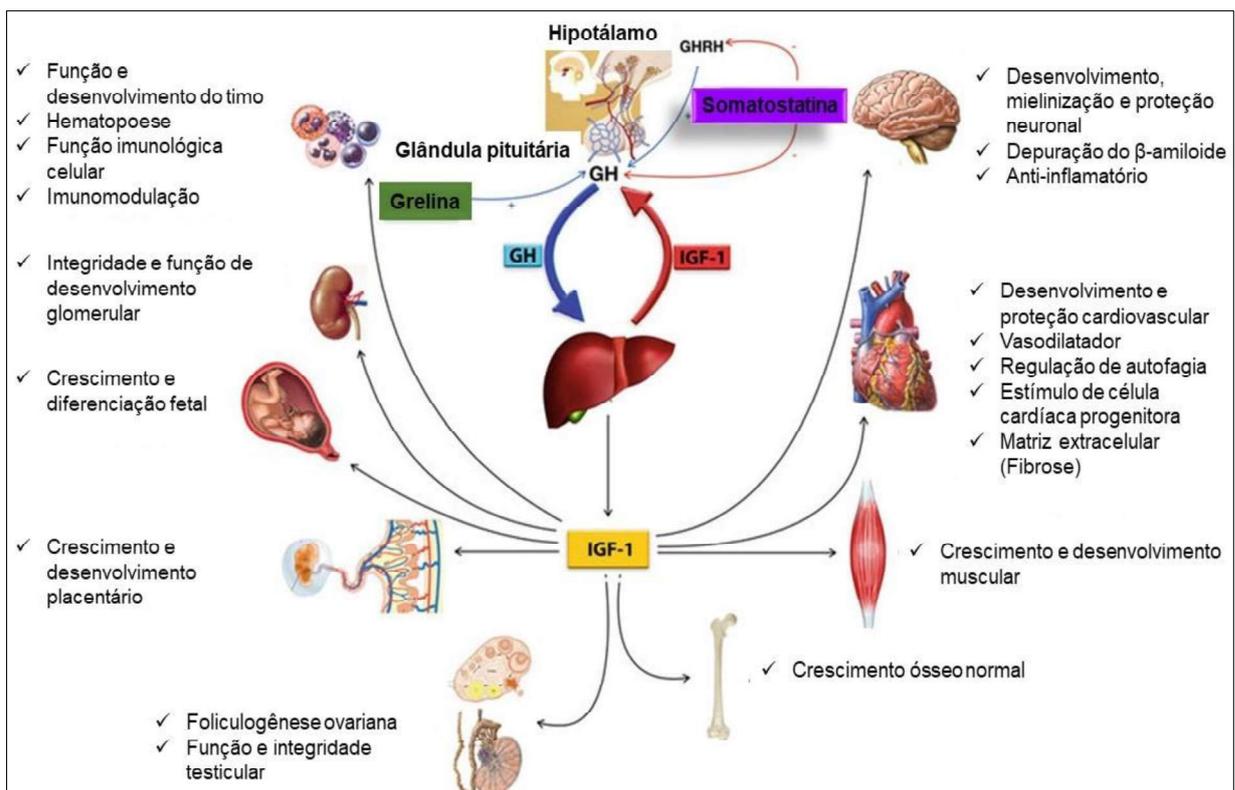


Fonte: adaptado de Martín-estal; de la Garza; Cortázar, 2016.

* Os aminoácidos sublinhados de vermelho representam aqueles pertencentes ao IGF-I e à pró-insulina e insulina. Já os sublinhados de preto representam aqueles homólogos entre IGF-I e IGF-II.

O IGF-I é um fator de crescimento fundamental para a manutenção, crescimento e desenvolvimento do organismo, desempenhando seu papel em múltiplos sistemas biológicos. Sua secreção é estimulada pelo hormônio de crescimento (GH – *Growth Hormone*), sendo o eixo GH-IGF-I definido da seguinte maneira: o hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH – *Growth Hormone-Releasing Hormone*) é produzido pelo hipotálamo que, por sua vez, estimula a glândula pituitária a produzir o hormônio de crescimento. Quando este é produzido e secretado na corrente sanguínea, resulta na produção do IGF-I pelo fígado. Em contrapartida, o IGF-I estimula a secreção de somatostatina pelas células do hipotálamo, estômago, intestino e pâncreas, inibindo a expressão gênica do hormônio de crescimento, resultando em um *feedback* negativo (Figura 3) (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; MARTÍN-ESTAL; DE LA GARZA; CORTÁZAR, 2016).

Figura 3 – Eixo GH-IGF-I e seu papel desempenhado no organismo.



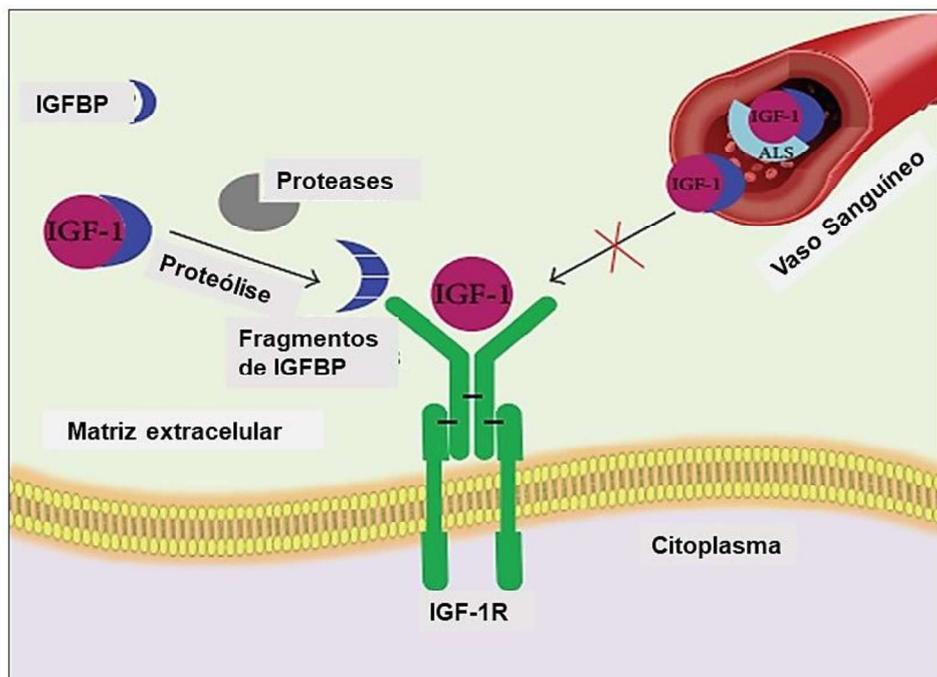
Fonte: adaptado de Aguirre et al., 2018.

Normalmente, o IGF-I circula em altas concentrações plasmáticas (aproximadamente 150-400ng/ml). Entretanto, sua concentração livre corresponde a menos de 1%, sendo sua forma ligada a proteínas sua configuração mais abundante. Devido seu papel desempenhado em uma grande variedade de sistemas fisiológicos,

esse fator de crescimento apresenta um controle restrito, sendo, por sua vez, mediado pelas IGFBPs. Essas proteínas apresentam, em geral, algumas funções comuns: a) transporte de IGF-I circulante e controle do seu fluxo do espaço vascular para o tecido; b) aumento da meia vida do IGF-I e regulação da sua depuração metabólica; c) modulação do IGF-I nos tecidos alvo, inibindo ou ativando suas ações específicas; d) modulação e interação do IGF-I com seu respectivo receptor (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; DE LA GARZA et al., 2017).

Dentre as 6 proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina, a IGFBP-3, que também é produzida pelo fígado, é responsável pela ligação a aproximadamente 90% do IGF-I circulante, resultando na formação de um complexo ternário constituído por uma molécula de IGF-I, uma proteína IGFBP-3 e uma subunidade proteica ácido-lábio (ALS). Este complexo estabelece um reservatório de IGF-I no plasma sanguíneo, estendendo assim a sua meia vida. Como observado na figura abaixo (Figura 4), após a dissociação do complexo ternário, o complexo IGFBP-IGF-I é retirado da circulação, atravessando o endotélio para interagir com os receptores de membrana celular no tecido alvo, na sua forma livre, após a ação de proteases (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; DE LA GARZA et al., 2017; MARTINELLI JUNIOR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Figura 4 - Dissociação do complexo ternário IGFBP/IGF-I/ALS.



Fonte: adaptado de Brahmkhatri; Prasanna; Atreya, 2015.

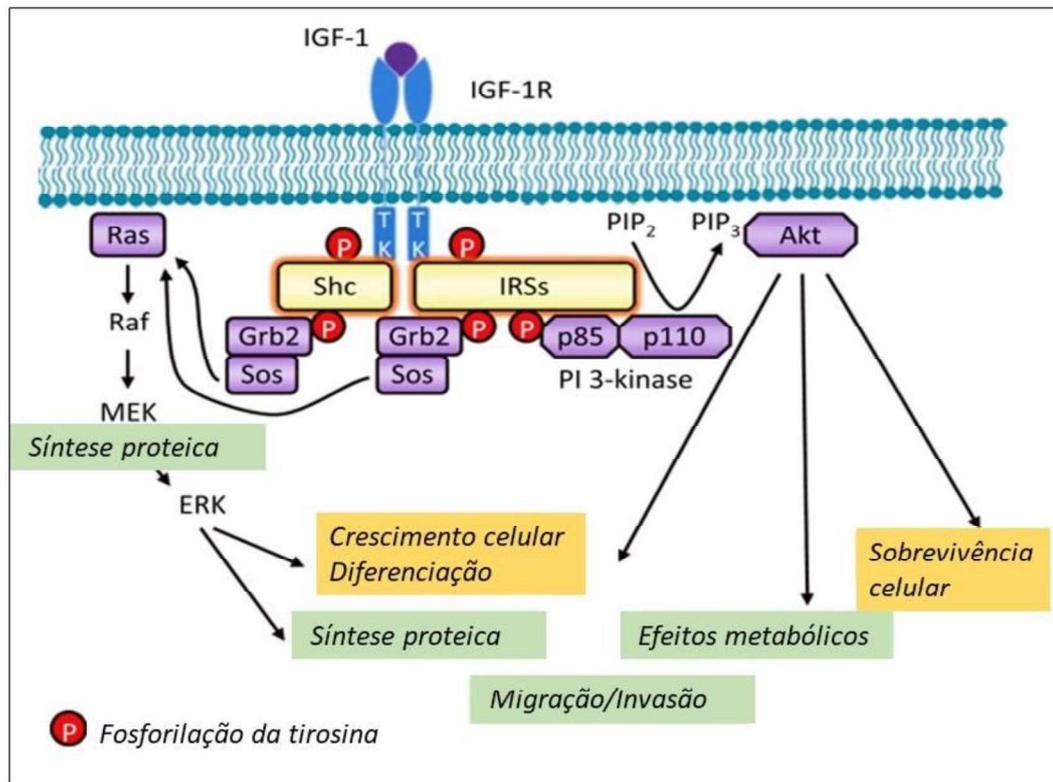
O receptor 1 do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-IR) é um receptor celular de membrana; ele possui conformação tetramérica, composta por duas subunidades α (135kD) e duas subunidades β (90kD). Estruturalmente, através da ligação por uma ponte dissulfídrica, cada subunidade α se liga a uma subunidade β , formando um α - β hemi-receptor. Para a formação de um receptor completo, as unidades α dos hemi-receptores se ligam entre si, também por meio da ligação de uma ponte dissulfídrica (MARTINELLI JUNIOR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Ele apresenta estrutura similar (60% de homologia) ao receptor de insulina (IR), podendo haver ligações cruzadas entre suas proteínas ligantes, porém, com uma menor afinidade, se comparado ao seu ligante apropriado. Além disso, pode haver também a formação de receptores híbridos em tipos celulares que expressam ambos os receptores (hemi-IGF-IR e hemi-IR), onde sua quantidade varia de tecido para tecido. No entanto, nesses casos, o receptor apresenta uma afinidade de ligação maior (de 15 a 50 vezes) ao IGF-I, se comparado à insulina, funcionando principalmente como um IGF-IR (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; MARTINELLI JUNIOR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

As subunidades α constituem o sítio de ligação do IGF-I e estão localizadas na parte externa da membrana celular. Já as subunidades β configuram-se como proteínas transmembranas, apresentando uma parte extracelular, uma transmembrana e outra intracelular. Além disso, as subunidades possuem um sítio acoplador de ATP e apresentam atividade tirosina-quinase intrínseca (porção intracelular) (CHAVES et al., 2004).

Como observado na Figura 5, a ligação do IGF-I com seu receptor promove auto fosforilação e atividade tirosina quinase. Uma vez ativado, esse receptor recruta e fosforila substratos, como o IRS e o Shc, que, por sua vez, leva à ligação de moléculas, tais como Grb2 e PI 3-kinase. Essas ligações induzem uma transdução de sinal através das cascatas de sinalização MAPK e PI3K, resultando na indução de diversos processos celulares (GIRNITA et al., 2014).

Figura 5 - Cascata de sinalização do receptor IGF-I.



Fonte: adaptado de Girnita et al., 2014.

Yu et al. (2008) realizaram um estudo com 17 receptores de fatores de crescimento que apresentam atividade tirosina quinase (RTKs). Nele foi avaliada e comparada a atividade desses receptores em miomas e no miométrio. Os resultados indicaram que os receptores IGF-I apresentaram fosforilação aumentada em miomas, se comparadas às amostras miometriais. Também demonstraram que a supra regulação do IGF-I e/ou do seu receptor pode aumentar o crescimento e/ou sobrevivência dos miomas como consequência dos seus efeitos anti-apoptóticos e mitogênicos. Além disso, indicam que a ativação das cascatas de sinalização desse receptor (Shc, Grb2, MAPK) são importantes para a mediação do crescimento desses tumores.

Burroughs et al. (2002) reportaram que estudos anteriores mostraram que o tecido que constitui os leiomiomas ligam-se mais a IGF-I se comparados ao tecido miometrial normal, o que sugere uma superexpressão de receptores IGF-I, podendo ser algo comum relacionado a origem destes tumores.

Outros estudos também elucidaram o papel fundamental do receptor IGF-I para a etiologia dos miomas uterinos. Gkioka et al. (2015) relataram que esse receptor foi

detectado no miométrio, no epitélio e no estroma uterino, apresentando níveis significativamente mais elevados na membrana celular de miomas, se comparado ao miométrio. A superexpressão destes receptores nas células aumenta o seu potencial tumorigênico e as protege da morte celular programada. Portanto, acredita-se que os receptores IGF-I podem desempenhar o seu papel na origem dos miomas pela superativação da sinalização do IGF-I induzida pela superexpressão do seu receptor, pela grande quantidade da proteína ligante ou pela superativação dos seus sinais de transdução e cascatas de sinalização.

Os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) são considerados o principal tratamento clínico dos miomas uterinos. Seu uso parte do pressuposto de que a etiologia desses tumores está diretamente relacionada à presença dos hormônios esteroides sexuais femininos, sendo seu principal efeito a mimetização da menopausa (BRASIL, 2017). Assim, Di Lieto et al., (2003) realizaram um estudo (usando a técnica de imunistoquímica) para avaliar a associação de receptores IGF-I, volume uterino e o tratamento com análogos de GnRh. Como resultado, confirmou-se que a administração desse fármaco está associada à redução do volume uterino e juntamente a isso, sugere-se que o decaimento do volume está associado à redução dos níveis de receptores IGF-I em células leiomiomatosas.

Outros trabalhos também utilizaram a técnica de imunistoquímica para realizar a avaliação e quantificação de fatores de crescimento e seus receptores em miomas uterinos e no miométrio adjacente. Dixon; He; Haseman (2000) utilizaram amostras teciduais de sete mulheres para o seu trabalho e, dentre os receptores estudados, estava o IGF-IR. Esse receptor apresentou sua expressão na membrana citoplasmática e no citoplasma de células miometriais, leiomiomatosas e em vasos sanguíneos. Como resultado, concluiu uma maior expressão de IGF-IR no tecido leiomiomatoso, se comparada ao miométrio.

A expressão de receptores IGF-I tem se mostrado como um marcador celular importante relacionado à presença de leiomiomas uterinos. No entanto, até onde investigamos, a literatura apresenta poucos trabalhos que avaliam a influência desse biomarcador na leiomiomatose uterina, o que nos levou à concepção do presente estudo.

2. OBJETIVO

Comparar a expressão de receptores IGF-I no leiomioma uterino e no miométrio adjacente.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo e local de realização

Trata-se de um estudo transversal, realizado com mulheres portadoras de leiomiomatose uterina sintomática que se submeteram ao procedimento de histerectomia abdominal total na Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas, Teresina- PI, no período de abril a dezembro de 2017.

3.2. Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo mulheres com idade acima de 18 anos, diagnosticadas com leiomiomatose uterina e que foram submetidas ao procedimento de histerectomia abdominal total.

3.3. Critérios de não-inclusão

- Mulheres na pós-menopausa.
- Pacientes portadoras de alguma neoplasia uterina maligna.
- Pacientes que já tenham realizado algum tratamento hormonal ou cirúrgico para miomas uterinos.

3.4. Cálculo amostral

A determinação do tamanho da amostra para o estudo foi obtida 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 = Número de indivíduos da amostra.

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

p = Proporção de indivíduos que pertencem à categoria que estamos interessados em estudar.

q = Proporção de indivíduos que não pertencem à 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%, onde o n foi estimado em 66 pacientes (BORGFELDT; ANDOLF, 2000).

3.5. Métodos

3.5.1. Coleta de material biológico

Foram coletadas amostras teciduais de leiomioma uterino e de tecido miometrial (distanto no mínimo cinco centímetros de qualquer mioma), ambas com cerca de, pelo menos, um centímetro de diâmetro. Logo após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos com formol tamponado 10% devidamente identificados e, então, transportadas Serviço de Anatomia Patológica vinculado ao Hospital Getúlio Vargas, para o processamento e confecção de blocos de parafina.

3.5.2. Método histológico

Os blocos de parafina foram confeccionados seguindo o procedimento operacional padrão estabelecido pelo laboratório.

Os fragmentos de tecido foram colocados individualmente em cassetes de plástico, sendo devidamente identificados com o número de registro de cada paciente. Antes de serem levadas ao equipamento, as amostras foram imersas em formol por no mínimo 4h.

O equipamento utilizado foi o processador automático de tecidos Lupetec (modelo PT05), responsável pelo preparo tecidual antes da inclusão destes em blocos de parafina. O processamento total durou cerca de 12 horas e baseia-se na imersão dos cassetes em “banhos químicos”. O protocolo estabelecido utiliza um total de 12 banhos, o qual segue a seguinte ordem de imersão: formol (1º e 2º), álcool (3º ao 7º), xilol (8º ao 10º) e parafina aquecida a 69 °C (11º e 12º); cada uma destas etapas apresentou duração de cerca de 1 hora.

Após as 12 horas de processamento, os cassetes foram retirados do equipamento e levados para uma estufa, onde é feita a inclusão de parafina para a confecção final dos blocos. Uma vez prontos, os blocos de parafina foram armazenados para, posteriormente, serem levados ao micrótomo para realização de cortes histológicos e preparo das lâminas utilizadas na técnica de imunohistoquímica.

3.5.3. Método imunohistoquímico

A análise imunohistoquímica foi realizada no laboratório de biologia reprodutiva pertencente ao departamento de ginecologia e obstetrícia da *McMaster University* em Hamilton, Canadá através de uma bolsa de estudos concedida pelo “*Global Affairs Canada International Scholarships Program*” (Anexo A) sob supervisão do Prof. Dr. Lauren (Warren) Foster.

Os cortes histológicos foram confeccionados com o uso de um micrótomo (*Leica*) ajustado para 4 µm de espessura e, posteriormente, levados ao banho maria (com temperatura variando entre 40 °C e 60 °C). Logo em seguida, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro (*Gold Seal*) devidamente identificadas e previamente tratadas com APTS (*3-Aminopropyltriethoxysilane - Sigma-Aldrich*, código 919-30-2). As lâminas, já com o material histológico, foram colocadas em um aquecedor para secagem e, então, armazenados em local apropriado.

Para a desparafinação dos cortes histológicos, foram utilizados três banhos consecutivos de xilol à temperatura ambiente, com duração de 5 minutos cada. Em seguida, para o processo de reidratação, os cortes foram colocados em banhos de álcool etílico nas concentrações de 100% (2x), 90% e 70%, respectivamente, por cerca de 5 minutos cada. Posteriormente, os mesmos foram imersos em água destilada por 5 minutos.

Após esse processo, foi realizada a recuperação antigênica. As lâminas foram imersas em um tampão de citrato (*Sigma-Aldrich*, código C9999) com pH 6.0 e levadas a um forno micro-ondas até atingir o ponto de fervura, por cerca de 3 minutos. Em seguida, foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento e, então, submetidas ao processo de lavagem em solução tampão fosfato-salino, pH 7.3 – 7.5 (*PBS – Bioshop*, código PBS405.1) por 5 minutos em um agitador de baixa velocidade.

Para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em uma solução composta por peróxido de hidrogênio 30% (*Fisher Chemical*, código CAS 7722-84-1) e álcool metílico, por 30 minutos, em um agitador de baixa velocidade e, então, foram lavadas com PBS por 5 minutos.

Em seguida, para evitar a marcação de fundo inespecífica, adicionou-se soro normal de cabra 10% (*Merck*, código S26-100ML) às lâminas para incubação em câmara escura por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse processo, as amostras foram retiradas e lavadas com PBS por 5 minutos e, então, adicionou-se o anticorpo primário específico, cuja incubação se deu pelo período de uma noite inteira (“*overnight*”), a 4 °C, também em câmara escura. Foi utilizado um anticorpo policlonal para o receptor IGF-I (*Rabbit anti-human IGF1R alpha Polyclonal Antibody – Thermo Fisher Scientific*, código PA5-14677) na diluição 1:50 em soro de cabra normal 10%.

No dia seguinte, após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos e, então, encubadas novamente em câmara escura com o anticorpo secundário (*Pierce® Goat Anti-Rabbit IGG (H + L) Peroxidase Conjugated - Thermo Fisher Scientific*, código 31466) na diluição 1:500 em soro de cabra normal 10% por 1 hora em temperatura ambiente.

Após a incubação do anticorpo secundário, as amostras foram lavadas novamente com PBS por 10 minutos e, então, preparadas para a reação de coloração utilizando uma solução com o cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto - *Sigma-Aldrich*, código D5637-10G) juntamente com PBS e peróxido de hidrogênio, tendo sido incubados por cerca de 2 minutos e 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e contra coradas com hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

Para finalizar, os cortes passaram pelo processo de desidratação, sendo embebidos em banhos consecutivos de álcool etílico nas concentrações de 70%, 90%

e 100% respectivamente, por aproximadamente 15 segundos, e três banhos de xilol, por cerca de 5 minutos cada. Em seguida as lâminas foram montadas utilizando-se algumas gotas de Permaunt® (*Fisher Chemical™ Permount™ Mounting Medium*, código SP15-500) e lamínulas de vidro.

Para o controle negativo, cada lâmina recebeu uma amostra do corte em duplicata, onde este passou por todos os processos citamos acima, excluindo-se apenas a aplicação de anticorpo primário.

3.5.4. Método quantitativo

A avaliação das lâminas foi realizada de forma manual no laboratório do Serviço de Anatomia Patológica vinculado ao Hospital Getúlio Vargas. Foi utilizando um microscópio de luz binocular (Nikon eclipse E200 – Figura 6) com objetivas de 4x e 10x e oculares de 10x, perfazendo aumentos que variaram entre 40x e 100x. A análise foi feita por dois observadores cegos, simultaneamente, e os resultados divergentes foram verificados por um patologista.

Figura 6 - Microscópio Nikon eclipse E200 para dois observadores.



Fonte: Arquivo pessoal

Para a análise das lâminas de imunistoquímica utilizou-se um score semiquantitativo descrito por Detre; Jotti; Downsett, 1995 (“*quickscore*”) e utilizado por Dixon; He; Haseman, 2000 na avaliação do receptor IGF-I em tecido leiomiomatoso e miometrial.

Cada amostra tecidual foi avaliada pela multiplicação do score obtido com a porcentagem geral de células coradas positivamente para imunistoquímica pelo score obtido com a intensidade de coloração detectada pela reação. A porcentagem de células positivas coradas foi classificada como: 0% - 4% (1), 5% -19% (2), 20% - 39% (3), 40% - 59% (4), 60% - 79% (5) e 80% - 100% (6).

Já a intensidade da coloração foi classificada como: negativa (0), fraca (1), moderada (2) e intensa (3). Todas as lâminas foram observadas por completo (todos os campos) e, caso apresentassem diferentes intensidades de coloração, levava-se em consideração àquela que apresentasse maior frequência.

3.5.5. Método estatístico

A análise estatística foi realizada através do software *IBM SPSS® Statistics 20*. A normalidade das distribuições foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Foi realizado o teste de Wilcoxon (SIEGEL, 1956) para comparação de médias, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.6. Aspectos legais e éticos

O estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí obedecendo à resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado com o número CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 65345917.9.0000.5214 (Anexo B). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) concordando com os termos da pesquisa (Apêndice A).

4. RESULTADOS

O estudo incluiu 66 mulheres no total. Porém, devido às perdas amostrais e atendendo aos critérios de exclusão, a análise final envolveu 50 pacientes, das quais foram analisadas 50 amostras de miomas e 50 de miométrio não neoplásico. A média de idade das pacientes foi de 46,32 anos (mínima de 37 anos e máxima de 55 anos).

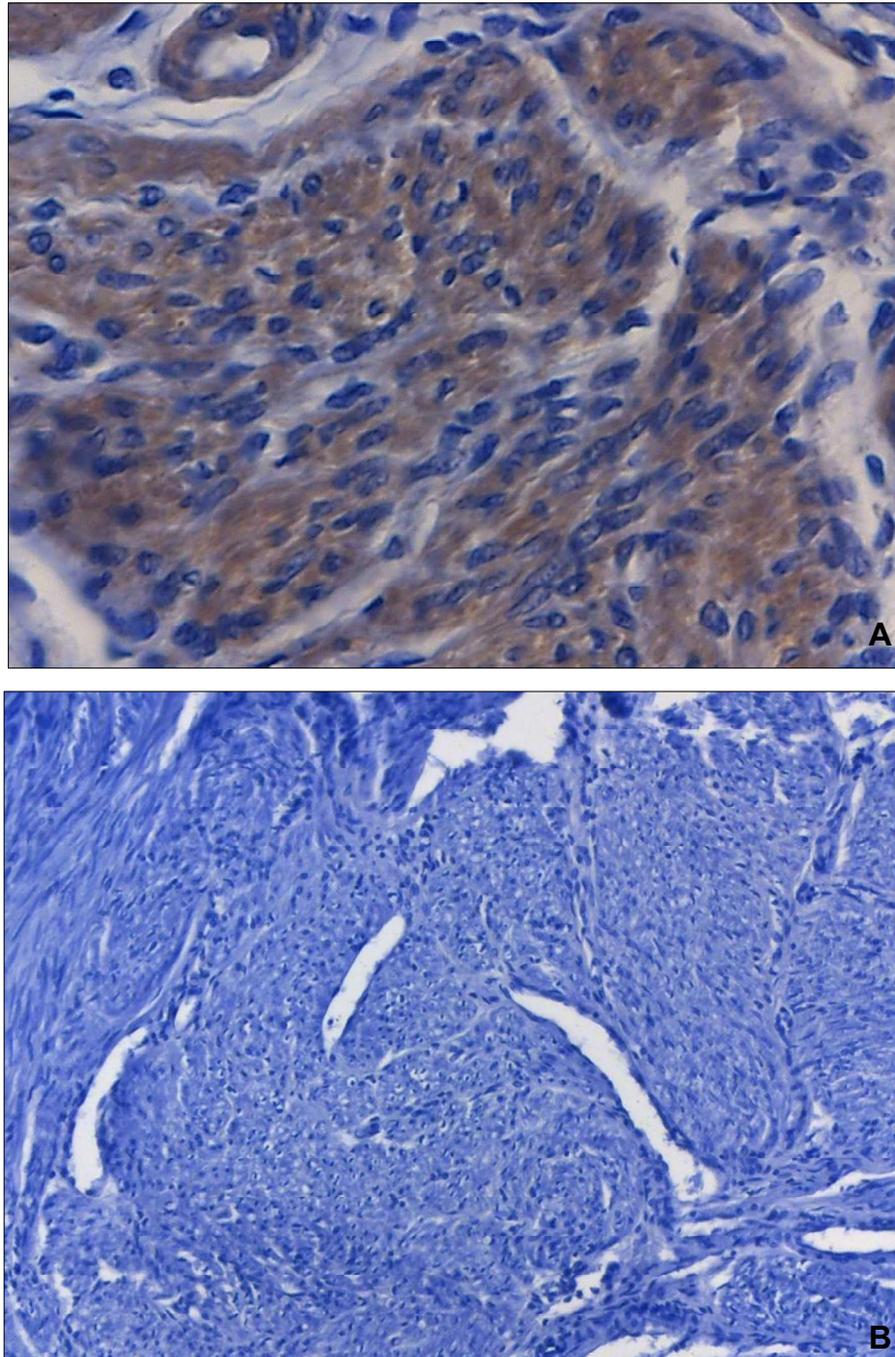
À microscopia de luz, as amostras de tecido miometrial (Figura 7) apresentaram uma maior porcentagem de células coradas positivamente, bem como uma maior intensidade de coloração, se comparado às amostras celulares de tecido leiomiomatoso (Figuras 8). Ambas as figuras representam amostras oriundas da mesma paciente.

Em ambos os tecidos, observou-se a expressão do receptor IGF-I na membrana citoplasmática. No entanto, algumas regiões também apresentaram essa expressão no espaço intracitoplasmático, correspondendo, assim, com os resultados descritos por Dixon; He; Haseman (2000).

O score médio de células coradas no miométrio e no mioma, para receptores IGF-I, foi de $11,36 \pm 5,61$ e $7,60 \pm 4,46$, respectivamente, $p < 0,05$ (Tabela 1).

Os resultados encontram-se melhor ilustrados no gráfico boxplot que representa a expressão do receptor IGF-I através dos scores obtidos no miométrio e no mioma (Figura 9).

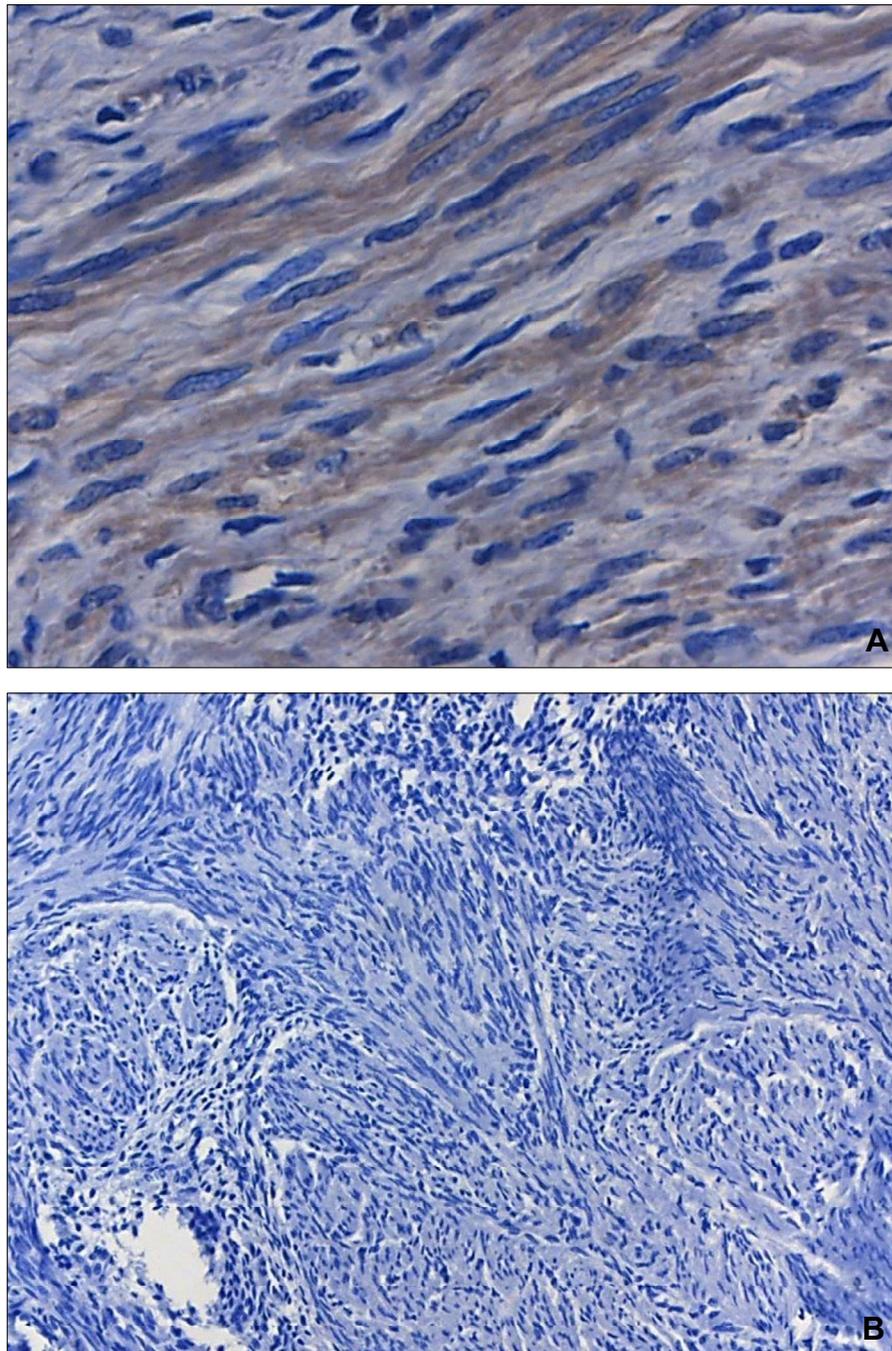
Figura 7 - Fotomicrografias de cortes histológicos de miométrio uterino.



Fonte: Arquivo Pessoal

*Na Figura **A**, as partes coradas em marrom representam as áreas que expressam o receptor IGF-I (magnificação original de 400x) e partes em azul representam as áreas contra coradas com hematoxilina de Mayer. Já a Figura **B** representa a fotomicrografia do controle negativo do mesmo tecido, evidenciando a ausência de reações inespecíficas (magnificação original de 100x). As partes em azul também representam as áreas contra coradas com hematoxilina de Mayer.

Figura 8 - Fotomicrografias de cortes histológicos de mioma uterino.



Fonte: Arquivo Pessoal

*Na Figura **A**, as partes coradas em marrom representam as áreas que expressam o receptor IGF-I (magnificação original de 400x) e partes em azul representam as áreas contra coradas com hematoxilina de Mayer. Já a Figura **B** representa a fotomicrografia do controle negativo do mesmo tecido, evidenciando a ausência de reações inespecíficas (magnificação original de 100x). As partes em azul também representam as áreas contra coradas com hematoxilina de Mayer.

TABELA 1 – Medidas descritivas dos scores obtidos através da análise das amostras de mioma e miométrio.

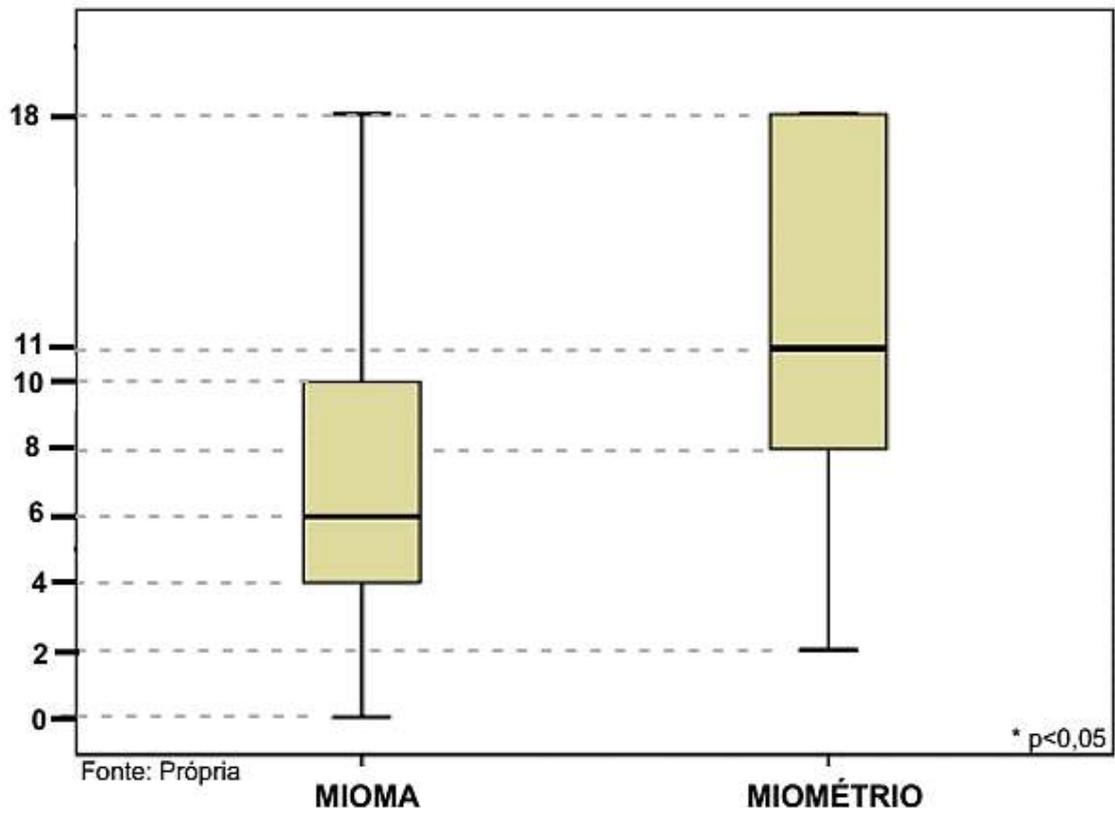
Grupo	N	Média	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor*
Score do Miométrio	50	11,36	5,61	11,00	2,00	18,00	0,00
Score do Mioma	50	7,60	4,46	6,00	0,00	18,00	

Fonte: Própria.

* N = tamanho da amostra

* Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$

Figura 9 – Boxplot da expressão do receptor IGF-I no mioma e no miométrio.



5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a expressão de receptores IGF-I, através da técnica de imunistoquímica, em miomas uterinos e no miométrio adjacente oriundos de pacientes portadoras de leiomiomatose uterina sintomática que se submeteram ao procedimento de histerectomia abdominal total na Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas, na cidade de Teresina – PI. Os receptores IGF-I tem sido relacionado a essa neoplasia devido suas características de proliferação celular, diferenciação, apoptose e transformação, cuja interação com o IGF-I é regulada por um grupo de proteínas de ligação (IGFBPs) (ISLAM et al., 2016).

Até onde investigamos, há escassez na literatura de estudos que avaliem e comparem a expressão de receptores IGF-I em miomas uterinos e no miométrio provenientes da mesma paciente. No presente trabalho, através do método “*quickscore*”, que tem como base a avaliação semiquantitativa da intensidade de coloração e da porcentagem de células coradas positivamente, foi observada uma maior concentração desse receptor no tecido miometrial, se comparado ao tecido leiomiomatoso dessas pacientes. Através do teste de Wilcoxon, para comparação de médias, verificou-se que a diferença entre os dois grupos estudados é estatisticamente significativa.

Esse resultado corrobora com o de Burroughs et al. (2002) que realizaram um estudo utilizando um modelo animal de miomas uterinos em ratos Eker, que mimetizam essa doença nesses animais da mesma maneira que ocorre em humanos. Nele, foi avaliada a regulação da expressão genética do IGF-I e do seu receptor (IGF-IR) em miomas e no tecido miometrial normal e, como resultado, foi observado que os níveis de RNAm de IGF-IR nos miomas apresentou uma menor expressão, se comparados aos níveis observados no miométrio. Em contrapartida, foi observado que a expressão de IGF-I nos miomas apresentou-se 7,5 vezes maior se comparado ao miométrio de animais de mesma idade.

Por sua vez, Chaves et al. (2004) estudaram amostras de miomas e miométrios de 14 pacientes que se submeteram à cirurgia de histerectomia. Essas amostras também foram utilizadas para análise da expressão genética dos receptores IGF-I através da eletroforese dos produtos da reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR). Os resultados mostraram que, tanto o tecido miometrial (0.8216 ± 0.096) quanto o leiomiomatoso (0.7905 ± 0.136) apresentaram níveis de RNAm aproximadamente iguais, o que demonstra uma expressão genética

similar dos receptores IGF-I entre os dois tecidos, o que representa um resultado divergente daquele encontrado no presente estudo, onde foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão do receptor IGF-I no mioma e no miométrio.

Já Dixon; He; Haseman (2000) desenvolveram um trabalho avaliando diversos fatores de crescimento e seus respectivos receptores através da análise tecidual de mioma e miométrio de 7 pacientes com idade entre 42 e 47 anos. Dentre esses receptores, incluiu-se o IGF-IR e sua proteína ligante. Com abordagem similar à adotada no presente estudo, foi utilizada a técnica de imunistoquímica para marcação dos receptores IGF-I e o método “*quickscore*” para a quantificação dos mesmos. Como resultado, pôde-se verificar uma maior expressão de receptores IGF-I em miomas uterinos (“*quickscore*” de aproximadamente 10,5), se comparados tecido miometrial (“*quickscore*” de aproximadamente 6,5). Já o presente trabalho utilizou um número maior de pacientes (50 no total) com idade acima de 18 anos (sendo a média de idade 46,32 anos) e, como resultado, observou uma expressão mais elevada de receptores IGF-I no miométrio uterino (“*quickscore*” de $11,36 \pm 5,61$), se comparada à expressão observada nos miomas (“*quickscore*” de $7,60 \pm 4,46$). Ambos os trabalhos apresentaram significância estatística $p < 0,05$).

Resultados similares em relação à expressão de IGF-IR foram relatados por Van Der Van et al. (1994) através da avaliação de biópsias de 15 miomas e 18 miométrios onde verificou-se, também através da técnica de imunistoquímica, a presença de células intensamente mais coradas no tecido leiomiomatoso, se comparada às células observadas no tecido miometrial, sugerindo, assim, uma maior expressão desses receptores em miomas uterinos.

Além disso, um estudo americano conduzido com 10 mulheres com idade variando de 41 a 49 anos pesquisou a expressão de diferentes receptores tirosina quinase. Dentre os 17 receptores estudados, 15 estavam altamente expressos em miomas uterinos. Dentre estes, observou-se a presença do IGF-IR, onde, além de observada uma maior fosforilação em miomas, se comparado ao miométrio, também relatou que em estudos anteriores foi observada uma maior expressão de proteínas do receptor em miomas, se comparada à sua expressão no tecido miometrial (YU et al., 2008).

A literatura apresenta estudos que também mostram uma associação entre o IGF-IR e outras neoplasias. Blecher et al. (2017) afirmam que a expressão desse receptor é significativamente mais elevada no carcinoma endometrial, se comparada à sua expressão no endométrio normal. Além disso, esse estudo também aponta que a superativação da cascata de sinalização do IGF-IR correlaciona-se com a resistência à quimioterápicos de células do câncer no ovário. Já o estudo realizado por Bhargava et al. (2011) relata que o IGF-IR está amplamente expresso no tecido mamário normal, apresentando um leve a moderado aumento na expressão em lesões benignas e lesões mamárias proliferativas.

Por sua vez, Weigang et al. (1994) avaliaram a distribuição do receptor IGF-I no trato genital feminino através da técnica de imunistoquímica. Nele, 124 amostras teciduais de diferentes locais do trato genital feminino foram coletadas durante procedimentos cirúrgicos. Dentre essas, nenhuma amostra de tecido miometrial normal ou leiomiomatoso apresentou reação positiva para imunistoquímica, o que representa uma forte diferença entre o presente estudo, já que, dentre as amostras das 50 pacientes estudadas, apenas uma registrou resultado negativo para a expressão imunistoquímica do receptor IGF-I em uma amostra de tecido leiomiomatoso.

O presente estudo trouxe uma nova perspectiva referente à expressão de receptores IGF-I no tecido leiomiomatoso e miometrial uterino. Diferentes aspectos foram observados e resultados divergentes nos estudos podem estar relacionados a diferenças nas técnicas laboratoriais adotadas bem como a diferenças populacionais e à quantidade variada de pacientes utilizadas nos estudos. Fatores predisponentes associados (idade, menarca precoce, gravidez e paridade, obesidade, dieta, falta de exercício físico e etnia) também podem ter exercido alguma influência nesses resultados (MCWILLIAMS; CHENNATHUKUZH, 2017). Além disso, a etiologia dos miomas uterinos pode estar associada a vias metabólicas que não sejam diretamente dependentes dos receptores de membrana e seus sinais de transdução.

Outrossim, esse estudo também apresenta algumas limitações. Primeiramente, foi utilizada a técnica de imunistoquímica para avaliação da expressão de IGF-IR, não sendo avaliados também os níveis plasmáticos da sua proteína ligante (IGF-I) e de transporte (IGFBPs). Portanto, estudos futuros devem ser realizados com um dimensionamento amostral maior, abrangendo todo o panorama de funcionamento do

sistema IGF (proteína ligante, receptor, proteínas de transporte e sinais de transdução do receptor) bem como a associação desses fatores com características tumorais e clínicas das pacientes para que, dessa forma, se tenha um entendimento mais amplo da relação desse receptor com os miomas uterinos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, observou-se uma menor expressão do receptor IGF-I no tecido leiomiomatoso em comparação com o tecido miometrial uterino não neoplásico, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS

AGUIERRE, G. et al. Insulin-Like Growth Factor 1 in the Cardiovascular System. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v. 175, p. 1-45, 2018.

BHARGAVA, R. et al. Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-IR) expression in normal breast, proliferative breast lesions, and breast carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** v. 19, n. 3, p. 218-225, 2011.

BLECHER, A. et al. The IGF Pathway in Gynecology Oncology - Current Knowledge and Possible Therapeutic Implementations. **Journal of Gynecology and Women's Health.** v. 4, n. 5, p. 001-005, 2017.

BOCLIN, K; 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. 301-313, 2013.

BONEFELD, K; MOLLER, S. Insulin-like growth factor-I and the liver. **Liver International.** v. 31, n. 7, p. 911-919, 2011.

BORAHAY, M.A. et al. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. **Molecular Medicine,** v. 21, p. 242-256, 2015.

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 Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.** v. 79, p. 202-207, 2000.

BRAHMKHATRI, V.P; PRASANNA, C; ATREYA, H.S. Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies. **BioMed Research International.** v. 2015, p. 1-24, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Leiomioma de Útero:** Relatório de recomendação. Brasília, 2017.

BRASILEIRO, J.P.B; LOPES, J.R.C; LOPES, V.M. Mioma Uterino. In: PRIMO, W.Q.S.P; CORRÊA, F. J. S; BRASILEIRO, J.P.B. (Org.). **Manual de Ginecologia da Sociedade de Ginecologia e Obstetrícia de Brasília.** 2. ed. Brasília: Luan Comunicação, 2017. p. 196-218.

BURROUGHS, K.D. et al. Dysregulation of IGF-I signaling in uterine leiomyoma. **Journal of Endocrinology**. v. 172, p. 83-93, 2002.

CHAVES, E.B.M. et al. Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor mRNA Expression and Autophosphorylation in Human Myometrium and Leiomyoma. **Gynecol Obstet Invest**. v. 57, p. 210-213, 2004.

CIARMELA, P. et al. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 6, p. 772-790, 2011.

DE LA GARZA, R.G. et al. Insulin-Like Growth Factor-1 Deficiency and Cirrhosis Establishment. **J Clin Med Res**. v. 9, n. 4, p. 233-247, 2017.

DELAFONTAINE, P; SONG, Y.H; LI, Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-I, IGF-IR, and IGF-I Binding Proteins in Blood Vessels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, p. 435-444, 2004.

DETRE, S; JOTTI, G.C; DOWSETT, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol**. v. 48, p. 876-878, 1995.

DI LIETO, A. et al. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor type I receptor and uterine volume changes in gonadotropin-releasing hormone analog–treated uterine leiomyomas. **Am J Obstet Gynecol**. v. 188, n. 3, p. 702-706, 2003.

DIXON, D; HE, H; HASEMAN, J.K. Immunohistochemical Localization of Growth Factors and Their Receptors in Uterine Leiomyomas and Matched Myometrium. **Environmental Health Perspectives**. v. 108, n. 5, p. 795-802, 2000.

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

FLAKE, G.P; ANDERSEN, J; DIXON, D. Etiology and Pathogenesis of Uterine Leiomyomas: A Review. **Environmental Health Perspectives**. v. 111, n. 8, p. 1037-1054, 2003.

GIRNITA, L. et al. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-IR) signaling regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 71, p. 2403-2427, 2014.

GKIOKA, E. et al. The Role of Insulin-like Growth Factor-1 Signaling Pathways in Uterine Leiomyoma. **In Vivo**, v. 29, p. 637-650, 2015.

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS. **Livro de registro de altas das pacientes da ginecologia do Hospital Getúlio Vargas**. Teresina, 2019.

ISLAM, M.S. et al. Growth factors and pathogenesis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v. 34, p. 25-36, 2016.

MANTA, L. et al. The etiopathogenesis of uterine fibromatosis. **Journal of Medicine and Life**. v. 9, n. 1, p. 39-43, 2016.

MARTINELLI JUNIOR, C.E; CUSTÓDIO, R.J; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, n. 5, p. 717-725, 2008.

MARTÍN-ESTAL, I; DE LA GARZA, R.G; CORTÁZAR, I.C. Intrauterine Growth Retardation (IUGR) as a Novel Condition of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-I) Deficiency. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v. 117, p. 1-35, 2016.

MARTINI, F.; TIMMONS, M.; TALLITSCH. **Anatomia humana**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MAS, A. et al. Updated approaches for management of uterine fibroids. **International Journal of Women's Health**. v. 9, p. 607-617, 2017.

MCWILLIAMS, M.M; CHENNATHUKUZH, V.M. Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. **Seminars in Reproductive Medicine**. v. 35, n. 2, p. 181-189, 2017.

OLIVEIRA, C. **Manual de ginecologia**. Lisboa: Permanyer Portugal, 2009. v. 1.

PENG, L. et al. Expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF signaling: molecular complexity in uterine leiomyomas. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 6, p. 2664-2675, 2009.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. São Paulo, 2013.
Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/ses/noticias/2013/junho/mioma-interna-33-mulheres-por-dia-em-sp>. Acesso em 20 jun. 2018.

SIEGEL S. **Nonparametric Statistics for the Behavioral Science**. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 1956.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GINECOLOGIA. **Consenso Nacional Sobre Miomas Uterinos**. Coimbra, 2017.

STEWART, E.A. et al. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. **BJOG**. v. 124, p. 1501-1512, 2017.

VAN DER VEN, L.T.M. et al. Growth advantage of human leiomyoma cells compared to normal smooth-muscle cells due to enhanced sensitivity toward insulin-like growth factor I. **Int. J. Cancer**. v. 59, p. 427-434, 1994.

WEIGANG, B. et al. Immunohistochemical localization of Insulin-like growth factor I receptors in benign and malignant tissues of the female genital tract. **Tumor Biol**. v. 15, p. 236-246, 1994.

YU, L. et al. Differential Expression of Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) and IGF-I Pathway Activation in Human Uterine Leiomyomas. **Mol Med**. v. 15, n. 5-6, p. 264-275, 2008.

APÊNDICE A – 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 dos 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 A – Carta convite para o “Global Affairs Canada International Scholarships Program”.



Global Affairs Canada / Affaires mondiales Canada

Canada

June 21, 2018

Immigration, Refugees and Citizenship Canada (IRCC)
Embassy of Canada or High Commission
Immigration Section for Colombia

To: Visa Officer

Re: **Confirmation of Global Affairs Canada Scholarship Recipient**

This letter is to confirm that the individual listed below is a recipient of a scholarship through the Global Affairs Canada International Scholarships Program (<http://www.scholarships-bourses.gc.ca>) which is under administration by the Canadian Bureau for International Education. Further details are provided below:

Scholarship recipient:	Emerson Davi do Nascimento Brazil
Scholarship program:	Emerging Leaders in the Americas Program
IRCC special program code*	509
Country of citizenship:	Brazil
Home institution:	Universidade Federal do Piauí
Canadian host institution:	McMaster University
Purpose of visit:	A full time academic exchange in Canada related to the recipient's program of study currently undertaken at their home institution
Level of study and duration:	Graduate - four months or one academic term
Scholarship amount disbursed to recipient:	\$7200

* Refer to the following website: www.cic.gc.ca/english/resources/tools/temp/students/program.asp;
Work permit LMIA exemption C44: www.cic.gc.ca/english/resources/tools/temp/work/opinion/policy.asp

Scholarship funds are intended to cover transportation, visas and permits, living and other expenses in Canada. Under the terms of this program, the tuition fees from the Canadian host institution are waived and recipients remain registered at their home institution during this exchange. All recipients of the 2018-2019 program must arrive in Canada no later than February 1, 2019.

Please do not hesitate to contact us by email at admin-scholarships-bourses@cbie.ca or by phone at 613-237-4820 if your office should require any further information.

Sincerely,

Flavielle Morais
Program Manager
Canadian Bureau for International Education



Canadian Bureau for International Education
Bureau canadien de l'éducation internationale

Administered by the / Administré par le :
Canadian Bureau for International Education • Bureau canadien de l'éducation internationale
220 av. Laurier Ave. W/O, Suite/Bureau 1550, Ottawa, Ontario CANADA K1P 5Z9
Tel./Tél. 613-237-4820 • scholarships-bourses@cbie.ca
www.scholarships.gc.ca • www.bourses.gc.ca

ANEXO B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) 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.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a expressão do receptor de biomarcadores no leiomioma uterino e no miométrio normal adjacente.

Objetivo Secundário:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UFPI - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PIAUÍ - CAMPUS
UNIVERSITÁRIO MINISTRO



Continuação do Parecer: 2.061.409

• Identificar o perfil sócio-demográfico das pacientes com leiomiomatose uterina, incluindo nível socioeconômico, raça, idade, paridade e status menopausal, e associação dessas variáveis com a expressão dos biomarcadores no miométrio normal e no leiomioma uterino. • Avaliar a expressão Ki-67, Bcl-2, Bax, Metaloproteinases, Receptor de estrógenos, Receptor de progesterona, receptores de micronutrientes (vitamina D, zinco e cobre) com as características tumorais, como tamanho, localização, intensidade dos sintomas e volume uterino. • Verificar a associação da expressão de biomarcadores Ki-67, Bcl-2, Bax, Metaloproteinases, Receptor de estrógenos, Receptor de progesterona, receptores de micronutrientes (vitamina D, zinco e cobre) e o risco para leiomiomas uterinos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos da pesquisa são mínimos, visto que as amostras serão extraídas de pacientes que já estão sob anestesia para se submeterem a histerectomia abdominal por indicação médica. Assim, os riscos são inerentes apenas ao procedimento cirúrgico.

Benefícios:

O estudo de biomarcadores no leiomioma e no tecido miométrio normal permitiria um melhor entendimento na etiopatogenia e fisiopatologia dessa neoplasia, podendo também ser útil no acompanhamento do tratamento e na elaboração de estratégias terapêuticas para esses tumores, o que nos levou a concepção do presente estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é muito relevante e poderá contribuir de forma significativa na qualidade do tratamento de pacientes acometidos pela morbidade. O pesquisador tem experiência na realização da pesquisa e os preceitos éticos foram contemplados no projeto.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



**UFPI - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PIAUÍ - CAMPUS
UNIVERSITÁRIO MINISTRO**



Continuação do Parecer: 2.061.409

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram inseridos na Plataforma Brasil.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa apto a ser desenvolvido.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_856334.pdf	09/05/2017 15:02:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodeconsetimento.pdf	09/05/2017 15:02:02	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	18/04/2017 17:50:25	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Outros	Cartaaocep.pdf	01/03/2017 18:48:44	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Outros	TCUD.pdf	25/01/2017 23:48:47	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Outros	Lattes.pdf	25/01/2017 23:46:39	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Outros	Instrumento.pdf	25/01/2017 23:44:32	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	25/01/2017 23:40:55	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo.pdf	25/01/2017 23:39:58	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao.pdf	25/01/2017 23:38:52	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	25/01/2017 23:35:28	Pedro Vitor Lopes Costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UFPI - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PIAUÍ - CAMPUS
UNIVERSITÁRIO MINISTRO



Continuação do Parecer: 2.061.409

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 12 de Maio de 2017

Assinado por:
Herbert de Sousa Barbosa
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO C – Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na revista PLOS ONE.

Submission Confirmation for PONE-D-19-33761 - [EMID:c8f334d1bc5878cd]

PLOS ONE <em@editorialmanager.com>

Sex, 06/12/2019 00:30

Para: Emerson Davi do Nascimento Brazil <emersonbrazil@hotmail.com>

PONE-D-19-33761

Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor type-I receptor in uterine fibroids and adjacent myometrium and its correlation with clinical characteristics of patients diagnosed with uterine leiomyomatosis

PLOS ONE

Dear Mr do Nascimento Brazil,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor type-I receptor in uterine fibroids and adjacent myometrium and its correlation with clinical characteristics of patients diagnosed with uterine leiomyomatosis' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-19-33761.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <https://www.editorialmanager.com/pone/>.

If during submission you selected the option for your manuscript to be posted on the bioRxiv preprint server (<http://biorxiv.org>), we will be assessing the manuscript for suitability shortly. If suitable, your preprint will be made publicly available on bioRxiv and you will receive an email confirmation from them when it has posted. Please check your response to this question and email us as soon as possible at plosone@plos.org if it has been answered incorrectly. Further information about our partnership with bioRxiv to facilitate the rapid availability of life sciences research is available at <http://journals.plos.org/plosone/s/preprints>.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

How concerned are you that the research published in your field is not reproducible?

<https://surveys.plos.org/s3/pone-reproducibility-EM?answer=very>

<https://surveys.plos.org/s3/pone-reproducibility-EM?answer=somewhat>

<https://surveys.plos.org/s3/pone-reproducibility-EM?answer=neutral>

<https://surveys.plos.org/s3/pone-reproducibility-EM?answer=not-really>

<https://surveys.plos.org/s3/pone-reproducibility-EM?answer=not-at-all>

Kind regards,
PLOS ONE