



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Luciana Albina Reis Rosa

**Identificação de genes candidatos ao desenvolvimento de
Leiomiomas Uterinos**

Monografia realizada no NeoGene Laboratório – Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina (FMB) – apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Campus de Botucatu), como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto

Co-orientadora: Dra. Renata de Azevedo Canevari

Botucatu – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Reis-Rosa, Luciana Albina.

Identificação de genes candidatos ao desenvolvimento de Leiomiomas Uterinos / Luciana Albina Reis Rosa - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Co-orientadora: Renata de Azevedo Canevari

1. Útero – Doenças, Aspectos genéticos 2. Leiomioma uterino - Aspectos genéticos

Palavras-chave: Expressão gênica, Leiomiomas uterinos, receptores esteróides, *AHR*, *WNT7A*

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares.”

“É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

Dedicatória

Aos três pilares que me mantêm erguida:

DEUS...

Que com todo seu amor e dedicação nunca deixou que o caminho mais fácil e bonito me ludibriasse quanto aos desafios da vida e que sempre, nos meus momentos de fé ou não, se demonstrou presente e prestativo...

FAMÍLIA...

...Desde o princípio, foram vocês que me mostraram a essência da vida!...

Obrigada Paízinho, por nunca ter deixado que nada me faltasse e nunca ter negado esforços pra contribuir com a nossa formação! Obrigada pelas broncas, pela rigidez, dedicação e amor na nossa educação! TE AMO!

Obrigada Mãe, a pessoa de coração mais puro e sincero existente na face da Terra, que possui o colo mais acolhedor e as mãos mais macias e suaves!

Minhas irmãzinhas que, apesar das brigas existentes até hoje, ninguém nega a força e a garra que possuímos unidas! AMO VOCÊS!

Obrigada pelo ombro, pelo apoio incondicional e pelo amor, acima de tudo...

AMIGOS...

Que graça teria a vida sem um bom amigo! Dedico a todos que fizeram ou fazem parte da minha vida, que estavam presentes pra secar uma lágrima ou simplesmente para não deixar que ela caísse... Aos que me fizeram chorar de tristeza ou de alegria... Pela sinceridade e eternidade dessas amizades!

Ao Gustavo... Meu grande e sincero amor! Você é parte de tudo isso! Meu "Muito Obrigada"!

Agradecimientos

À Universidade Estadual Paulista UNESP...

...Ao Instituto de Biociências (IBB) e À Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

...Ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu.

...Aos funcionários da Seção de Graduação do IB e da Diretoria do IB.

...Ao Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

...Aos docentes do IBB e da Faculdade de Medicina de Botucatu.

...À FAPESP pela bolsa e ao CNPq pelo auxílio ao projeto...

À MINHA ORIENTADORA...

...Sílvia Regina Rogatto, por ter acreditado e confiado em mim e no meu potencial, e por ter me dado a oportunidade de aprender e colaborar com o NeoGene laboratório...
Serei eternamente grata!

...Aos colaboradores desse trabalho... à Dra. Anagloria Pontes, pelo auxílio médico, à Priscila Cirillo, pelo auxílio metodológico, à Sandra Drigo, pelo aprendizado na parte técnica, à Renata Canevari, pela co-orientação, ao Caíque e à Nilva, pelo início desse trabalho...

...Às pacientes de Leiomiomas uterinos, mulheres guerreiras e fortes, sem as quais esse trabalho não existiria...

Agradecimentos Especiais

Aos que confiaram e acreditaram que fosse possível...

À MINHA FAMÍLIA...

“A Grande Família”, por sempre estar presente em todos os momentos, pelo apoio, pelo amor, pelo carinho e pela união... Meu alicerce!

...Onde tudo começou...

Minhas “bisas” Vó Angêla e Vó Ilda (*in memoriam*)... Amo vocês e o exemplo de vocês serão eternos em minhas memórias... Lindas! Saudades...

Obrigada “Vozinho” lindo (Gonçalves)... e minha “Preta” (Nilcea). Pelos ensinamentos, pelo exemplo de perseverança, fé, amor e companheirismo acima de tudo! AMO VOCÊS! Vocês são o meu maior exemplo de vida... Sem os quais essa família não teria sentido...

Obrigada “Vó” Antônia... Pela garra desde pequena, pelas histórias, pela rigidez, pelo amor, pelos almoços na piscina, pela amizade e confiança, e a força pra seguir sempre em frente! Esse exemplo guardarei pra sempre em meu coração... TE AMO!

Ao meu “vô” Domingues (*in memoriam*)... Gostaria de ter convívio mais, conhecido mais, amado mais... Mais sua lembrança será eterna! Saudades...

...Aos meus tios amados e queridos...

Tio Henrique, meu ídolo, meu grande amor, meu tudo de bom... TE AMO! Obrigada por tudo!

Tia De... Minha mãezinha carioca, minha amiga, minha companheira... A admiração por você será eterna... Meu amor cada dia maior! Sempre minha tia De...

Tia Rose... Te amo muito querida! Obrigada pelos passeios, pelas dicas, pelas broncas, por tudo!

Tio Sérgio e Tia Izabel... Exemplos de luta e garra... Admiração eterna pela família constituída e o amor que os entrelaça! AMO!

Tia Taninha e Tio Bené... Obrigada por tudo! Amo vocês!

...Aos tios “emprestados”, tão amados e queridos quanto...

Tia Adriana e Tio Renato... O que seria da nossa vida em Sorocaba sem a sua presença? Sem o seu amor, sem o seu carinho, sem o seu apoio, sem as gargalhadas e os choros... Obrigada por tudo, por nos acolher, por nos amar, nos adotar e por permitir ser chamada de “Tia”... Será eterna minha consideração e amor por você e por toda a família! Obrigada por ter nos dado o prazer da sua companhia... E minhas crianças... Pedro, Luquinhas, Júlia e Bibi... Desde sempre... AMO VOCÊS incondicionalmente!

Tia Ana e Tio Paulo... Obrigada por também nos ter acolhido nessa cidade que nos proporcionou momentos imensamente felizes... Obrigada pelas companhias, pelo apoio, pela presença, pelo carinho e pela atenção... Aos pequenos Júlio, Aninha e Bía... Adoro a convivência com vocês...

Tia Irani e Tio Paulinho... Obrigada pelo carinho, atenção, dedicação, exemplo de força e dignidade! Amo vocês!

...Aos primos...

Bianca Lessa (a “garota carioca”), Thaís Lessa (Tata) e Paul, Rafael (o lek da Lapa), Ana Caroline (Calol), Gabriela (minha baby) Guilherme e Leozinho (o mais novo membro)... AMO vocês eternamente e incondicionalmente! Vocês foram, são e sempre serão essenciais na minha vida! Obrigada...

Renata e Ana Paula, tão especiais quanto os originais... E tão originais também... Obrigada pelas conversas, fofocas, brigas, discussões... AMO VOCÊS!

Os sorocabanos, Julinho, Aninha, Bía, Pedro Henrique, Lucas, Júlia, Bibi, Gabriel e Giovanna (saudades dos pequenos)... AMO igualmente!

AOS MEUS AMIGOS...

De décadas ou dias de convívio, dos infinitos momentos de alegria, tristeza, saudades, amores e carinho infindáveis!

...Aos amigos do SESI...

Desde o primário, ginásio, colégio... Nem a distância nem o tempo nos separaram e nunca vão nos separar... AMO VOCÊS!

À Jé e a Ju: Jéssica (agora ainda mais linda com a Livia crescendo em si – muitas felicidades!) e Juliana; a Patrícia (Patão), à Carol, à Bruna Letícia (flor “fidida”), à Lydia “Maria”, à Renata (Renatão), à Sheila, à Giovanna, ao Diego (Pig – adorei os momentos de convívio), Bruno San, Felipe “Cabrita”, Rogério (Foíce ou Gín) e à todos que compartilharam esses momentos onde nós éramos felizes e sabíamos!

...Aos do clube do SESI...

Onde curtimos nossa infância e adolescência, basquete, ginástica olímpica, vôlei, natação, gincanas, acampamentos, paixões... AMO vocês!

À Cibele cabeção, por todos esses anos de risadas, trapalhadas, palhaçadas... À Livia, Nádia e Claudinha, à Mariana, à Carol, ao Bruno (Bu, muito obrigada por todos os anos e momentos inesquecíveis que passamos juntos... Você será eterno na minha vida!) e ao Lucas, ao Guí, ao Emerson, Christian, Choco e Thiago. À Paulinha, por todos os ensinamentos técnicos de basquete e, principalmente, pelos exemplos de dedicação, compromisso, rigorosidade e às lições de vida passadas durante os treinos e fora deles... Serei eternamente grata à todos que fizeram e fazem parte do meu dia-a-dia!

...Aos de Sorocaba...

Juliana Satie... Uma pessoa maravilhosa que encanta a todos com suas gargalhadas contagiantes... Que alegre meus dias só em pensamento! TE AMO Sa!

À Equipe Integração... Figuras que eu não vivo sem!! Adoro todos vocês meninos!

...Aos da Faculdade...

Que percorreram durante quatro anos momentos de êxtase, de desespero, angústia, de descobertas e felicidades, e transformaram Botucatu...

À Biomed XLI, pelas companhias, risadas, união e amizade nos momentos mais difíceis...

Em especial meus agradecimentos à Viviane (Frangote ~ TE AMO eternamente por tudo o que você significou e significa pra mim... Sem você Btu teria sido muito mais triste...), Thaís e Aline (Cocerinha e Fungueth, minha primas!! AMO vocês, a companhia de vocês, os “papos-cabeça” da Fung’s, as bochechas da Coce... Obrigada pela companhia durante esses anos... A amizade será eterna!), Patrícia (Krinha... Minha flor... Obrigada pelo ombro nos momentos mais difíceis e pelas risadas nos momentos divertidos... Amodoro muito!), Bruna (Chandelle... A menina mais doida, destrambelhada, curiosa, complicada e exigente que eu já conheci... Mas isso tudo só a torna uma pessoa super especial, e na minha vida você será eterna! Amo você!), Taise (Cru... TE AMO Cru... Você consegue cativar a todos com esse seu jeitão “rude” mas ao mesmo tempo é a pessoa mais meiga que já conheci... Obrigada pelos conselhos, abrigos, bolos de chocolate...), Erika (Arrotinho, minha quase *roomate*, obrigada pelos conselhos e conversas nos momentos mais difíceis... Adoro esse seu jeitinho de boneca de porcelana... Te Adoro muito!), Cínthya (Tsu, Batchan da XLI, pelos momentos de sabedoria e ensinamentos, companheirismo e amizade... Adoro!), Deníse (Kímera... Figura... Obrigada por alegrar os meus dias! Adoro você!), Çaçã, Clara, Kweel e µTrínk, ao Thiago (Miskuo... Foram eternos e intensos todos os momentos que passamos... Obrigada pela paciência, pela compreensão, pelo amor, pela atenção e pelo carinho durante todos esses anos... Te amo pra sempre!), ao José Alexandre (Goza... Nunca vi mais louco... Mas adoro!), Hana, K-Vux, Kuíka, Jumbo...

Aos agregados da Biomed XLI: Aos nossos bixos queridos... Kuentro, Aku, Minu, Panda, Pelank, Kumbuk, Dorí, Loka, Bugs... “O povo da Vet”, que sempre quis ser como nós: Dakota (minha gêmea... até na facul!), Fiota (gorda), Coisera, Fimosinha, Bereba, Tomo, Leiga Leígal, Abana, Colostro, Bago, Bode, Fura e às bixetes que amei ter conhecido, Meia, Nove, Sujona e Boquete... Aos demais: Cofrinho (amo vc! Vou sentir saudades!), Japoronga (um dia vc chega lá...), Perna (meu bixo!) e todos os que contribuíram para que Botucatu se tornasse um lugar muito mais agradável...

Aos do ERBM... Onde aprendi a trabalhar em equipe, respeitar e compartilhar idéias... Obrigada a todos das comissões organizadores e de apoio do 8º, 9º e 10º ERBM. O que aprendi com vocês nenhuma sala de aula me ensinaria... AMO demais! ... Gordi (Carlos Eduardo)... Obrigada por tudo! Adoro vc!

Aos do NeoGene... Que me ensinaram que o trabalho pode ser agradável, apesar da dura rotina e das inúmeras dificuldades encontradas no caminho... André, André “Peruano”, Cássia, Elô, Eliane, Fábio, Fabíola, Fernanda, Flávia, Francine, Haydeé, Livia, Miriam, Nádia, Priscila, Renata Canevari, Renata Bueno, Rodrigo, Sandra e Sara, e minha orientadora, Sílvia Rogatto... Obrigada por tudo pessoal... As lições aprendidas jamais serão esquecidas!

A todos sem os quais não teria porque seguir em frente e que, de alguma forma, influenciaram na minha formação!... AMO VOCÊS!

Resumo e Abstract

RESUMO

Leiomiomas uterinos (LU) são neoplasias benignas da musculatura lisa do miométrio, constituindo a principal causa de indicação para histerectomia e um importante problema de saúde pública. Uma variedade de alterações genéticas tem sido associada ao desenvolvimento e à patogênese desta neoplasia. Embora os fatores iniciais que levam ao desenvolvimento destes tumores serem desconhecidos, há muitas evidências mostrando que os esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, são importantes fatores para o crescimento tumoral. Estudos recentes, entretanto, revelam que outros produtos gênicos relacionados com vias de sinalização distintas além dos hormônios sexuais, podendo ou não ser ativadas por estes hormônios, estão associados com o desenvolvimento dos LU. Neste estudo foi avaliada a expressão dos transcritos dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* por RT-PCR quantitativa em tempo real em 58 amostras de LU comparados com cinco amostras de miométrio normal para explorar a base molecular hormonal desses tumores e associar estes achados com dados clínico-patológicos das pacientes. Os dados do presente estudo mostraram diminuição de expressão para os genes, *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* em 60%, 43%, 52%, 60% e 40%, respectivamente. Foi observada uma significativa diminuição da expressão do gene *AHR* comparado às amostras controles ($P=0,0130$). A quantificação relativa dos genes avaliados mostrou uma correlação positiva entre os transcritos *AHR* e *ESR1* ($P<0,0001$; $r=0,6911$) e entre os genes *ESR1* e *WNT7A* ($P<0,0001$; $r=0,5655$). O gene *WNT7A* mostrou-se diferencialmente expresso nas fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual ($P=0,0373$) e os genes *AHR* e *ESR1* entre as mulheres cíclicas e as menopáusicas ($P=0,0267$; $P=0,0415$, respectivamente). A diminuição da expressão dos genes *ESR1* e *WNT7A* foi significativamente relacionada à pacientes com idade da primeira gestação ≤ 22 anos ($P=0,0114$; $P=0,0350$, respectivamente) e ao número de gestações inferior a três para os genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2* e *WNT7A* ($P=0,0096$; $P=0,0031$; $P=0,0126$; $P=0,0253$, respectivamente). O gene *PGR* apresentou-se diferencialmente expresso entre as pacientes brancas e não-brancas ($P=0,0251$). Os resultados deste estudo revelam que a etiologia dos leiomiomas uterinos pode estar associada à expressão gênica diminuída dos receptores de estrógeno, progesterona, *AHR* e do gene *WNT7A*, indicando a existência de uma inibição cruzada entre os hormônios e seus receptores envolvidos no desenvolvimento de LU. Estudos adicionais poderão revelar a ação destes genes no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos e elucidar novas estratégias de tratamento.

ABSTRACT

Uterine leiomyomas (UL) are benign smooth muscle tumors from myometrium, representing the major indication for hysterectomies and a significant public health problem. Several genetics alterations have been associated with its development and pathogenesis. Although the initial factors that lead to the development of uterine leiomyomas are unclear, there are several evidences showing that ovarian steroids, estrogen and progesterone, are associated with these tumors. Recent reports, however, show others genes related with distinct signalization pathways besides sex hormones, which may be or not activated by these hormones, are associated with uterine leiomyomas development. In this study, the *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* and *WNT7A* gene transcripts expression was evaluated using quantitative real time RT-PCR in 58 UL samples compared to five normal myometrium tissues to explore the hormonal molecular basis of these tumors and associate these expression pattern with clinical and pathological features. The present study showed *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* and *WNT7A* down expression in 60%, 43%, 52%, 60% e 40% of the tumors, respectively, and a significant *AHR* loss of expression compared with the controls samples ($P=0.0130$). The comparison between the genes expression values revealed a positive correlation between the *AHR* and *ESR1* transcripts ($P<0.0001$; $r=0.6911$) and between the genes *ESR1* and *WNT7A* ($P<0.0001$; $r=0.5655$). The expression pattern was compared with clinical and pathological features. The *WNT7A* gene presented a differential expression pattern between the proliferative and secretory phase of menstrual cycle ($P=0.0373$) and the *AHR* and *ESR1* genes were differentially expressed between women in reproductive and menopause years ($P=0.0267$; $P=0.0415$, respectively). The *ESR1* and *WNT7A* down regulation was statistically associated with patients under 22 years from the first pregnancy ($P=0.0114$; $P=0.0350$, respectively) and parity lower than 3 was associated with *AHR*, *ESR1*, *ESR2* and *WNT7A* genes ($P=0.0096$; $P=0.0031$; $P=0.0126$; $P=0.0253$, respectively). The *PGR* levels was differentially expressed in the comparison with race (white versus non-white women) ($P=0.0251$). The results of this study suggested that the uterine leiomyoma can be associated with the down expression of the estrogen and progesterone receptors, *AHR* and *WNT7A* gene, indicating a cross-talk between these hormones and their receptors. Additional studies can reveal the action of these genes on the development of uterine leiomyoma and elucidate news treatments strategies.

Lista de Siglas e Abreviaturas

Genes

<i>β-actina (ACTB)</i>	Beta actina
<i>AHR</i>	Receptor Hidrocarboneto de Arila
<i>ESR1</i> ou <i>ER-α</i>	Receptor de estrógeno 1 ou receptor de estrógeno alfa
<i>ESR2</i> ou <i>ER-β</i>	Receptor de estrógeno 2 ou receptor de estrógeno beta
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase
<i>HPRT</i>	Hipoxantina fosforibosil transferase 1
<i>PGR</i>	Receptor de progesterona
<i>WNT7A</i>	<i>Do inglês, Wingless-type MMTV integration site family member 7A</i>

Metodologias

HE	Hematoxilina e Eosina (coloração de lâminas para análise patológica)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
RT	Transcriptase reversa

Geral

Ct	<i>Do inglês, Cycle Threshold</i>
DCt	Delta Ct
DDCt	Delta-Delta Ct
E2 ou EE	17 β -estradiol
EREs	Elementos de resposta ao estrógeno
ESTs	Seqüências expressas
HREs	Elementos responsivos ao hormônio
IMC	Índice de massa corpórea
LU	Leiomioma uterino
QR ou RQ	Quantificação relativa (2^{-DDCt})

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Leiomiomas Uterinos.....	14
1.2. Alterações genômicas em Leiomiomas Uterinos.....	20
1.3. Genes.....	21
1.3.1. <i>AHR</i>	21
1.3.2. Receptores de Estrógeno (<i>ERs</i>) e Progesterona (<i>PGR</i>).....	24
1.3.3. <i>WNT7A</i>	29
2. Objetivos.....	31
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Casuística.....	32
3.2. Isolamento do RNA total e síntese de cDNA.....	34
3.3. RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	35
3.4. Análise Estatística.....	37
4. Resultados.....	38
4.1. Avaliação do perfil de expressão dos genes <i>AHR</i> , <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>PGR</i> e <i>WNT7A</i>	39
4.2. Caracterização do padrão de amplificação das amostras de Leiomiomas Uterinos.....	44
4.3. Correlação entre as características clínica-patológicas e o perfil de expressão dos genes <i>AHR</i> , <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>PGR</i> e <i>WNT7A</i>	49
5. Discussão.....	56
6. Conclusão.....	71
7. Referências Bibliográficas.....	72

Introdução

Introdução

Leiomiomas uterinos (LU) são neoplasias benignas originárias de células musculares lisas do miométrio enriquecidas em matriz extracelular (MEC) contendo colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Stewart, 2001; Walker e Stewart, 2005; Parker, 2007). Esses tumores também são conhecidos como miomas, fibróide uterino, fibromas ou fibromiomas devido a sua firmeza, caráter fibroso e alto conteúdo de fibras de colágeno (Canevari e Rogatto, 2006).

Esses tumores constituem a neoplasia benigna mais comum do aparelho reprodutor feminino, acometendo de 20% a 30% das mulheres acima de 30 anos de idade, sendo a principal indicação para histerectomia (Buttram e Reiter, 1981; Cramer e Patel, 1990).

Os leiomiomas uterinos desenvolvem-se de ninhos microscópicos de células lisas uterinas, sendo compostos de várias cópias da mesma ou de poucas células, processo esse denominado expansão monoclonal. Frequentemente são encontrados tumores múltiplos no mesmo útero, sendo cada tumor clonalmente distinto entre si (Townsend et al., 1970; Hashimoto et al., 1995; Kjerulff et al., 1996; Viswanathan et al., 2007).

Os leiomiomas uterinos são frequentemente diagnosticados na fase reprodutiva, após a menarca e anteriormente à menopausa, (Ross et al, 1986; Cramer e Patel, 1990; Fields and Neinstein, 1996), apresentando-se raramente em adolescentes e mulheres pós-menopáusicas (Lawrence et al., 1991; Fields e Neinstein, 1996; Bekker et al., 2004; Strissel et al., 2007; Diesen et al., 2008) caracterizando a dependência hormonal na etiologia desses tumores.

Esse tumor benigno pode se localizar no corpo uterino ou no colo uterino, podendo ser assintomático ou apresentar manifestações clínicas, sendo a principal indicação para histerectomia (Carlson et al., 1994; Kjerulff et al., 1996; Coronado et al., 2000; Bozzini, 2004).

A classificação desses tumores é determinada pela sua posição anatomopatológica no útero em quatro diferentes tipos: submucoso (abaixo da mucosa uterina), imediatamente adjacente à

cavidade uterina; intramural, totalmente dentro da parede uterina; subseroso (abaixo da serosa), distorcendo o contorno da superfície externa do útero; e peduncular, o qual se encontra anexado ao útero por um pêndulo (Cotran et al., 1989; Viswanathan et al., 2007).

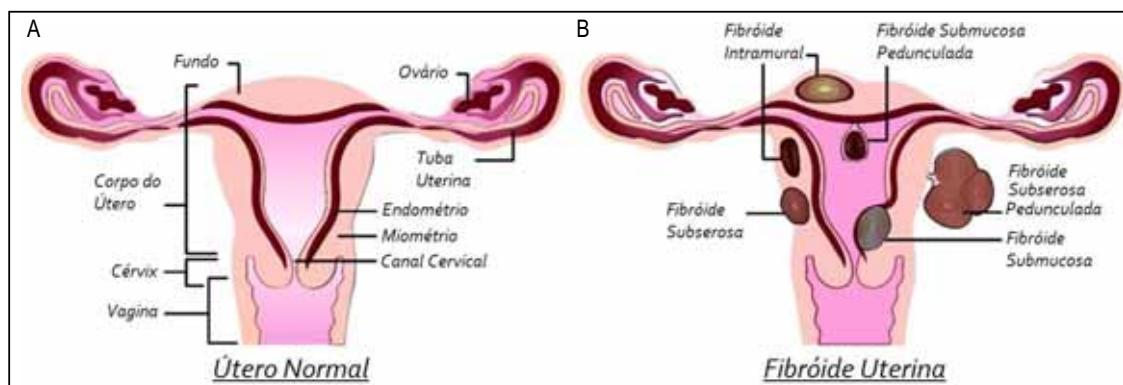


Figura 1. Alteração anatomopatológica no útero em seu processo fibróide. A. Útero Normal e seus componentes; B. Fibróide uterino em suas diversas aparições, podendo ser subserosa, submucosa, intramural e/ou peduncular subseroso ou submucoso (Adaptado do website *National Uterine Fibroids Foundation*).

O tipo mais comum dentre esses tumores, os leiomiomas intramurais, estão localizados no miométrio e resultam em um aumento irregular do fundo do útero. Como esses tumores aumentam em tamanho, eles podem se expandir na cavidade abdominal, através da superfície do útero, tornando-se subserosos, que por sua vez estão situados exatamente sob a camada serosa. Em contraste, os tumores submucosos estão localizados dentro da cavidade uterina e ficam situados abaixo do endométrio (Cotran et al., 1989).

Embora os fatores iniciais que levam ao desenvolvimento dos miomas não estar claro, há evidências mostrando que os esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, são importantes fatores para o crescimento tumoral (Stewart et al., 1994; Rein et al., 1995; Schwartz, 2001; Cook e Walker, 2004; Wallach e Vlahos, 2004). Esses tumores exibem um crescimento máximo durante a vida reprodutiva feminina quando a secreção de estrógeno é máxima, mostrando um declínio na menopausa e sob outras condições hipoestrogênicas. Outra evidência que suporta a dependência estrogênica dos LU é os níveis elevados de receptores de estrógeno e progesterona encontrados no

miométrio adjacente (Brandon et al., 1995; Viville et al., 1997; Al-Hendy et al., 2004; Canevari e Rogatto, 2006).

Evidências experimentais têm mostrado que o estrógeno e a progesterona são hormônios esteróides associados diretamente com o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos (Buttram e Reiter, 1981; Kawaguchi et al., 1985; Al-Hendy e Salama, 2006). Porém, estudos recentes revelam que não somente os hormônios sexuais, mas também produtos gênicos relacionados com outras vias de sinalização, podendo ou não ser ativadas por hormônios sexuais através dos receptores nucleares de esteróides, estão associados com o desenvolvimento do LU (Catherino e Malik, 2007; Chen et al., 2008). Colágeno tipo I e tipo III são abundantes, mas as fibras de colágeno são anormalmente formadas e desorganizadas, semelhante ao colágeno encontrado na formação dos quelóides (Ferenczy et al., 1971; Kawaguchi et al., 1989; Stewart et al., 1994).

Os LU geralmente são assintomáticos e somente as pacientes que apresentam alterações clínicas como sangramento uterino anormal, dores abdominais, infertilidade, aborto espontâneo, perdas prematuras e disfunção urinária são submetidas à cirurgia (Quade, 1995; Coronado et al, 2000). A incidência e a severidade desses sintomas variam em relação ao tamanho, número e a localização do tumor. Sua importância clínica é dada pela necessidade de intervenção cirúrgica. Ainda não está claro porque alguns LU tornam-se gigantes enquanto outros permanecem pequenos, considerando a presença similar de níveis de hormônios sexuais. A diferença no tamanho tumoral pode ser o resultado de outras alterações moleculares em adição ao perfil dos hormônios esteróides sexuais (Hennig et al, 1999; Kohama et al, 2000; Stovall, 2001).

Esta neoplasia, embora benigna, é considerada um importante problema de saúde pública. Não existem dados sobre a incidência de LU no Brasil, mas grande parte da indicação para histerectomia, considerada a segunda cirurgia mais freqüente entre mulheres em idade reprodutiva, é realizada principalmente devido a enfermidades benignas, incluindo leiomiomas uterinos (DataSUS, 1999). Apesar do impacto na saúde pública e de sua incidência extremamente alta, a etiologia e a

patogênese dos LU não são totalmente conhecidas. Cramer e Patel (1990) descreveram que, de 100 mulheres consecutivas que sofreram histerectomia, em 77% delas foram encontrados leiomiomas uterinos, dos quais 84% eram múltiplos. A incidência de leiomiomas em mulheres pós-menopáusicas não foi menor que a incidência em mulheres pré-menopáusicas, embora os leiomiomas pós-menopáusicos eram menores e em menor quantidade. Estudos epidemiológicos têm identificado muitos fatores de risco associados ao desenvolvimento destes tumores, incluindo idade jovem (35-54 anos), obesidade, mulheres da raça africana, menarca em idade precoce, gravidez tardia, nuliparidade ou número de paridades baixo, história familiar e o uso de hormônios exógenos, como contraceptivos e terapia de reposição hormonal (Houston et al, 2001; Schwartz, 2001; Canevari e Rogatto, 2006).

Além disso, anormalidades genéticas associadas ao desenvolvimento e à patogênese desta neoplasia têm sido sugeridas por uma grande variedade de estudos citogenéticos, moleculares e epidemiológicos (Ligon e Morton, 2000; Canevari et al., 2005a; Stewart e Morton, 2006; Rosa et al., 2008).

Os hormônios esteróides sexuais, estrógeno e progesterona, desempenham um importante papel em leiomiomas uterinos. Esses hormônios agem em conjunto para regular a frequência de mitoses em células do miométrio e assim podem influenciar a suscetibilidade das células a adquirir alterações genéticas (Barbieri e Andersen, 1992; Swartz et al., 2005). A resposta dos LU ao estrógeno é bem estabelecida, contudo, o impacto de sua ação e sua contribuição para o desenvolvimento destes tumores ainda é desconhecido (Houston et al., 2001). Embora o estrógeno seja tradicionalmente identificado como única influência patológica para LU, uma hipótese alternativa aponta a progesterona como esteróide influente dominante (Walker e Stewart, 2005). A “hipótese da progesterona” (Rein et al., 1995) é suportada pelo aumento da taxa mitótica em LU durante a fase secretória, quando existem picos nos níveis de progesterona (Kawaguchi et al., 1989) e por dados clínicos indicando que as progestinas inibem o efeito terapêutico de agonistas de GnRH. Contudo, pelo menos em leiomiomas

uterinos de mulheres pós-menopáusicas, a expressão do gene *PGR* foi maior no miométrio normal do que nas amostras de LU (Strissel et al., 2007).

Embora durante os anos reprodutivos o miométrio seja ciclicamente exposto a níveis hormonais relativamente altos, a maioria das mulheres não desenvolve LU. Estes dados sugerem que é pouco provável que o estrógeno e a progesterona atuem como os únicos fatores responsáveis pela gênese destes tumores. Evidências indicam que além dos hormônios esteróides ovarianos (Rein e Nowak, 1992; Maruo et al., 2004), fatores de crescimento também são cruciais para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Swartz et al. (2005) usando experimentos de *cDNA microarray*, descreveram que os genes da via IGFI estrógeno-dependente apresentaram expressão aumentada em células em cultura de leiomiomas uterinos. Outros fatores de crescimento foram relatados como envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos LU, entre eles o mais intensamente estudado é o *TGF- β* (Sozen e Arici, 2002). Os fatores de crescimento estimulam a proliferação das células do estroma e a angiogênese tumoral. Kogan et al. (2005) propuseram o tratamento dos LU baseado na remoção das células tumorais especialmente as variantes mitoticamente ativas que produzem fatores de crescimento capazes de estimular o crescimento tumoral por meio de mecanismos autócrinos. Também foi relatada em células de leiomiomas a expressão aumentada de genes da via de sinalização Wnt, entre eles o gene *Wnt5b* (Mangioni et al., 2005). Dados recentemente obtidos a partir de análises de *cDNA microarrays* demonstraram que não somente os esteróides, mas fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e sinalização do ácido retinóico estão associados ao desenvolvimento dos LU (Di Lieto et al., 2005; Leppert et al., 2006; Catherino e Malik, 2007; Chen et al., 2008). A figura 2 apresenta os principais fatores associados à formação dos leiomiomas uterinos segundo Walker e Stewart (2005).

Além destes fatores, um estudo relatou que o consumo de tabaco estava relacionado negativamente ao desenvolvimento de LU (Moorehead e Conard, 2001). Posteriormente, Wise et al. (2004) relataram dados concordantes aos de Moorehead e Conard (2001), exceto para a associação

com o uso de álcool, no qual as mulheres mostraram risco aumentado de desenvolvimento de leiomiomas uterinos.

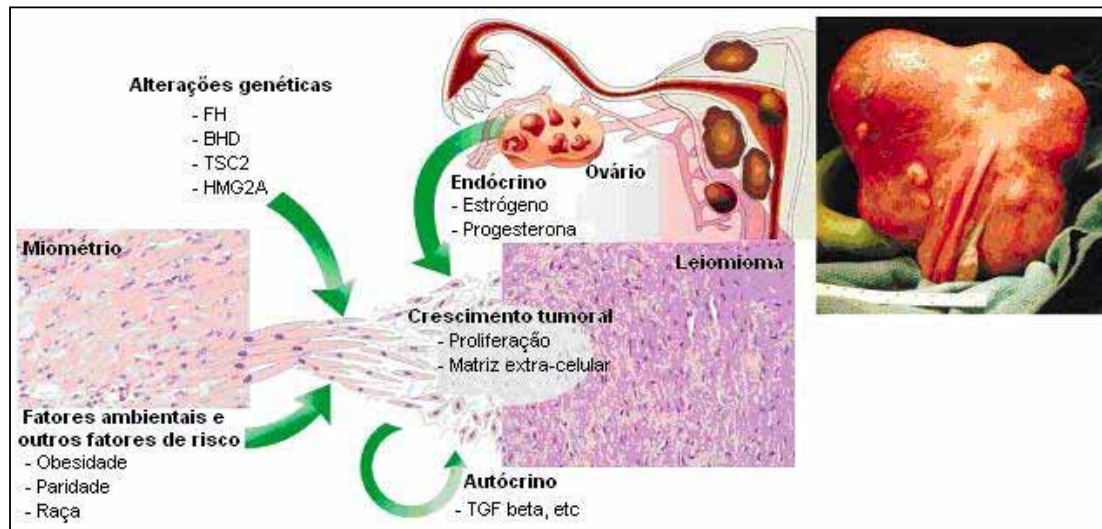


Figura 2. Etiologia dos leiomiomas uterinos. Alterações hereditárias e somáticas em genes críticos contribuem para o desenvolvimento de LU juntamente com os fatores de risco, como obesidade, paridade e raça. Estas modificações contribuem para o crescimento tumoral. A produção de matriz extracelular é promovida por fatores de crescimento endócrinos e autócrinos (Adaptado de Walker e Stewart, 2005).

Alterações genômicas em Leiomiomas Uterinos

Existem quatro investigações em literatura que utilizaram CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) cromossômica em amostras de LU, incluindo um estudo de nosso grupo. Packenham et al. (1997) analisaram 14 casos de LU e dois casos apresentaram alterações genéticas incluindo ganhos nos cromossomos 14 (q11.1-q21 e q24-qter) e 19 (p12-pter e q12-13.1) e perdas dos cromossomos 1 e 4. Posteriormente, Rikala et al. (1998) relataram cariótipos normais em cinco amostras de LU. Levy et al. (2000) relataram em 12 amostras de LU, ganhos em 9q43 e no cromossomo 19 e perdas em 7q e 12q. Nosso grupo encontrou uma proporção significativa de tumores com alterações cromossômicas (82%) e uma frequência significativa de perdas cromossômicas não relatadas anteriormente incluindo as regiões 3q26.29, 7p22.15, 11p15, 11q23.25 e 15q25.26 (Canevari et al., 2005b; Canevari e Rogatto, 2006). Esses dados foram validados usando análises de perda de heterozigose e marcadores polimórficos confirmando o envolvimento destas regiões no desenvolvimento de LU (Canevari et al., 2005a).

Os dados obtidos por estudos de citogenética molecular, incluindo CGH cromossômico, permitem uma visão geral das alterações cromossômicas que podem estar envolvidas com a etiologia e desenvolvimento dos LU, porém é necessária a validação dessas regiões por estudos moleculares mais refinados tais como genotipagem, FISH, imuno-histoquímica ou análise de expressão gênica quantitativa.

O Gene *AHR* (*aryl hydrocarbon receptor*)

Esse gene mapeado em 7p15, codifica um fator de transcrição ligante-ativo envolvido na regulação de respostas biológicas. Esse receptor atua possivelmente na regulação de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, tais como o citocromo P450. Seu ligante inclui uma variedade de hidrocarbonetos aromáticos (*RefSeq* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – *GeneID*: 196).

As perdas de regiões do braço longo do cromossomo 7 constituem um dos rearranjos clonais mais comuns em leiomiomas uterinos. Rogatto et al. (2003) relataram perdas em quatro casos no braço curto do cromossomo 7, mais precisamente em 7p15-p21 usando hibridação genômica comparativa (CGH). Os autores ressaltaram que os leiomiomas uterinos são cromossomicamente heterogêneos e que os perfis alterados indicam novas regiões genômicas que podem conter genes importantes para o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Baseado nestes achados, Canevari et al. (2005a) avaliaram, entre outros, a perda dos marcadores D7S517, D7S513, D7S507 e D7S493 (mapeados em 7p15-22) em 64 amostras de leiomiomas uterinos e detectaram perdas alélicas em aproximadamente 11% dos casos. Alguns tumores apresentaram perda em mais de um marcador avaliado. Estes achados forneceram indícios para a identificação de genes supressores tumorais nessa região associados a um subgrupo de leiomiomas uterinos.

As evidências acumuladas pelo mapeamento do cromossomo 7 (Hillier et al., 2003; Scherer et al., 2003), pelos estudos de perda de heterozigose (Ishwad et al., 1995; Ishwad et al., 1997; van der Heijden et al., 1998; Mao et al., 1999; Canevari et al., 2005a) e análise de *microarray* (Tsibris et al., 2002; Chegini et al., 2003; Skubitz e Skubitz, 2003; Wang et al., 2003; Hoffman et al., 2004; Quade et al., 2004; Arslan et al., 2005) não foram suficientes para a determinação do(s) gene(s) mapeado(s) no cromossomo 7 envolvido no desenvolvimento de LU.

Um gene candidato interessante é o gene *AHR*. Este gene está localizado em 7p15 e codifica o receptor da dioxina. A dioxina, um poluente ambiental, produz um amplo espectro de respostas tóxicas e bioquímicas de maneira específica para o tipo de tecido, sexo, idade e espécie (Poland e Knutson,

1982). Compostos relacionados afetam a proliferação e a diferenciação celular, promovem formação tumoral, disfunção endócrina, e agem como potentes tóxicos imunológicos, reprodutivos e do desenvolvimento. Esses compostos produzem os efeitos biológicos e tóxicos pela ligação com o *AHR*, cuja função normal ainda não foi completamente esclarecida e cujo ligante endógeno não foi ainda completamente identificado (Schmitd e Bradfield, 1996; Gasiewicz, 1997; Khorram et al., 2002).

O *AHR* se localiza no citoplasma como um complexo com as proteínas chaperonas HSP90, XAP2 e p23 (Petrulis e Perdew, 2002). O receptor se liga à xenobióticos como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) ou 3-metilcolantreno (3-MC) com alta afinidade, e então o complexo resultante se desloca para o núcleo, onde o AHR forma dímero com o ARNT (Brauze et al., 2006). O complexo resultante AHR/ARNT se liga a seqüências de DNA (reagentes à dioxina) em regiões regulatórias 5' de genes responsivos, modulando as taxas de transcrição de vários genes, incluindo aqueles que codificam enzimas metabolizadoras de drogas como *CYP1A1*, fatores reguladores do crescimento como o receptor *EGF*, o receptor de estrógeno, a interleucina-1 β , e os fatores transformantes do crescimento *TGF- α* e *TGF- β* (Schmitd e Bradfield, 1996; Gasiewicz, 1997). Esta ativação transcricional requer o recrutamento de complexos de co-ativadores, como o complexo da histona acetiltransferase p300.

Safe e Krishnan (1995) mostraram evidências indiretas de que o útero é um dos alvos da dioxina, que também inibe respostas induzidas pelo estrógeno incluindo ligações com os receptores de estrógeno e progesterona em útero de ratas. Ohtake et al. (2003) demonstraram que o heterodímero AHR/ARNT está associado diretamente com os receptores de estrógeno alfa e beta.

O gene *AHR* medeia ações relacionadas a esteróides sexuais tanto em situações fisiológicas quanto na toxicidade à dioxina. Em adição à regulação direta de genes alvos, o ligante ativado do AHR se associa com receptores de estrógeno e andrógeno (ESR1 ou AR, respectivamente) para regular a transcrição como uma unidade funcional. Uma vez que os ligantes endógenos e exógenos do AHR diferem em sua estrutura, não está claro se a regulação cruzada do ESR1/AR pela ativação do AHR é

uma função intrínseca do AHR ou o resultado de diferenças seletivas do tipo de ligante. Ohtake et al. (2008) relataram que a regulação cruzada do AHR com receptores hormonais sexuais é uma função intrínseca do AHR, garantindo a atividade uniforme desse gene independentemente das diferenças específicas do tipo de ligante.

As bases moleculares da inibição cruzada AHR/ ESR1 ainda não foram desvendadas e tem sido proposto ser devido a uma combinação de diferentes mecanismos incluindo o aumento da síntese de fatores inibitórios (Rogers e Denison, 2002), inibição direta através de XREs inibitórios localizados na região promotora de genes responsivos a estrógeno (Krishnan et al., 1994), silenciamento de co-fatores comuns (Kumar e Perdew, 1999; Kobayashi et al., 1997), aumento da degradação do receptor de estrógeno (Wormke et al., 2003) e metabolismo alterado de E2 (17 β -estradiol) (Baba et al., 2005; Matthews et al., 2007).

Wang et al (2003) demonstraram a diminuição nos níveis de expressão do gene *AHR* (*aryl hydrocarbon receptor*), dentre outros genes localizados nesta região, avaliando o perfil da expressão de 6800 genes em leiomiomas uterinos na fase proliferativa do ciclo menstrual pela metodologia de *microarray*.

Por estar associado com o receptor de estrógeno, e sendo o estrógeno um dos promotores do crescimento dos leiomiomas e o útero um provável alvo da dioxina, por esta região estar relatada em perdas genômicas detectadas por estudos prévios do grupo, o *AHR* constitui um gene candidato para a pesquisa em leiomiomas uterinos.

Receptores de Estrógeno (ERs) e Progesterona (PGR)

O estrógeno, um hormônio esteróide sexual, tem papel importante na regulação de diversos processos biológicos incluindo reprodução, diferenciação, desenvolvimento, proliferação celular, apoptose, inflamação, metabolismo, homeostase e função reprodutiva em homens e mulheres (Findlay et al., 2001; O'Donnell et al., 2001; Drummond et al., 2002; McEwen, 2002; Mendelsohn, 2002; Hewitt et al., 2005; Yager e Davidson, 2006). Os estrógenos também estão associados à etiologia de tumores mamários, endometriais e uterinos, além de diversas patologias como a osteoporose (Hewitt et al., 2005; Yager e Davidson, 2006).

A maioria dos efeitos dos estrógenos é mediada por receptores de estrógeno (ER), fatores de transcrição ligante-ativados e membro da família de receptores nucleares (NR – *nuclear receptor*) apresentando-se em duas formas, o receptor de estrógeno alfa (*ESR1/ER- α* , mapeado em 6q25.1) e o receptor de estrógeno beta (*ESR2/ER- β* , mapeado em 14q23.2) (Nilsson et al., 2001; Boverhof et al., 2008). As evidências acumuladas por diversos estudos apóiam o conceito de que o estrógeno está relacionado à tumorigênese e ao crescimento dos leiomiomas uterinos. *ESR1* e *ESR2* são receptores nucleares ligantes de hormônio esteróide pertencentes a uma família de fatores de transcrição ligantes ao DNA (Platet et al., 2004).

A proteína *ESR1* localiza-se no núcleo onde pode formar homodímeros ou heterodímeros com o receptor de estrógeno 2 (*ESR2*). Embora a interação de ligante seja um importante mecanismo de ativação de NR, os ERs também são ativados por hormônios de crescimento, quinases e outros receptores esteróides hormônios-ligados e fatores de transcrição (Riby et al., 2000; Kousteni et al., 2001). Os ERs regulam a expressão gênica de dois modos: via ligação direta dos EREs (elementos de resposta a estrógeno) ao DNA ou pela interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição (Paech et al., 1997; Saville et al., 2000; Matthews et al., 2007).

O estrógeno e seus receptores são essenciais para o desenvolvimento sexual e a função reprodutiva, mas também possui um importante papel em outros tecidos, tal como osso. Mecanismos

de *splicing* alternativos utilizando promotores diferentes resultam em variantes transcricionais, as quais diferem na posição 5' UTRs e (RefSeq – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – GeneID: 2099). O ESR2 está localizado no núcleo, citoplasma e mitocôndrias e liga-se ao 17 β -estradiol ou demais ligantes relacionados. A proteína codificada forma homodímeros ou heterodímeros que interagem com seqüências de DNA específicas para ativar a transcrição. Algumas isoformas dominantes inibem a ação de outros membros da família dos receptores de estrógeno (RefSeq – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – GeneID: 2100).

O ESR1 e ESR2 são codificados por diferentes genes e sua proteína possui três domínios funcionais principais em comum. O domínio N terminal A/B que contém a função de transativação independente do ligante-1 (sítio AF-1) e exibe 18% de similaridade entre o ESR1 e o ESR2 humano (Enmark et al., 1997). AF-1 é a região do sítio específico de fosforilação pela via da proteína quinase ativada por mitose (MAPK) em resposta a fatores de crescimento e pela ciclina A2-CDK2 (Ali et al., 1993; Joel et al., 1998; Rogatsky et al., 1999). Os dois receptores de estrógeno, ESR1 e ESR2, compartilham 97% de homologia em seus domínios central de ligação ao DNA (*DBD – DNA binding domain*) e reconhecem o mesmo elemento responsivo a estrógeno (ERE) no DNA genômico mas, há apenas 59% de homologia no seu domínio de ligação ao ligante (*LBD – ligant-binding domains*), que contém a função de ativação-2 (sítio AF-2), podendo existir algum grau de seletividade do ligante ao receptor (Enmark et al., 1997; Tremblay et al., 1997; Sakaguchi et al., 2002; Jacob et al., 2006). Essa região mostra mudanças conformacionais distintas dependendo do tipo do ligante (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999).

ESR1 e ESR2 diferem significativamente na sua distribuição tecidual e nas características de ligação ao ligante, a razão principal para a ação seletiva tecidual dos estrógenos (Nilsson e Gustafsson, 2000). Com a união ao ligante ocorre então uma indução de mudanças conformacionais no receptor, promovendo a homodimerização e ligação do receptor a elementos responsivos ao estrógeno (ERE) específicos na região promotora do gene alvo. O complexo do receptor ligado ao DNA interage com o

aparato basal de transcrição facilitando a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição, tanto aumentando quanto diminuindo a transcrição do gene alvo, dependendo do contexto do promotor (Hall e Korach, 2002).

Os receptores de estrógeno também podem modular a expressão de genes sem estarem ligados diretamente ao DNA por meio da interação com outro promotor ligante de proteínas (Jakacka et al., 2001) ou prevenindo o recrutamento de outros fatores de transcrição ao promotor (Galien e Garcia, 1997). Foi sugerido que a taxa do *ESR1*/*ESR2* é um balanço dinâmico entre os sinais de promoção e inibição do crescimento dentro das células (Gustafsson e Warner, 2000).

A transcrição e o processamento do mRNA do *ESR1* humano é complexa, com pelo menos 7 promotores diferentes utilizados de forma específica em células de diferentes tecidos (Townson e O'Connell, 2006). O gene *ESR1* possui 140 Kb e inclui 8 éxons que codificam um mRNA tipo selvagem de 6,3 Kb (Reid et al., 2002). A maioria das variantes do *ESR1* difere na sua região 5' não traduzida apesar de codificarem uma proteína comum de 66-kDa. Os éxons 1 e parte do 2 codificam o domínio N terminal AF-1; os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação ao DNA; e os éxons 4 a 8, o domínio de ligação ao ligante e o AF-2. Uma gama de variantes de mRNA são resultados de *splicing* alternativos gerados a partir de um mecanismo de exclusão de éxons que mantém a mesma matriz de leitura (Ferro et al., 2003). Até então 20 variantes do *ESR1* foram identificadas e a caracterização de cada isoforma contribui para o entendimento da biologia do *ESR1* (Townson e O'Connell, 2006).

A descoberta da isoforma *ESR2* (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996) levou os pesquisadores a reavaliarem o modelo da ação do estrógeno. O *ESR2*, assim como o *ESR1*, é um fator de transcrição induzido por um ligante, que modula a expressão de genes-alvo específicos. A afinidade de ligação do *ESR2* pelo estrógeno é semelhante àquela do *ESR1*, mas ao contrário deste, anti-estrógenos podem se ligar ao *ESR2* e ativar a transcrição pela via não clássica de sinalização do ER, ligando-se a fatores transcricionais ativadores da proteína 1 (Paech et al., 1997). Estes achados

levaram os investigadores a especular o papel do *ESR2* na progressão de cânceres hormônio-dependentes e no desenvolvimento da resistência anti-estrogênica.

O gene *PGR*, mapeado em 11q22-q23, codifica uma proteína esteróide media os efeitos fisiológicos da progesterona e possui um papel na reprodução central associada com o estabelecimento e com a manutenção da gravidez. Esse gene utiliza dois promotores distintos e sítios de início tradução no primeiro éxon para produzir duas isoformas diferentes, A e B. As duas isoformas são idênticas exceto pelo aminoácido adicional 165 encontrado somente no domínio N-terminal da isoforma A, o qual media sua própria resposta gênica e os efeitos fisiológicos com uma pequena sobreposição. A localização da região iniciadora da transcrição para a isoforma B ainda não foi claramente determinada (*RefSeq* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – *GeneID*: 5241).

A proteína PGR é dependente de estrógeno, isto é, ela é sintetizada devido à estimulação de células-alvo com estrógeno (Surowiak et al., 2001; Zaslowski et al., 2005). Tumores de mama ESR1 negativos e PGR positivos estão associados com prognóstico desfavorável (Keshgegian e Cnaan, 1996). A detecção de aumento de expressão do *PGR* em tumores funciona como um indicador funcional de que a via do *ER* está intacta, mesmo se o tumor for ESR1 negativo (Esteva e Hortobagyi, 2004). Na ausência de hormônios, ambos, PGR e ESR1, estão inativamente ligados a um complexo extenso de proteínas *heat shock* dentro do citoplasma de suas células alvo. A ligação do hormônio resulta na dissociação destas proteínas *heat shock*, permitindo a dimerização do receptor e sua subsequente ligação aos elementos responsivos ao hormônio (HRE), que são seqüências conservadas de 13pb localizadas em regiões promotoras de genes-alvo regulados por hormônio (Beato, 1989). Uma vez ligado ao HRE, os receptores atuam como fatores de transcrição pela interação com a maquinaria geral de transcrição (Ing et al., 1992) ou pelo recrutamento de fatores de transcrição para a região promotora (Klinge, 2000).

O papel dos hormônios esteróides, estrógeno e progesterona, no desenvolvimento de tumores ainda não foi completamente elucidado. Há alguns anos, os estrógenos eram considerados os

principais promotores do crescimento em leiomiomas uterinos. Recentemente, tem sido aceita a idéia de que tanto o estrógeno quanto a progesterona desempenham um papel no crescimento destes tumores (Kuiper et al., 1996; Regidor et al., 1995). Também foi demonstrado que os leiomiomas são sensíveis a diferentes estrógenos ambientais (Walker, 2002). O receptor de estrógeno α parece ser predominante no útero sendo a maioria dos efeitos do estrógeno nesse órgão atribuída ao *ESR1* (Weihua et al., 2000). Por esta razão, esse receptor constitui um excelente alvo para a pesquisa em leiomiomas uterinos, assim como sua interação com os demais receptores de hormônios esteróides, *ESR2* e *PGR*.

O Gene *WNT7A*

O gene *WNT7A* é um membro da família gênica altamente conservada WNT, relacionados de forma estrutural que codificam proteínas de sinalização. Essas proteínas podem estar envolvidas na oncogênese e em diversos processos de desenvolvimento, incluindo regulação da apoptose celular e o modelamento durante a embriogênese. Esse gene está envolvido no desenvolvimento do eixo antero-posterior do trato reprodutor feminino, e também possui um papel crítico na organização da musculatura lisa uterina e manutenção das funções uterinas adultas. Mutações nesses genes estão associadas com as síndromes de Fuhrmann e Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia. (RefSeq – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – GeneID: 7476).

Um dos membros da superfamília do WNT é o gene *WNT7A*, localizado em 3p25, o qual atua principalmente na embriogênese, proliferação e diferenciação celular, e comunicação epitélio-mesênquima. Além de possuir papel fundamental na organização da musculatura lisa uterina e na manutenção de sua função em adultos, a expressão do gene *WNT7A* é um pré-requisito para o desenvolvimento normal do miométrio (Miller e Sassoon, 1998; Parr e McMahon, 1998; Sassoon, 1999).

Em ratos, a diminuição da expressão do *WNT7A* resultou em diversas anormalidades do trato reprodutor feminino. As glândulas uterinas se tornam escassas e o epitélio estratificado comparados com a citoarquitetura normal das fêmeas selvagens. Em adição, um crescimento exacerbado e pouco diferenciado do miométrio foi observado em ratas com ausência de *WNT7A* (*knock-out*) (Miller e Sassoon, 1998). Embora o meio pelo qual o estrógeno media a expressão do *WNT7A* não estar claro, há relatos mostrando que *WNT7A* é suprimido pelos estrógenos (Li et al., 2001), sendo esse gene responsivo a mudanças nos níveis de hormônios esteróides no trato reprodutor feminino (Miller e Sassoon, 1998; Miller et al., 1998; Bui et al., 1997).

A linhagem celular de adenocarcinoma endometrial Ishikawa, o DES (dietil-etil-bestrol – hormônio sintético largamente utilizado nos anos 40 a 70 para prevenir abortos) reduziu a expressão do

WNT7A (Wagner e Lehman, 2006). Uma redução similar foi descrita para a expressão do *WNT7A* no epitélio endometrial de ratos neonatos expostos ao DES (Miller et al., 1998). O útero dos ratos neonatos só é suscetível ao efeito do DES por poucos dias, contudo, as alterações na arquitetura uterina são irreversíveis, mesmo que não seja observada diferença na expressão do *WNT7A* posteriormente (Miller et al., 1998). Em concordância com estudos em ratos (Couse et al., 2001), os receptores de estrógeno também exercem um papel fundamental na regulação do *WNT7A* em células humanas. Uma vez que a manutenção da expressão do *WNT7A* durante o desenvolvimento do trato reprodutor feminino é crucial para sua correta arquitetura e função na vida adulta (Mericskay et al., 2005), a interferência do ER na expressão dos genes *WNT* pode ser um novo mecanismo pelo qual os estrógenos alteram sua função em LU.

Objetivos

Objetivos

O objetivo principal do presente estudo é avaliar a expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* por RT-PCR quantitativa em tempo real e associar estes achados aos dados clínico-patológicos das pacientes portadoras de leiomiomas uterinos;

A identificação de genes diferencialmente expressos em leiomiomas uterinos pode revelar potenciais alvos terapêuticos para essa neoplasia que representa um importante problema de saúde pública.

Material e Métodos

Material e Métodos

Casuística

Cinquenta e oito amostras de leiomiomas uterinos e cinco amostras de miométrio normal foram utilizadas neste estudo. As amostras controle foram coletadas de mulheres que apresentavam ciclos menstruais regulares. Dentre os controles, foram coletadas amostras de miométrio normal de duas mulheres saudáveis sem diagnóstico de leiomioma ou outras lesões proliferativas (ovariana, mamária, uterina, endometriose ou adenomiose) e sem história familiar de LU, sendo uma amostra coletada na fase proliferativa e uma na secretora. Essas pacientes foram submetidas a procedimento laparoscópico por outras condições ginecológicas, incluindo salpingectomia como procedimento de contracepção ou histerectomia vaginal por prolapso uterino. As amostras controle restantes foram coletadas de miométrio normal adjacente aos leiomiomas de três pacientes, sendo que duas amostras foram coletadas na fase secretora e uma na fase proliferativa. Todas as pacientes de LU foram submetidas à cirurgia de histerectomia total ou parcial no Departamento de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – SP, sob a supervisão da Dra. Anaglória Pontes.

As pacientes envolvidas no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido sendo esse procedimento devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, UNESP-Botucatu (Registro CEP nº. 1365/2003). Trata-se de um estudo retrospectivo de amostras do Banco de Tumores do NeoGene Laboratório, FMB-Botucatu, sob a responsabilidade da Dra Silvia R. Rogatto.

O grupo amostral possui características heterogêneas com relação aos dados clínico-patológicos, os quais incluem: idade, idade da menarca, raça, índice de massa corpórea (IMC), idade da 1ª gravidez, paridade e a fase do ciclo menstrual, assim como a localização anatomo-patológica dos tumores e a história familiar de câncer e ou leiomioma uterino (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição clínica das 58 pacientes de leiomiomas uterinos e amostras normais submetidas a esse estudo.

Variável	Leiomioma Uterino n (mediana) – %	Controles Miométrio Normal
Idade *		
≤46 anos	32 (35 – 46) – 55,17%	4 (36 – 46) – 80%
>46 anos	26 (47 – 54) – 44,83%	1 (49) – 20%
Fase		
Proliferativa	15 – 25,86%	2 – 40%
Secretória	24 – 41,38%	3 – 60%
Menopausa	8 – 13,79%	–
NI	11 – 18,97%	–
Tipo de Leiomioma		
Subseroso	3 – 5,17%	–
Submucoso	6 – 10,35%	–
Intramural	18 – 31,03%	–
Misto	26 – 44,83%	–
Gigante	5 – 8,62%	–
Raça		
Branca	49 – 84,49%	5 – 100%
Não-branca	8 – 13,79%	–
NI	1 – 1,72%	–
Idade Menarca *		
≤12	27 (9 – 12) – 46,55%	3 (9 – 12) – 60%
>12	28 (13 – 16) – 48,28%	2 (13 – 15) – 40%
NI	3 – 5,17%	–
Idade 1ª gravidez *		
≤22	17 (17 – 22) – 29,31%	2 (17 – 21) – 40%
>22	16 (22 – 42) – 27,59%	1 (23) – 20%
NI	25 – 43,10%	2 – 40%
Paridade *		
0	3 (0) – 5,17%	–
<3	23 (1 – 2) – 39,66%	2 (1 – 2) – 40%
≥3	31 (3 – 10) – 53,45%	3 (3 – 10) – 60%
NI	1 – 1,72%	–
IMC *		
≤25	23 (18,7 – 24,9) – 39,66%	2 (21,8 – 23,6) – 40%
>25	35 (25,4 – 36,8) – 60,34%	3 (28,8 – 29,9) – 60%
Abortos		
Não	34 (0) – 58,62%	5 (0) – 100%
Sim	20 (1 – 4) – 34,48%	–
NI	4 – 6,90%	–
História Familiar		
Leiomioma Uterino	6 – 10,35%	–
Outros (câncer)	21 – 36,20%	2 – 40%
Não	31 – 53,45%	3 – 60%

NI = Não Informado; * = Valores obtidos a partir da mediana dos dados clínico-patológicos apresentados.

Todos os dados clínicos foram obtidos após consulta em prontuários médicos ou entrevista com a paciente realizada pela Dra Anagloria Pontes. Todos os casos foram re-avaliados histopatologicamente pela Dra Maria Aparecida Custódio Domingues.

Isolamento do RNA total e transcrição reversa

O RNA total foi extraído, a partir de amostras de tecido congelado em nitrogênio líquido e pulverizado utilizando o *Rneasy total RNA Isolation mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram estocadas em água destilada livre de RNase e tratada com DEPC, a -70°C.

A quantificação das amostras de RNA foram avaliadas nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm utilizando o *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)*. A qualidade do RNA das amostras extraídas foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta.

Um micrograma de RNA foi utilizado para a produção de cDNA. Para evitar contaminação da reação com DNA, as amostras foram digeridas com uma unidade de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* por 15 min em temperatura ambiente. Esta enzima foi inativada com 25 mM de EDTA pH 8.0 a 70°C por 10 min. As reações foram realizadas no termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA). O RNA foi transcrito em um volume final de 20 µL contendo 10 mM de cada dNTP, 0.5 µg/µL de Oligo (dT)18, 100 ng/µL de Random Primers, 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0.1 M ditioneitol (DTT) e 200 unidades da transcriptase reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 90 min e a enzima foi inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -70°C. A figura 3 apresenta as principais etapas realizadas até a obtenção de cDNA.

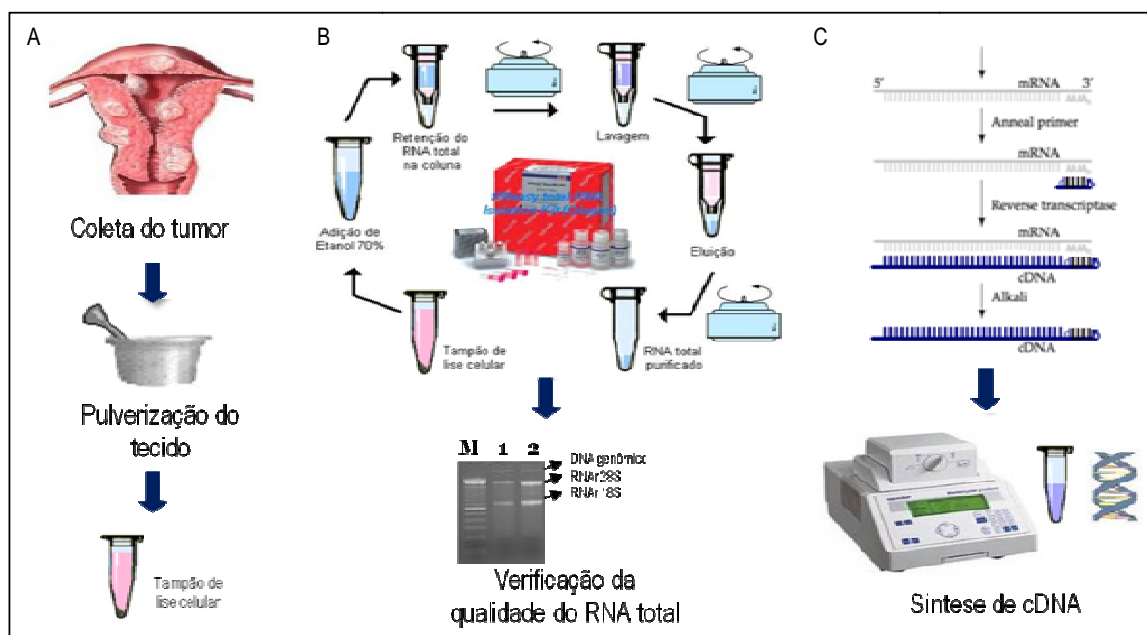


Figura 3. Coleta e processamento das amostras (A), seguida pela extração do RNA total (B) e a síntese de cDNA (C).

RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A amplificação das amostras de cDNA por RT-PCR em tempo real foi realizada no *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os iniciadores dos genes *AHR*, *ESR1* e *WNT7A*, *GAPDH* e *HPRT* foram desenhados utilizando os softwares *Primer Express* (v2.0; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para os genes *AHR* e *ESR1*, foi utilizado como endógeno o *GAPDH*, e para o gene *WNT7A*, o endógeno *HPRT*, ambos numa concentração final de 10 μ M (Tabela 2).

Os iniciadores para a amplificação dos genes *ESR2* e *PGR*, assim como seu gene endógeno β -actina, foram sintetizados de acordo com o sistema *TaqMan Gene Expression Assay*® (Applied Biosystems). Os produtos dos genes foram quantificados pelo sistema *TaqMan*® (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μ l, segundo normas do fabricante. Estes genes foram analisados como parte de outro projeto do grupo.

As PCRs foram realizadas utilizando *Platinum SYBR Green I*® (Invitrogen) para os genes *AHR* e *ESR1* e, para o gene *WNT7A*, o reagente *Power SYBR Green I* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em um volume final de 10µL, seguindo as instruções do fabricante.

A eficiência da reação foi calculada pelas curvas-padrão relativas de cada gene alvo, usando diluições seriadas de um *pool* de cDNA de amostras de leiomiomas e miométrios normais (100, 20, 4, 0,8 e 0,16ng/uL). As curvas-padrão dos genes alvo e referência mostraram resultados semelhantes de eficiência (> 90%).

Tabela 2. Iniciadores e condições de reação utilizados para RT-PCR quantitativa em tempo real para os genes analisados.

Gene	Seqüência dos Iniciadores	Condições de reação
<i>AHR</i>	F - 5' TGCACGAGAGGCTCAGGTTA 3' R - 5' CCGGAAACTATCATGCCACTT 3'	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 60°C-1 min (40x)
<i>ESR1</i>	F - 5' ATCCTGATGATTGGTCTCGTCT 3' R - 5' GGATATGGTTCCTTCTCTCCAGA 3'	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 62°C-1 min (40x)
<i>WNT7A</i>	F - 5' GCCCGGACTCTCATGAACTTG 3' R - 5' GCACTTACATTCCAGCTTCATGTTCT 3'	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 62°C-1 min (45x)
<i>ESR2</i>	<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> ®	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 60°C-1 min (45x)
<i>PGR</i>	<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> ®	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 60°C-1 min (45x)
<i>GAPDH</i>	F - 5' CGTCTTCAACCACATGGAGA 3' R - 5' CGGCCATCACGCCACAGTTT 3'	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 60°C-1 min (40x)
<i>HPRT</i>	F - 5' TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG 3' R - 5' GGCCTCCCCTCTCCTTCATC 3'	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 62°C-1 min (45x)
<i>β-actina</i>	<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> ®	50°C-2 min; 95°C-10min; 95°C-15seg e 60°C-1 min (45x)

F = Forward; R = Reverse.

A quantificação relativa foi calculada pelo método do DD_{Ct}, sendo a razão entre o valor médio do gene alvo e o valor médio do gene referência (*GAPDH* ou *HPRT*) em cada amostra, controlada pelas amostras de miométrio normal. A quantidade relativa (QR) do produto gerado pela qRT-PCR para cada conjunto de iniciadores foi determinada com base no valor de Ct (*cycle threshold*). A

quantificação relativa (QR) foi calculada pela fórmula 2^{-DDCt} (Livak e Schmittgen, 2001). A expressão aumentada foi definida como o valor médio entre a razão gene alvo/referência, com $QR \geq 2.00$ e expressão diminuída, $QR < 0.50$.

Análise Estatística

A correlação entre os níveis de expressão dos genes-alvo foi avaliada utilizando o teste de correlação de *Spearman*. O nível de expressão dos genes-alvo foi comparada a características clínico-patológicas por testes não-paramétricos, como o teste de *Mann-Whitney* para duas categorias, e o teste de *Kruskal-Wallis* para três categorias. Resultados estatisticamente significativos foram considerados quando $P \leq 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas no software *Prism GraphPad 3.0*.

Resultados

Resultados

As amostras controles de leiomiomas uterinos 632N e 641N são as amostras de miométrio normal obtidas de mulheres sem neoplasia e as amostras 614N, 634N e 642N são miométrios normais adjacente aos LU das pacientes submetidas a procedimentos cirúrgicos.

Os valores das quantificações relativas finais estão apresentados na Tabela 3 e foram obtidos por meio da média das amplificações das amostras normais em todas as placas analisadas. A partir desses valores foram calculadas as médias, os desvios padrão e o valor máximo e mínimo do QR, determinando o padrão de expressão das amostras de LU analisadas. Como mencionado anteriormente, os genes endógenos utilizados foram o *GAPDH* para os genes *AHR* e *ESR1*, o gene *HPRT* para o gene alvo *WNT7A* e a β -actina para os genes *ESR2* e *PGR*.

Tabela 3. Perfil de amplificação das amostras controles de LU para os três genes analisados *AHR*, *ESR1* e *WNT7A*, assim como a amplificação de seus endógenos *GAPDH* e *HPRT*.

Amostras	MCt <i>GAPDH</i>	MCt <i>HPRT</i>	MCt β -actina	MCt <i>AHR</i>	MCt <i>ESR1</i>	MCt <i>WNT7A</i>	MCt <i>ESR2</i>	MCt <i>PGR</i>	QR <i>AHR</i>	QR <i>ESR1</i>	QR <i>WNT7A</i>	QR <i>ESR2</i>	QR <i>PGR</i>
632N	20,53	23,56	22,57	25,70	26,24	34,18	34,35	28,34	1,11	1,14	0,53	2,33	0,92
641N	20,80	—	21,54	25,37	25,38	—	33,80	25,51	1,51	2,56	—	3,10	2,81
614N	19,14	23,36	22,27	23,63	24,51	34,50	36,87	28,08	1,78	1,47	0,37	0,45	0,87
634N	18,31	23,59	20,74	23,96	24,58	30,92	—	26,41	0,75	0,77	5,15	—	0,95
642N	20,18	—	22,05	25,94	27,46	—	35,16	28,04	0,67	0,41	—	1,07	0,76

MCt = Média do Ct (ciclo threshold); QR = Quantificação relativa; — = não utilizado nas análises.

As amostras de miométrio normal 641N e 642N não foram utilizadas para a análise do gene *WNT7A* pois o padrão de amplificação obtido foi significativamente diferente das demais amostras de miométrio normal, assim como a amostra 634N para o gene *ESR2*.

Avaliação do perfil de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A*

Foi observada a diminuição da expressão dos transcritos *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* em 60%, 43%, 52%, 60% e 40% dos casos de leiomiomas uterinos, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de expressão dos genes *incluídos neste estudo*.

Gene	Diminuição	Normal	Aumento
<i>AHR</i>	60,34% (35/58)	27,59% (16/58)	12,07% (7/58)
<i>ESR1</i>	42,86% (24/56)	19,64% (11/56)	37,50% (21/56)
<i>WNT7A</i>	52,08% (25/48)	25% (12/48)	22,92% (11/48)
<i>ESR2</i>	60,00% (33/55)	23,64% (13/55)	16,36% (9/55)
<i>PGR</i>	40,00% (22/55)	38,18% (21/55)	21,82% (12/55)

Os genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2* e *PGR* foram considerados diferencialmente expressos nas amostras de LU quando os valores de QR eram $\geq 2,0$ para os genes regulados positivamente (expressão aumentada) e, quando os valores de QR eram $\leq 0,5$ para os genes regulados negativamente (expressão diminuída) em relação às amostras de miométrio normais. Para a análise de expressão do gene *WNT7A* foram considerados os limites diferentes destes, pois este gene apresentou grande dispersão de valores, principalmente entre as amostras de miométrios normais. Após o cálculo da média, desvio padrão e intervalo de confiança dos valores de QR das amostras controle, foi considerado expressão aumentada quando $QR \geq 4,73$ e diminuída quando $QR \leq 0,70$.

A eficiência da reação foi calculada de acordo com as curvas-padrão (diluições seriadas do cDNA de amostras de leiomiomas uterinos e miométrio normal), sendo superior a 90%. As curvas-padrão, de amplificação e dissociação para os genes-alvo *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* estão apresentadas na Figura 3.

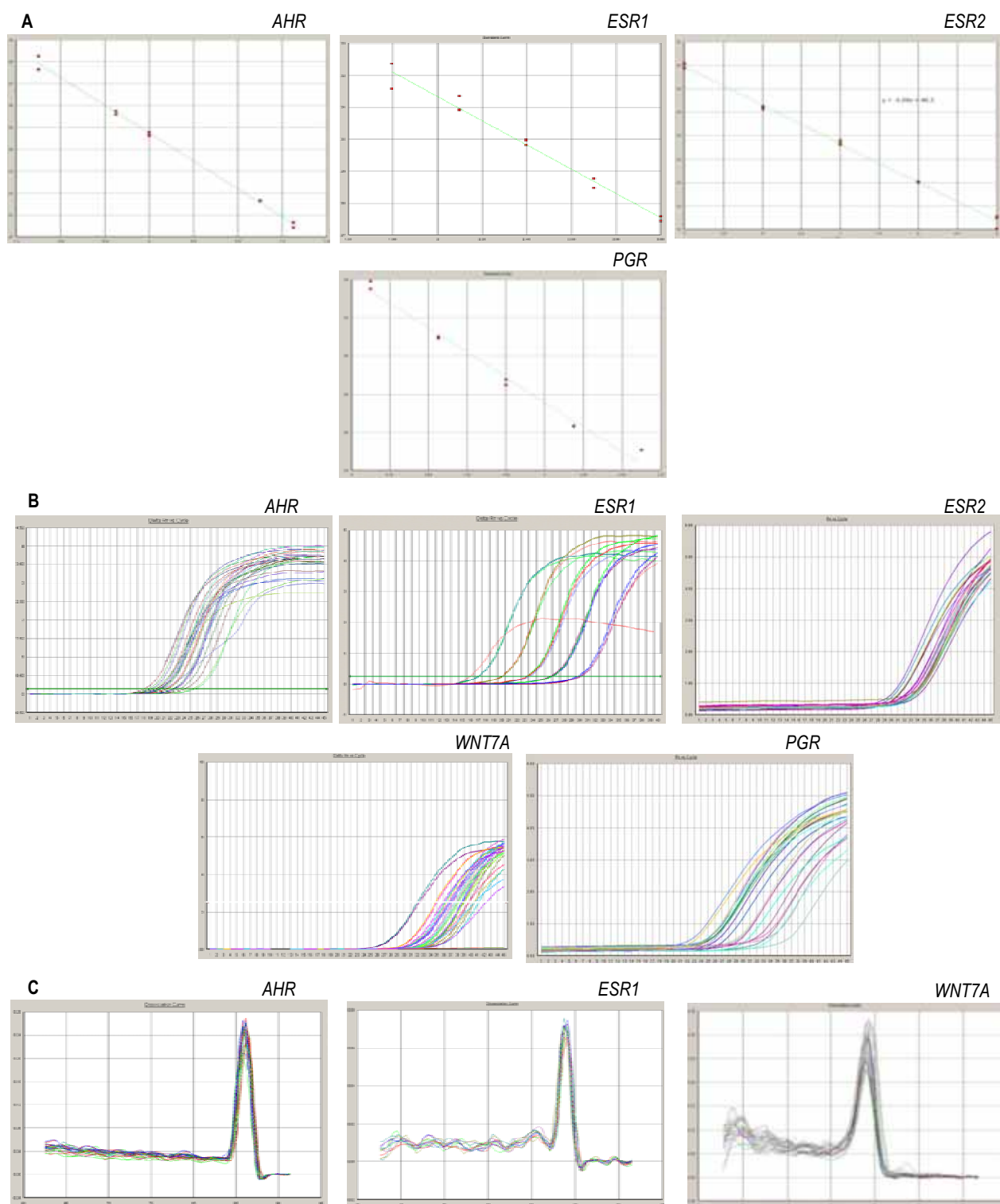


Figura 3. A. Curvas-padrão dos genes-alvo *AHR*, *ESR1*, *ESR2* e *PGR*. O gene *WNT7A* apresentou expressão tardia nas amostras de LU B. Curvas de amplificação para os genes-alvo *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A*; C. Curvas de dissociação para os genes-alvo *AHR*, *ESR1* e *WNT7A* demonstrando a especificidade dos amplicons. Como os genes *ESR2* e *PGR* foram amplificações pela metodologia do sistema *TaqMan*, não são obtidas as curvas de dissociação.

Na comparação entre casos e controles, não foi observada diferença significativa para os genes *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A*, entretanto, foi observada uma diferença estatisticamente significativa para o gene *AHR* mostrou ($P=0,0371$) (Figura 4).

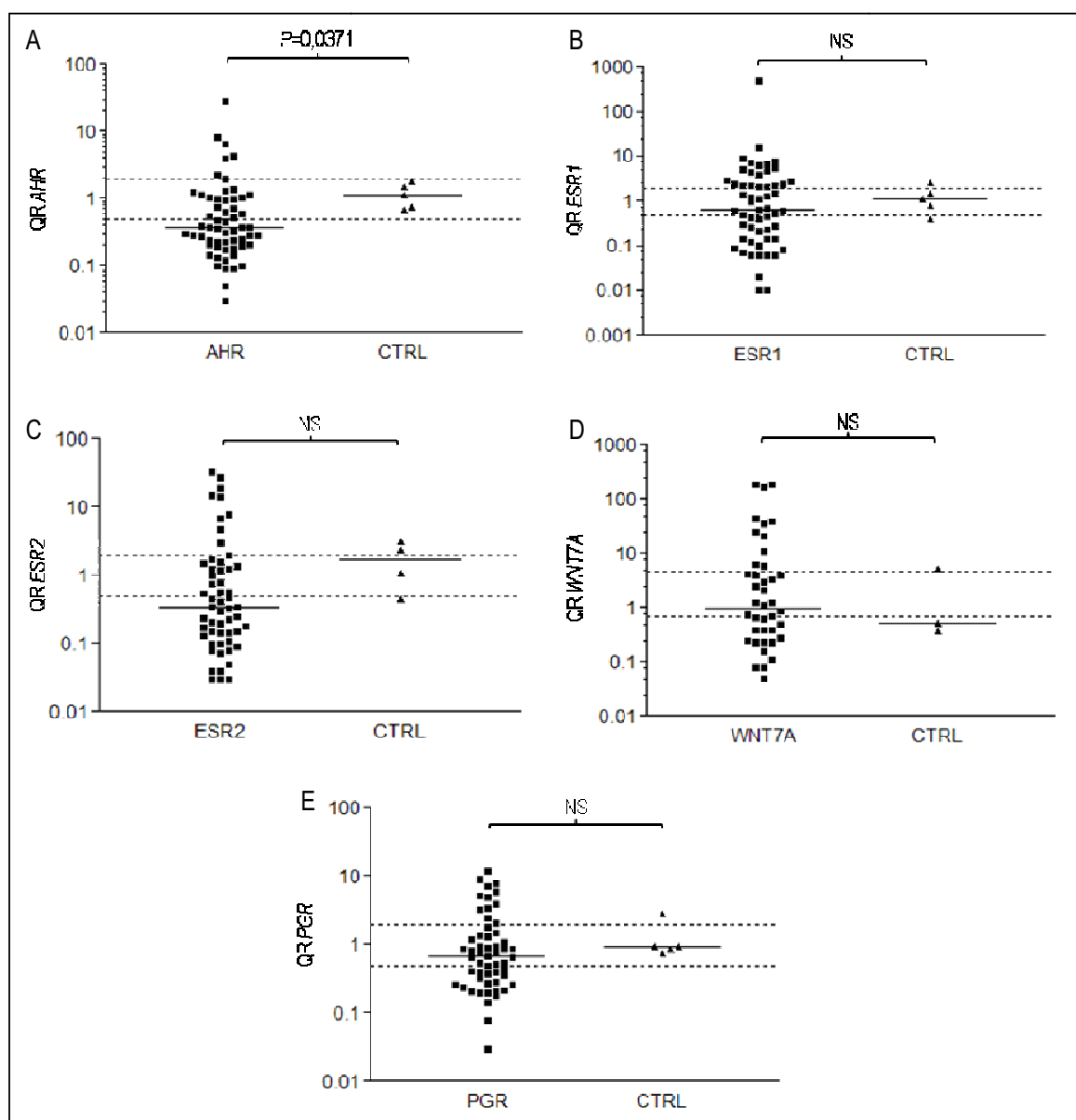


Figura 4. Valores de expressão quantitativa em tempo real dos transcritos *AHR* (A), *ESR1* (B), *ESR2* (C), *WNT7A* (D) e *PGR* (E) em amostras de LU e normais e comparadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Os valores de *P* estão apresentados na figura.

No presente estudo, foi observada uma correlação positiva pelo teste de Spearman entre os padrões de expressão dos genes *AHR* e *ESR1* ($P < 0,0001$; $r = 0,6911$) e *ESR1* e *WNT7A* ($P < 0,0001$; $r = 0,5655$) (Figura 5). A correlação entre os genes *ESR1* e *ESR2* ($P = 0,0498$; $r = 0,2709$) apresentou baixo poder de associação, assim como para os genes *AHR* e *ESR2* ($P = 0,0294$; $r = 0,2939$) e para *ESR2* e *PGR* ($P = 0,0229$; $r = 0,3120$). A comparação entre os demais genes não mostrou correlação significativa (dados não apresentados).

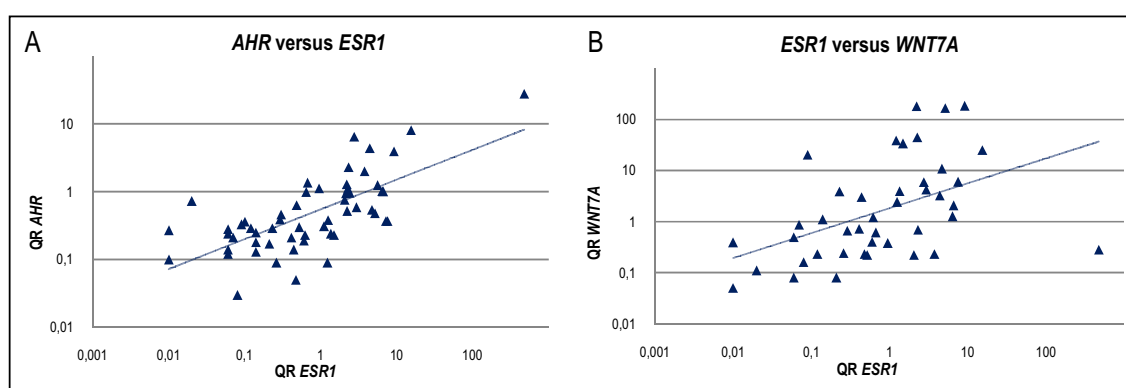


Figura 5. Análise de correlação entre os genes *AHR* / *ESR1* (A) e *ESR1* / *WNT7A* (B) por meio do teste de *Spearman* com valores de $P < 0,0001$ para ambas as correlações e $r = 0,6911$ para *AHR* versus *ESR1* e $r = 0,5655$ para a correlação entre *ESR1* e *WNT7A*.

A figura 6 mostra a relação entre os genes *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *AHR* em rede biológica. Para a construção de redes biológicas é necessário que uma lista de genes seja carregada em um banco de dados de interação molecular. O sistema utiliza linhas em azul para representar as ligações entre um ou mais genes e os nodos, coloridos, para representar os genes de acordo com suas funções metabólicas. Quanto maior o número de ligações realizadas por um gene, maior sua importância, pois tirá-lo desta interação representa prejudicar várias outras conexões.

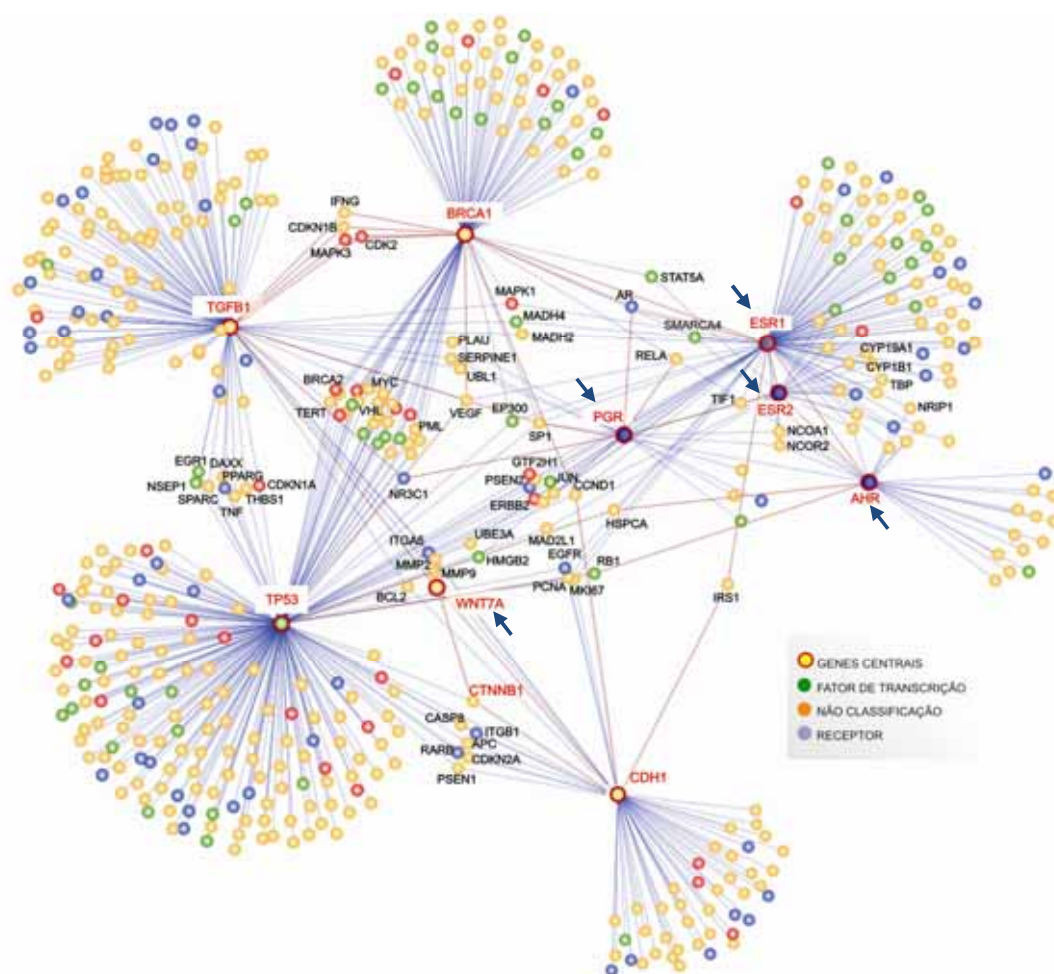


Figura 6. Rede biológica apresentando a relação entre os genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* (indicado pelas setas) permitindo a visualização de possíveis interações entre os genes estudados e sua relação com outros genes presentes nos bancos de dados.

Caracterização do padrão de amplificação das amostras de Leiomiomas Uterinos

O intervalo de confiança admitido para as análises de expressão quantitativa foi estabelecido entre 0,5 e 2,0 (faixa de variação de normalidade) para os genes *AHR* e *ESR1* e 0,70 a 4,73 para o gene *WNT7A*.

Foram realizadas comparações entre as amostras de leiomiomas uterinos (614, 634 e 642) com suas amostras de miométrio normal adjacente (614N, 634N, 642N). Todos os genes de todas as amostras de LU apresentaram um padrão de expressão diminuído ou normal comparado com seu miométrio normal adjacente (Tabela 5).

Tabela 5. Associação entre os níveis de expressão gênica das amostras de LU pareadas com os controles de miométrio normal adjacente para os genes analisados *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR*.

Amostras		QR <i>AHR</i>	QR <i>ESR1</i>	QR <i>WNT7A</i>	QR <i>ESR2</i>	QR <i>PGR</i>	Fase do Ciclo
614	N	1,78	1,47	0,37	0,45	0,87	Proliferativa
	LU	0,31	1,10	ND*	0,03	0,20	
634	N	0,75	0,77	5,15	—	0,95	Secretor
	LU	0,10	0,01	0,05	0,13	0,26	
642	N	0,67	0,41	—	1,07	0,76	Secretor
	LU	0,36	0,10	ND*	0,14	0,76	

QR = Quantificação relativa; — = não utilizado nas análises; ND* = Não detectado (baixa expressão); N = Normal

Para algumas amostras do transcrito *WNT7A* não foi possível detectar sua amplificação, embora tenha sido observada a amplificação do gene endógeno *HPRT* com valor de Ct confiável (20 a 30 ciclos). Isso se deve provavelmente a expressão muito baixa ou nula desse transcrito nas amostras 602, 614, 642, 719, 857, 954 e 1015, identificadas por ND* na Tabela 6.

Além destes casos, 10 amostras (137, 141, 629, 633, 643, 658, 728, 759, 790 e 1001) foram excluídas da análise por apresentarem Ct médio do gene endógeno *HPRT* superior a 30 ciclos ou sem amplificação detectável.

Após realizar a quantificação relativa (QR) das amostras para os genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* por meio do cálculo do 2^{-DDCt} , onde temos o DDCt como a diferença entre o DCt do gene

alvo e o DCt do gene endógeno, o padrão de expressão gênica relativa foi estratificado em três categorias: expressão aumentada, diminuída ou normal. Os valores numéricos referentes à análise pela qRT-PCR dos genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* e dos endógenos nas amostras de leiomiomas uterinos estão apresentados na Tabela 6.

Para comparar o padrão de expressão gênica, foram realizadas análises pareadas por genes nas amostras de LU avaliadas. Seis casos (602, 630, 631, 634, 853 e 1015) apresentaram diminuição de expressão para todos os genes analisados *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* (6/58 – 10%) e apenas a amostra 708 apresentou aumento de expressão comum a todos os genes analisados (1/58 – 2%). Quatro casos (615, 670, 719 e 901) apresentaram diminuição de expressão para quatro dos cinco genes analisados *AHR*, *ESR1*, *WNT7A* e *ESR2* (4/58 – 7%) e a amostra 979 apresentou aumento de expressão comum para esses genes analisados (1/58 – 2%). Nenhum caso apresentou padrão de expressão normal simultaneamente para todos os genes analisados.

Dentre os casos de LU analisados, 21% apresentaram diminuição de expressão para os genes, *AHR*, *ESR1* e *WNT7A* (12/58) e 14% apresentaram diminuição de expressão para os genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* (8/58); além de 5% dos casos apresentaram aumento de expressão para os genes *AHR*, *ESR1* e *WNT7A* (3/58) e para os genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* (3/58). Quando os dados de expressão gênica foram avaliados dois a dois, as amostras apresentaram: 29% de diminuição para os genes *WNT7A* e *AHR* (17/58); 24% de diminuição para *WNT7A* e *ESR1* (14/58), 31% de diminuição para os genes *ESR1* e *ESR2* (18/58), 38% de diminuição para os genes *AHR* e *ESR1* (22/58) e 43% apresentaram diminuição para os genes *AHR* e *ESR2* (25/58); além disso, 5% das amostras de leiomiomas uterinos apresentaram aumento de expressão para os genes *WNT7A* e *AHR* (3/58); 19% de aumento para *WNT7A* e *ESR1* (11/58), 10% de aumento para os genes *ESR1* e *ESR2* (6/58), 12% de aumento para *AHR* e *ESR1* (7/58) e 5% de aumento de expressão para os genes *AHR* e *ESR2* (3/58).

Quando avaliamos a correlação inversa dos níveis de expressão desses genes, observamos quatro casos nos quais detectamos níveis diminuídos de expressão para o gene *WNT7A* e aumentados para o *ESR1* (7%) e um caso inverso (2%); um caso que apresentou diminuição para *ESR1* e aumento para *ESR2* (2%) e oito casos inversos (14%) e três casos que apresentavam diminuição de expressão para o gene *AHR* e aumento de expressão para o *ESR1* (5%) e nenhum com aumento de expressão de *AHR* e diminuição para o gene *ESR1*. Também verificamos que 5% dos casos apresentaram aumento de expressão para o gene *ESR1* e expressão normal para o gene *WNT7A* (3/58), 14% dos casos apresentaram aumento para *ESR1* e diminuição para *ESR2* (8/58) e 19% apresentaram aumento para o gene *ESR1* e expressão normal para o gene *AHR* (11/58).

O padrão de expressão dos transcritos analisados foi comparado aos dados clínico-patológicos incluindo idade, idade da menarca, paridade, idade da primeira gestação, fase do ciclo, raça, índice de massa corpórea, número e localização dos tumores, assim como a história familiar de câncer e de leiomiomas uterinos, conforme apresentado na tabela 6. Nessa tabela também estão demonstrados os valores das quantificações relativas (QR) dos genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* assim como seus padrões de expressão: aumentada (em azul escuro), normal (em branco) e diminuída (em azul claro).

Tabela 6. Quantificação relativa (QR) dos genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* e dados clínico-patológicos nas amostras de leiomiomas uterinos analisadas.

Amostra	QR					Idade Menarca	Raça	IMC	Idade 1ª gravidez	Paridade	Anátomo Patológico				Fase do Ciclo *	História Familiar	
	<i>AHR</i>	<i>ESR1</i>	<i>WNT7A</i>	<i>ESR2</i>	<i>PGR</i>						SS	SM	INT	GG		LU	Ca
137	0,99	0,64	—	—	0,90	46	B	33,3	21	G2P2A0	+	+++			Proliferativo		Nega
141	0,12	0,06	—	—	0,68	44	B	21,8	ND	G7P6A1	+	+	+		Secretor		Nega
148	1,12	0,95	0,38	18,59	0,03	48	B	31,2	22	G2P2A0	+	+	+		Secretor		Nega
295	4,38	4,41	3,21	1,19	1,17	48	B	22,0	ND	G3P0A3				+	Atrófico		Pai/ pulmão
304	1,01	6,61	2,07	1,59	0,37	44	B	26,6	ND	G10P7A3			++		Proliferativo		Avó/ intestino
307	2,29	2,32	0,69	7,65	—	48	B	34,9	26	G4P3A1	+	+	+		Proliferativo		Nega
308	0,73	0,02	0,11	0,34	—	36	NB (negra)	21,2	18	G1P1A0					Autólise		Nega
310	0,76	2,06	0,22	13,92	2,02	53	B	24,4	42	G1P1A0	+				Basal		Nega
602	0,46	0,30	ND*	0,18	0,20	50	B	29,3	ND	G2P2A0		+	+		Secretor	Irmã	Nega
614	0,31	1,10	ND*	0,03	0,20	44	B	29,9	17	G10P7A3			+		Proliferativo		Nega
615	0,17	0,21	0,08	0,30	0,52	43	B	22,9	0	G0P0A0	+	+	+		Proliferativo		Nega
625	0,23	1,49	33,90	0,74	0,44	47	B	24,5	24	G3P3A0	+	+	+		Secretor	Tia/ mama; tia/ estômago	
629	0,59	2,95	—	4,74	5,13	49	B	21,2	26	G3P3A0	+				Secretor	Irmã	Nega
630	0,24	0,06	0,08	0,05	0,35	47	B	26,3	18	G2P2A0				+	Proliferativo		Nega
631	0,03	0,08	0,16	0,03	0,42	43	NB (negra)	24,1	ND	G0P0A0			+		Proliferativo		Nega
633	0,18	0,14	—	33,08	0,26	46	NB (mulata)	26,2	ND	G3P2A1		+			Basal	Mãe	Nega
634	0,10	0,01	0,05	0,13	0,26	44	B	23,6	23	G3P3A0	+				Secretor		NI
642	0,36	0,10	ND*	0,14	0,76	46	B	29,9	21	G1P0A1			+		Secretor		Mãe/ útero
643	0,13	0,14	—	0,24	0,76	39	B	25,4	31	G1P1A0			+		Atrófico		Irmão/ leucemia
644	0,28	0,06	0,49	1,33	3,24	39	B	24,3	ND	G2P2A0		+			Proliferativo		Nega
658	0,95	2,14	—	0,56	0,85	44	ND	24,9	ND	G2P2A0		+	+		Atrófico		Nega
670	0,09	0,26	0,24	0,20	1,52	38	B	26,6	18	G3P2A1			+		Secretor		Nega
681	0,21	0,07	0,86	—	—	46	B	21,5	21	G4P4A0	+		+		Proliferativo		Tia/útero
683	0,25	0,14	1,10	0,44	8,95	49	B	28,7	23	G3P3A0	NI				Secretor	Irmã	Nega
684	0,24	1,35	3,93	1,48	0,66	49	B	25,6	ND	G6P6A0			+		Secretor		Nega
708	3,94	9,18	184,57	3,02	7,14	45	B	33,9	22	G3P3A0			+		Secretor		Tia/ mama
711	0,30	0,52	0,22	0,41	3,40	43	B	30,0	18	G2P1A1	+		+		Autólise		Nega
719	0,05	0,47	ND*	0,04	1,27	50	B	24,2	0	G0P0A0			+		Secretor		Pai/ NI
722	0,39	0,29	0,66	1,25	1,77	50	B	34,9	ND	G4P4A0		+			Secretor		Mãe/ rim
728	0,97	2,39	—	1,25	2,46	50	B	27,3	18	G6P5A1			+		Autólise		Nega
729	0,19	0,60	0,40	0,17	0,27	46	B	24,3	25	G1P1A0			+		Secretor		Nega
733	0,54	4,70	10,88	0,11	0,08	48	B	25,8	25	G2P0A2			+		Secretor		Nega
757	8,04	15,41	25,07	0,23	0,66	42	NB (negra)	26,5	ND	G3P3A0			+		Atrófico		Tia/ mama + renal

759	1,25	5,60	—	0,77	6,01	51	15	B	21,2	ND	G3P2A1	+	+	Secretor	Nega
761	1,11	2,27	44,57	0,48	0,39	45	13	B	18,7	ND	G3P2A1	+	+	Secretor	Mãe/ intestino
769	0,63	0,48	0,23	0,15	0,94	47	14	B	23,1	ND	G2P1A1	+	+	Proliferativo	Tio/ ca NI
790	0,37	7,18	—	0,53	0,21	52	12	B	32,0	26	G3P2A1	+	+	Atrófico	Imã/ mama
842	0,23	0,62	1,21	0,04	0,50	37	11	B	29,5	20	G1P1A0	+	+	Basal	Avó/ avó/ tio/ ca NI
844	0,14	0,44	3,01	1,69	0,93	50	12	B	36,8	ND	G4P4A0	+	+	Proliferativo	Nega
845	27,76	476,06	0,28	0,08	0,18	54	14	NB (negra)	22,4	28	G6P5A1	+	+	Atrófico	Pai/ intestino
853	0,27	0,01	0,39	0,25	0,21	35	11	B	26,8	21	G2P2A0	+	+	Secretor	Nega
854	0,09	1,22	38,53	0,98	0,86	47	12	B	34,4	33	G1P0A1	+	+	Basal	Pai/ próstata
855	0,21	0,41	0,72	0,09	0,29	37	13	B	24,9	23	G2P2A0	+	+	Secretor	Tio/ estômago
857	0,10	—	ND*	0,33	4,85	41	13	B	23,7	20	G3P3A0	+	+++	Secretor	Nega
867	1,36	0,67	0,61	0,21	0,53	46	14	B	33,5	17	G4P4A0	+	+++	Autólise	Imã/ intestino Sobrinha/ osseo
884	0,48	5,16	166,35	0,03	0,24	46	13	B	23,9	ND	G3P3A0	+	+	Basal	Nega
901	0,29	0,12	0,23	0,10	3,94	51	9	B	34,1	ND	G3P3A0	+	+	Proliferativo	Nega
934	0,52	2,22	181,40	1,99	1,06	53	11	B	23,7	ND	G4P3A1	+	+	Secretor	Nega
942	0,37	7,54	6,03	0,14	11,59	48	13	B	27,5	25	G3P3A0	+	+	Basal	Nega
947	1,02	6,42	1,27	6,76	0,82	47	ND	B	27,6	ND	ND	+	+	Proliferativo	Nega
948	0,38	1,25	2,42	0,08	1,34	46	13	B	26,6	29	G2P2A0	+	+	Proliferativo	Tia/ mama
953	0,33	0,09	20,30	0,34	0,54	51	11	B	28,0	23	G2P2A0	+	+	Atrófico	Pai/ fígado; Imã/ leucemia Imã/ pulmão
954	0,20	—	ND*	14,63	7,82	45	12	B	33,7	18	G3P3A0	+	+	Secretor	Nega
979	6,44	2,75	5,89	26,93	0,40	49	12	NB (negra)	27,0	ND	G6P6A0	+	+	Atrófico	Nega
1001	1,28	2,19	—	0,10	0,86	46	12	B	32,9	ND	G10P6A4	+	+	NI	Avó/ boca
1002	0,29	0,23	3,87	0,07	0,14	46	13	B	27,5	18	G2P2A0	+	+	Secretor	Nega
1005	2,00	3,76	0,23	0,56	0,33	40	12	NB (negra)	34,2	ND	G2P1A1	+	+	Proliferativo	Mãe/ cólon
1015	0,14	0,06	ND*	0,15	0,22	43	13	NB (negra)	24,2	ND	G2P2A0	+	+	Secretor	Nega

QR = Quantificação Relativa; **ND*** = Não detectado (baixa expressão); **—** = Expressão gênica não detectada, mesmo após repetições do experimento.

B = Branca; **NB** = Não-branca; **ND** = Não determinado; **G.P.A.** = Gravidez, Paridade, Aborto.

SS = Subseroso; **SM** = Submucoso; **INT** = Intramural; **GG** = Gigante; **+** = 1 tumor; **++** = 2 tumores; **+++** = 3 tumores.

***** = Fase do ciclo determinada pelo padrão de proliferação do endométrio (HE); **Atrófico** = Endométrio atrófico (menopausa); **Basal** = Endométrio padrão basal; **Autólise** = Endométrio autolisado (falha na fixação).

LU = Leiomioma uterino; **Ca** = Câncer; **NI** = Não informado.



Correlação entre as características clínicas-patológicas e o perfil de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A*

Depois de estabelecidos os padrões de amplificações das amostras de miométrio normais e das amostras de leiomiomas uterinos, foram realizadas análises estatísticas para comparar os níveis de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* e os dados clínico-patológicos.

Idade

Considerando a dependência hormonal dos LU e pelo fato de serem mais incidentes em mulheres na fase reprodutiva, foi calculada a mediana da idade das pacientes com LU (46 anos) e então comparados os seus perfis de expressão gênica entre as mulheres com idades ≤ 46 anos e > 46 anos. Foi observada uma associação marginalmente significativa entre a idade e os níveis de expressão do transcrito *WNT7A* ($P=0,0503$) (Figura 7). Foram considerados marginais os valores de P entre 0,05 e 0,07. Os demais genes analisados não mostraram associação significativa com a idade. Foram também realizadas análises estatísticas para comparar os níveis de expressão gênica em diferentes faixas etárias (≤ 30 anos, entre 30 e 40, >40 anos), as quais também não se mostraram significativas.

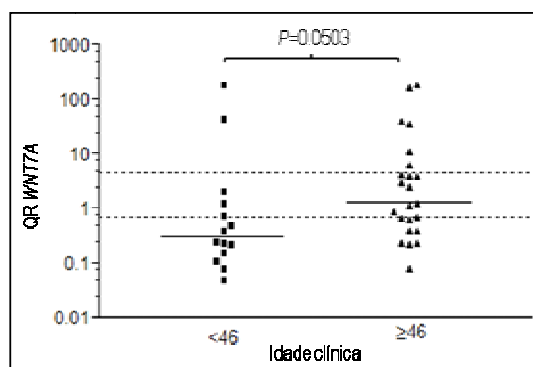


Figura 7. Representação gráfica correlacionando o valor do QR para o gene *WNT7A* e a mediana da idade das pacientes de LU ($P=0,0503$, teste de *Mann-Whiney*).

Fase do Ciclo

Foram também analisados os padrões de expressão de cada gene e a fase reprodutiva (cíclicas) ou em menopausa em que encontravam as pacientes à cirurgia (Figura 8).

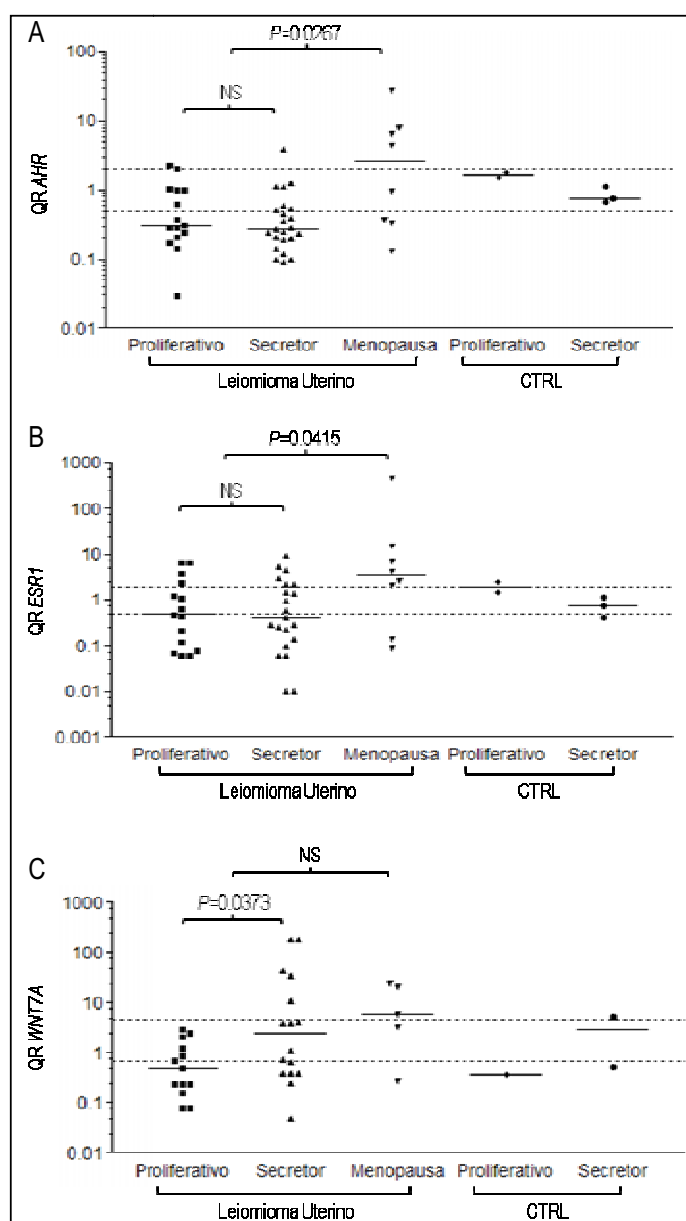


Figura 8. A comparação entre a fase proliferativa versus secretória e o padrão de expressão gênica, mostrou-se significativa para *WNT7A* (C) ($P=0,0373$). A mesma comparação entre as pacientes cíclicas e aquelas em menopausa foi significativa para os genes *AHR* (A) ($P=0,0267$) e *ESR1* (B) ($P=0,0415$). NS: não significativa.

Não foi observada uma associação entre as fases do ciclo menstrual (proliferativa *versus* secretória) e os níveis de expressão dos genes *AHR* e *ESR1* porém, ao relacionar as pacientes cíclicas com as pacientes em menopausa, detectou-se uma associação significativa entre os dois grupos (Figura 8A e B). Para o transcrito *WNT7A*, foi observada uma diferença significativa entre as mulheres na fase proliferativa e aquelas na fase secretória quando à cirurgia de LU (Figura 8C). Os genes *ESR2* e *PGR* não se associaram significativamente com a fase menstrual (dados não demonstrados).

Idade da Primeira Gestação

Baixos níveis de expressão dos genes *ESR1* e *WNT7A* mostraram-se significativamente associados com idade da primeira gestação mais precoce (Figura 9A e B, respectivamente).

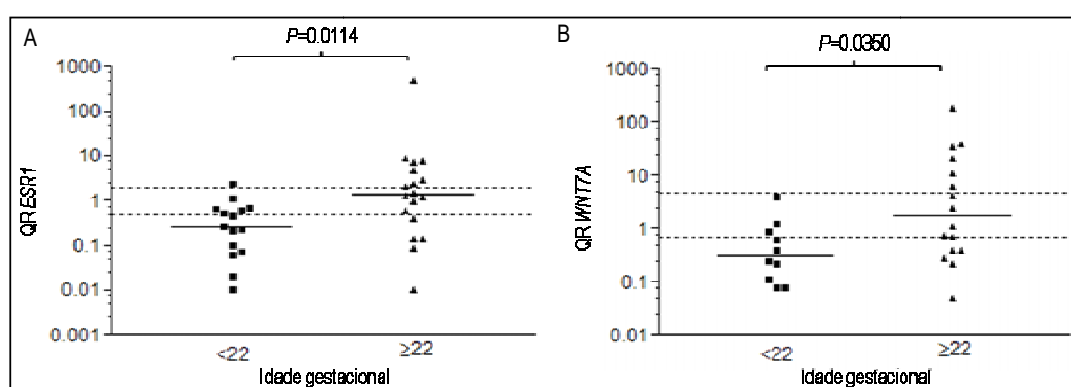


Figura 9. Representação gráfica demonstrando associações estatisticamente significativas entre os valores de QR para os genes *ESR1* (A) ($P=0,0114$) e *WNT7A* (B) ($P=0,0350$) e a mediana da idade gestacional das pacientes com LU.

Paridade

A associação entre a paridade e o nível de expressão gênica nas amostras de LU foi significativa para os genes *AHR* ($P=0,0229$), *ESR1* ($P=0,0102$), *WNT7A* ($P=0,0040$) e *ESR2* ($P=0,0323$), onde eles se apresentaram com expressão diminuída naquelas pacientes que não tiveram nenhuma gestação comparada com as pacientes que tiveram menos de três gestações (1 ou 2) e mais que três gestações (3 a 10) (Figura 10A, B, C e D, respectivamente). Esta análise foi realizada pelo

teste de *Kruskal-Wallis* utilizando o valor da mediana do número de gestações (três) (subdividos em três subgrupos: 0; <3; ≥3 gestações)

Para o gene *AHR*, por ter apresentado um baixo nível de expressão nas pacientes que não possuem filhos, as amostras foram analisadas subdividindo-as nos grupos de pacientes que possuem (Sim) e não possuem filhos (Não). Nesta comparação foi observada uma associação significativa entre os grupos ($P=0,0096$) (Figura 10E).

Para os demais genes foi realizado o teste estatístico de *Mann-Whitney* para avaliar a diferença entre o padrão de expressão gênica entre as pacientes que apresentavam número de gestações inferior a três e maior ou igual a três (<3; ≥3), obtendo valor significativo para *ESR1* ($P=0,0031$), *WNT7A* ($P=0,0126$) e *ESR2* ($P=0,0253$) (Figura 10F, G e H).

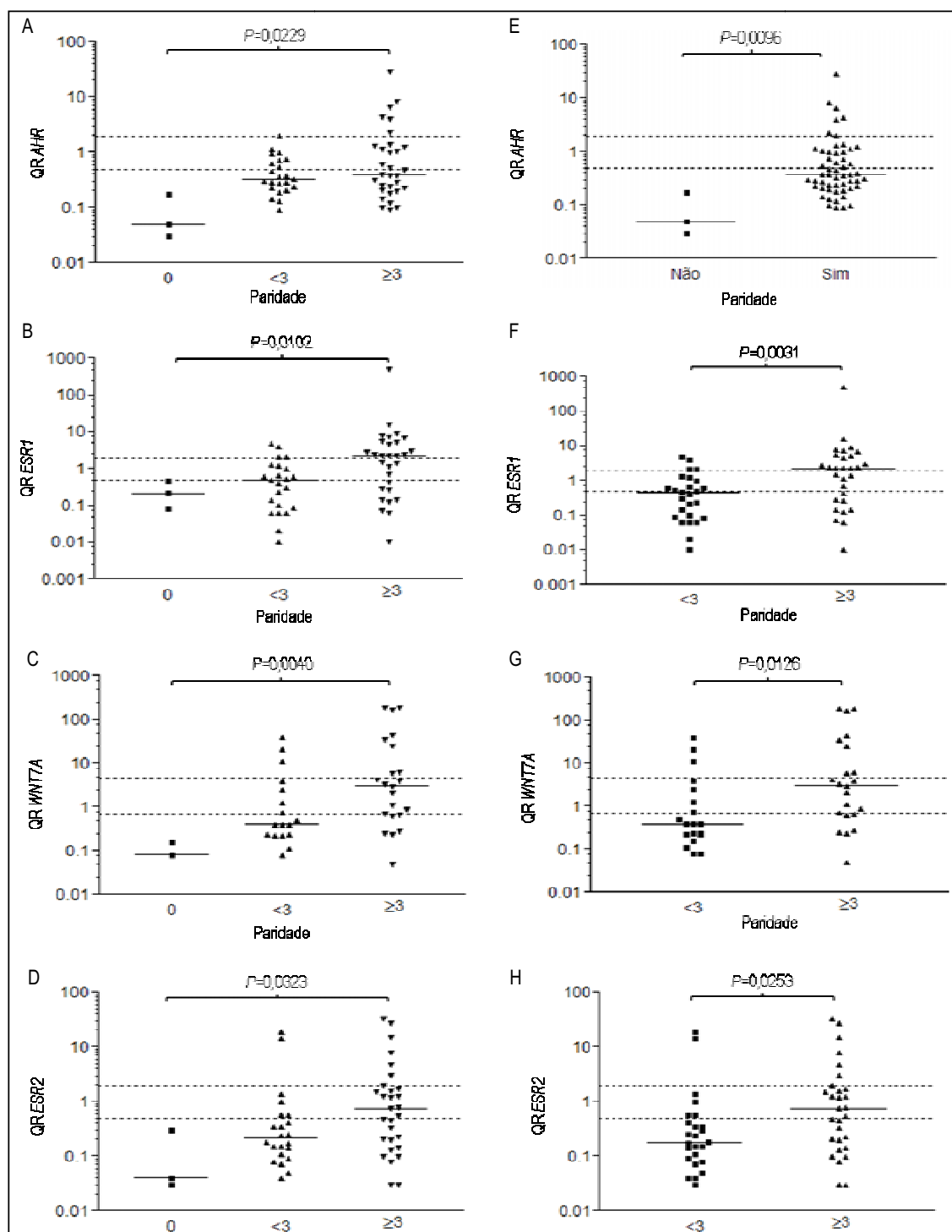


Figura 10. Representação gráfica dos níveis de expressão dos transcritos *AHR* (A), *ESR1* (B), *WNT7A* (C) e *ESR2* (D) versus a paridade das pacientes com LU. Foi observada associação significativa entre os valores da QR para os genes *ESR1* (E), *WNT7A* (F) e *ESR2* com os grupos de pacientes com mais ou menos de três filhos. Para o gene *AHR* (D), considerou-se mulheres com ou sem filhos. Não foi observada associação significativa entre o *PGR* e a paridade.

Raça

Neste estudo foram consideradas pacientes brancas e não brancas (negróides e mulatos). O termo raça foi baseado em uma complexa avaliação fenotípica levando em consideração a pigmentação da pele, tipo de cabelo e formato do nariz e lábios (Teles, 2002).

Entre as pacientes de leiomiomas uterinos do presente estudo, apenas o gene *PGR* apresentou associação significativa quando foram consideradas as pacientes brancas e não-brancas ($P=0,025$) (Figura 11). Os demais genes não atingiram valor de significância (dados não apresentados).

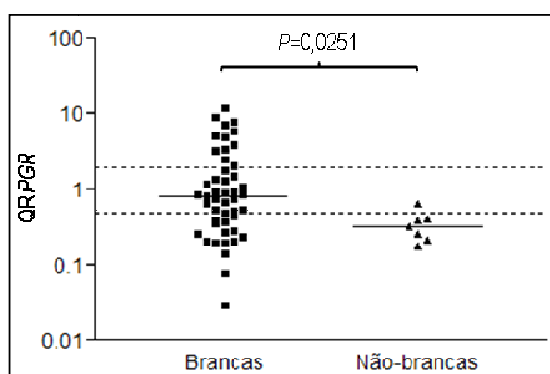


Figura 11. Comparação entre os níveis de expressão do transcrito *PGR* e cor das pacientes com LU (brancas versus não-brancas)

A Tabela 7 contém o resumo do padrão de expressão gênica correlacionado aos dados clínico-patológicos e seus respectivos valores de P segundo testes estatísticos específicos. As análises que não obtiveram valores estatísticos significativos (NS) não estão apresentadas na forma gráfica.

Tabela 7. Resumo da análise estatística realizada para a comparação entre os níveis de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* e os parâmetros clínico-patológicos (*Prism GraphPad Software 3*).

Variável		Descrição	<i>AHR</i> (n=58)	<i>ESR1</i> (n=56)	<i>WNT7A</i> (n=48)	<i>ESR2</i> (n=55)	<i>PGR</i> (n=55)
LU versus controle							
LU cíclicas		<i>Mann-Whitney</i>	P=0,0130	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
Controle (CTRL)							
Idade *							
≤46 anos	32 (35 – 46)	<i>Mann-Whitney</i>	P=NS	P=NS	P=0,0503	P=NS	P=NS
>46 anos	26 (47 – 54)						
Fase							
Proliferativa	15	<i>Mann-Whitney</i>	P=NS	P=NS	P=0,0373	P=NS	P=NS
Secretória	24	Proliferativa x Secretória					
Menopausa	8	Cíclica x Menopausa	P=0,0267	P=0,0415	P=NS	P=NS	P=NS
NI	11						
Tipo de Leiomioma							
Subseroso	3	<i>Kruskal-Wallis</i> ▪	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
Submucoso	6						
Intramural	18						
Misto	26						
Gigante	5						
Raça							
Branca	49	<i>Mann-Whitney</i> ▪	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=0,0251
Não-branca	8						
NI	1						
Idade Menarca *							
≤12	27 (9 – 12)	<i>Mann-Whitney</i> ▪	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
>12	28 (13 – 16)						
NI	3						
Idade 1ª gravidez *							
≤22	17 (17 – 22)	<i>Mann-Whitney</i>	P=NS	P=0,0114	P=0,0350	P=NS	P=NS
>22	16 (22 – 42)						
NI	25						
Paridade *							
0	3	<i>Kruskal-Wallis</i> (0; <3; ≥3)	P=0,0229	P=0,0102	P=0,0040	P=0,0323	P=NS
<3	23 (1 – 2)	<i>Mann-Whitney</i>					
≥3	31 (3 – 10)	(Sim; Não); (<3; ≥3)	P=0,0096	P=0,0031	P=0,0126	P=0,0253	P=NS
NI	1						
IMC *							
≤25	23 (18,7 – 24,9)	<i>Mann-Whitney</i> ▪	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
>25	35 (25,4 – 36,8)						
Abortos							
Não	34	<i>Mann-Whitney</i> ▪	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
Sim	20 (1 – 4)						
NI	4						

IMC: índice de massa corpórea; **NI** = Não Informado; **P** = Valor estatístico; **NS** = Não significativo; * = Valores numéricos obtidos a partir da mediana dos dados clínico-patológicos apresentados; ▪ = Dados não apresentados em gráficos (NS).

Díscussão

Discussão

Várias evidências clínicas e experimentais sugerem que o crescimento dos leiomiomas uterinos é esteróide-dependente, entretanto, os resultados das análises de estudos de expressão gênica em larga escala revelaram uma ausência de alterações significantes, pelo menos para o gene *ESR1* e *PGR* (Canevari e Rogatto, 2006). Com o objetivo de avaliar o nível de expressão dos receptores esteróides hormonais *ESR1*, *ESR2* e *PGR* e outros genes relacionados ao estrógeno como *AHR* e *WNT7A*, foi utilizada a técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real em amostras de leiomiomas uterinos. Os resultados desta análise revelaram perdas do nível de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR* e *WNT7A* em 60%, 43%, 52%, 60% e 40% dos casos, respectivamente. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que revelou perdas significativas nestes genes em leiomiomas uterinos. Além disso, também foi observada uma correlação positiva entre os níveis de expressão dos genes *AHR* e *ESR1* e dos genes *WNT7A* e *ESR1*.

Quando foram construídas as redes biológicas pelos programas UniHI (*Unified Human Interactome*) e HiMAP (*Human Interactome Map*) foi observado uma estreita interação entre esses genes. Estas ferramentas da bioinformática permitem compreender a relação entre as informações fragmentadas oriundas das diversas áreas da biologia e estruturar estas informações em uma entidade compreensiva e extremamente importante para a biologia (Hubbard et al., 2002). A premissa é que existe um relacionamento entre as estruturas dos genes, seus arranjos em relação ao genoma, a função das proteínas e as interações entre elas no organismo. Essas ferramentas auxiliam na identificação da importância do gene em uma via biológica e sua relação com outros genes vizinhos.

Embora o número total de amostras de LU incluídas no estudo fosse cinqüenta e oito, houve variação entre o número total de pacientes avaliadas para cada gene. Isto ocorreu devido à dificuldade de amplificação existente nos transcritos que apresentavam padrão de expressão tardia, como foi o caso do gene *WNT7A* onde foi possível avaliar 48 amostras. Foram avaliados todos os casos para o gene *AHR* (58 amostras) e 56 casos para o gene *ESR1* (duas amostras foram excluídas da análise por

apresentarem um padrão de amplificação tardia (acima de 30 ciclos). O mesmo critério foi utilizado na exclusão de três amostras para os genes *ESR2* e *PGR*, composto por 55 amostras estudadas.

Estudos citogenéticos prévios do nosso grupo utilizando hibridação genômica comparativa (CGH) revelaram uma alta proporção de tumores com desequilíbrios cromossômicos (82% dos casos) e uma frequência significativa de perdas cromossômicas não descritas anteriormente em literatura, envolvendo, entre outras regiões, o braço curto do cromossomo 7, especificamente 7p15-p22 (Rogatto et al., 2003). Esses achados foram posteriormente confirmados por estudos de perda de heterozigose (LOH) (Canevari et al., 2005). Em 7p15 encontra-se mapeado o gene *AHR* (7p15). Considerando a função do gene *AHR* e os achados prévios, ele foi selecionado para estudos de análise de expressão do transcrito. No presente estudo, foi observada diminuição no nível de expressão do gene *AHR* em 60% das amostras de leiomiomas uterinos e uma significativa diferença entre o nível de expressão quando comparados os casos e os miométrios normais ($P=0,0130$).

O gene *AHR* medeia os efeitos tóxicos das dioxinas, tais como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), codificando o receptor da dioxina (AhR). Estes receptores são membros da mesma família de fatores de transcrição que induz enzimas metabolizadoras em resposta a diversos ligantes exógenos e endógenos. Relatos em literatura revelam uma diferença interindividual na capacidade de indução no *CYP1A1* pelos hidrocarbonetos aromáticos ligantes de *AHR* (Fukushima-Uesaka et al., 2004). Embora não tenha sido bem estabelecido o papel fisiológico para nenhum ligante endógeno do *AHR*, seu receptor possui um papel na fisiologia normal ou no desenvolvimento, uma vez que murinos com ausência desse receptor (*knockout*) exibem inúmeros defeitos incluindo anormalidades no fígado e no sistema imunológico (Lahvis e Bradfield, 1998; Walisser et al., 2004).

Khorram et al. (2002), por meio da técnica quantitativa (RNA_m) de ensaio de proteção de ribonuclease, demonstraram que os níveis de expressão dos genes *AHR* e *ARNT* eram menores em leiomiomas uterinos comparados com o miométrio normal adjacente das mesmas pacientes. Para o nosso conhecimento, este é o único relato em literatura que associa a diminuição na expressão do

gene *AHR* em LU. Não é conhecido o significado e o mecanismo pelo qual ocorre a perda ou diminuição na regulação da expressão dos genes *AHR* em LU.

O *AHR* exerce também atividade na regulação do ciclo celular. Camundongos *AHR*^{-/-} mostraram hiperplasia epidermal e hiperproliferação dos folículos pilosos e dos vasos sanguíneos do fígado e uma incidência idade dependente de adenocarcinomas do fígado e pulmão. Paradoxalmente, esses ratos exibiram taxas elevadas de apoptose no fígado (Gonzalez e Fernandez-Salguero, 1998). Fibroblastos fetais de camundongos *AHR*^{-/-} apresentavam taxas de proliferação menores e aumento da taxa de apoptose, concomitantemente com o acúmulo de células em G2/M, possivelmente devido à expressão alterada de quinases que atuam em G2/M (Elizondo et al., 2000). Atualmente várias evidências mostram que a ausência do *AHR* leva a um prolongamento do ciclo celular. Tanto as linhagens celulares *AHR*-negativas de hepatoma de rato Hepa1c1c7 e de hepatoma humano HepG2 transfectadas com siRNA para o *AHR* (Abdelrahim et al., 2003) mostraram uma diminuição na progressão através do ciclo celular, devido a um atraso na transição de G1 para S. Esses resultados sugerem que o *AHR* exerce um papel endógeno na promoção da progressão do ciclo celular e que essa promoção é independente da ativação por ligantes exógenos. Essa conclusão é apoiada pelos achados de Andersson et al. (2002) e Moennikes et al. (2004) que verificaram que a expressão do *AHR* constitutivamente ativo em camundongos transgênicos causava um efeito pró-proliferativo, como a indução de tumores gástricos e promoção de hepatocarcinogênese, respectivamente.

Sendo o gene *AHR* responsável pela regulação de fatores de transcrição, a diminuição dos níveis de expressão desse gene no tecido uterino pode estar relacionada à ativação de uma via metabólica particularmente relacionada com os receptores de estrogênio e associada com o crescimento e desenvolvimento dos leiomiomas. Para reforçar essa hipótese, os resultados desse estudo também demonstraram uma correlação positiva entre os genes *AHR* e *ESR1* ($P < 0,0001$; $r = 0,6911$), confirmando haver um mecanismo de interação entre esses produtos gênicos associado à diminuição da expressão simultânea desses receptores. Ohtake et al (2003) relataram uma associação

entre o heterodímero AHR-ARNT e os receptores de estrógeno ESR1 e ESR2, resultando no recrutamento do ER não ligado e do co-ativador p300 nos promotores de genes responsivos ao estrógeno. Como consequência, ocorre a ativação transcricional e os efeitos estrogênicos, resultando na atenuação da função do ER ligado. Os autores demonstraram uma ação agonista do AHR ao estrógeno quando utilizaram camundongas ovariectomizadas *AHR* *-/-* ou *ESR1* *-/-*. Assim, a ação agonista do *AHR* pode ser exercida por uma interação direta entre o AHR-ARNT e ESR não ligados e pela formação de unidades funcionais que se ligam ao ERE e ativam a transcrição de genes com expressão no útero e ação na proliferação celular.

Em nossos estudos, 38% dos casos de LU apresentaram diminuição nos níveis dos transcritos *AHR* e *ESR1* (22/58) e 43% diminuição para os genes *AHR* e *ESR2* (25/58), demonstrando uma ação agonista do AHR aos receptores de estrógeno

Alguns estudos têm demonstrado que a TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) leva a alteração no perfil de expressão de genes dependente de estrógeno no útero (*estrogen-like*) (Ohtake et al., 2003; Watanabe et al., 2004; Boverhof et al., 2006). A diminuição nos níveis de receptores de estrógeno e o aumento no metabolismo de estrógeno foi também proposto como um mecanismo para os efeitos anti-estrogênicos do TCDD (Romkes et al., 1987; Spink et al., 1994). Em adição, tem sido demonstrado que a TCDD e outros agonistas do *AHR* inibem o hormônio esteróide 17 β -estradiol (E2) no útero de roedores. Devido a este fato, a TCDD tem sido amplamente utilizada para a investigação da inibição mediada pelo AHR de respostas induzidas pelo E2 (Safe, 1999; 2001). A TCDD também inibe a proliferação celular e a síntese de DNA induzidas pelo E2 nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e T47D. Wormke et al. (2000) demonstraram que E2 e TCDD ativam a degradação dependente de proteossomo das proteínas codificadas pelo *ESR1* e *AHR* nas linhagens celulares MCF-7 e T47D, respectivamente. O hormônio esteróide E2 não afeta a proteína AHR, entretanto, o TCDD também induz a degradação de ESR1 e, em células tratadas com TCDD associada a E2, os níveis da proteína ESR1 foram consideravelmente reduzidos. Essa redução deve contribuir de modo

significante para a ligação AHR-ESR1, demonstrando que sua ligação inibitória afeta múltiplas vias estrógeno-dependentes (Safe, 2001). No presente estudo, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de expressão dos genes *AHR* e *ESR1* ($P < 0,0001$, $r = 0,6911$) o que poderia estar associado ao desenvolvimento de leiomiomas.

Boverhof et al. (2008) demonstraram que a TCDD inibe somente um subtipo seletivo de respostas a estrógenos (E2 ou EE), indicando que o aumento de seu metabolismo e a diminuição de níveis de estrógeno não são o mecanismo primário, sendo esperado, por isso, deduzir um efeito mais global na expressão gênica. Os efeitos inibitórios gene-específicos podem envolver um mecanismo inibitório dos elementos responsivos à dioxina (DRE – *dioxin response element*), alteração na atividade ou na disponibilidade de co-fatores gene-específicos ou indução/inibição de uma proteína positivamente reguladora que é provável de ser tecido e espécie-específica, sugerindo a independência nos efeitos do TCDD na expressão gênica estrogênica e anti-estrogênica. Por esse motivo, o *AHR* e seus agonistas têm sido envolvidos na iniciação e progressão de cânceres em múltiplos órgãos (Poland e Knutson, 1982), e possivelmente também em leiomiomas uterinos.

Assim como o AHR-ARNT, o receptor de estrógeno (ESR) é um fator de transcrição dependente de ligante. O ESR liga-se aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs) e ativa a transcrição de maneira estrógeno dependente. Esta ativação transcricional requer o recrutamento de complexos de co-ativadores incluindo o complexo da histona acetiltransferase p300 e a proteína de ligação CREB (CBP).

Os estrógenos regulam o crescimento, desenvolvimento e a função reprodutiva em homens e mulheres, tendo sido associados à etiologia de tumores mamários e endometriais (Nilsson et al., 2001; Hewitt et al., 2005; Boverhof et al., 2008).

Nossos resultados mostraram diminuição do nível de expressão do transcrito *ESR2* em 60% (33/55) dos casos de LU analisados. O gene *ESR1* apresentou diminuição dos níveis do transcrito em 43% (24/56) dos casos e níveis aumentados de expressão em 38% (21/56).

Muitos estudos demonstraram que tanto *ESR1* quanto o *ESR2* são expressos no miométrio normal e em LU (Pedeutour et al., 1998; Benassayag et al., 1999; Kovacs et al., 2001; Sakaguchi et al., 2002). Sakaguchi et al. (2002) relataram que os níveis dos transcritos *ESR1* e *ESR2* no miométrio mudam de maneira similar durante o ciclo menstrual, mas que os níveis do mRNA do *ESR1* predominavam sobre o do *ESR2*, indicando que a maioria dos efeitos do estrógeno é mediada pelo *ESR1*. Outro fato interessante é que embora o *ESR1* e *ESR2* possam estimular a transcrição de genes alvo de maneira semelhante, o grau de ativação verificado pelo *ESR2* é menor do que o encontrado pelo *ESR1*. Benassayag et al. (1999) , por RT-PCR semi-quantitativa em dez amostras de LU pareadas com miométrio normal adjacente e Kovacs et al. (2001), pela metodologia de *Western Blot* em 16 amostras de LU também pareadas com miométrio normal adjacente, verificaram que os níveis dos transcritos *ESR1* e *ESR2* estavam elevados em leiomiomas uterinos comparados com miométrio normal. Um subconjunto de leiomiomas uterinos do presente estudo também mostrou aumento dos níveis de expressão dos transcritos *ESR1* (37,5% dos casos) e *ESR2* (16,4% dos casos). Entretanto, foi observada predominantemente a diminuição desses transcritos (43% e 60% dos casos, respectivamente) na casuística estudada.

Embora o *ESR1* seja aceito como responsável pelas funções dos estrógenos no útero, a presença do *ESR2* em diferentes células uterinas, tais como em células musculares lisas uterinas, células componentes das glândulas endometriais e do estroma (Matsuzaki et al., 1999; Gargett et al., 2002) e em células endoteliais dos vasos sanguíneos do endométrio (Critchley et al., 2001), sugere um papel desse receptor na fisiologia do útero. Nesses estudos foram utilizados diferentes procedimentos técnicos como cultura de células, RT-PCR e *Western blotting*. Speirs et al. (2002) sugeriram que a ampla distribuição do *ESR2* deve corresponder a uma função inibitória do *ESR2* na ação do ER. Um papel semelhante para este produto foi sugerido em úteros normais (Weihua et al., 2000).

Valladares et al. (2006) verificaram por imuno-histoquímica que a expressão da proteína *ESR1* é muito variável em termos de células imunorreativas e localização subcelular em leiomiomas uterinos

de pacientes em idade reprodutiva. Em mulheres pós-menopausa o número de receptores encontrado foi maior, entretanto, sua localização foi sempre nuclear. Em contraste, o ESR2 foi encontrado em células endoteliais e de tecidos conectivos, com uma maior quantidade nas células musculares lisas e localização exclusivamente nuclear. A expressão aumentada dos receptores de estrógeno também foi relatada em mulheres durante a menopausa comparando com o seu período fértil (Valladares et al. 2006). Os autores concluíram que um aumento da quantidade de ESR2 deve favorecer o crescimento dos leiomiomas uterinos, sugerindo uma maior relevância deste gene nestes tumores. Nós observamos que o padrão de expressão do transcrito *ESR1* era significativamente aumentado em mulheres na menopausa ($P=0,0415$).

Recentemente, Hassan et al. (2008) demonstraram a utilização de adenovírus capazes de codificar receptores de estrógenos dominantes negativos (DNER) tornando efetiva a supressão da expressão gênica regulada por estrógenos e/ou progesterona em células de leiomiomas humanos. Estes DNER são receptores mutantes incapazes de ativar a transcrição mas que podem suprimir a atividade transcricional dos receptores de estrógenos selvagens (*ESR1* e *ESR2*), quando são co-expressos nas mesmas células.

Bodner et al. (2004) avaliaram o gene *ESR1* em 26 amostras de LU pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Vinte e quatro amostras apresentaram expressão positiva do ESR1, sendo que 12 casos (46%) apresentaram padrão de expressão elevado (2+ ou 3+). Os autores não informaram a fase do ciclo menstrual das pacientes. Estes resultados são contraditórios aos encontrados por análises do transcrito. Estas diferenças podem ser devido a quantidades insuficientes de cDNA para amplificações confiáveis, estratégia de extração de RNA total, que podem limitar a amplificação de transcritos de interesse em análises de expressão gênica. Outra possível causa destas discrepâncias pode ser a variação na eficiência da tradução ou a taxa de degradação de proteína ou RNAm, considerando que a expressão protéica não é diretamente proporcional a expressão de RNAm (Omoto et al., 2002; Shaw et al., 2002).

Nossos estudos também demonstraram uma diminuição significativa nos níveis do transcrito *PGR* em 40% (22/55) e 22% (12/55) de aumento de expressão desse gene nos casos de LU analisados. A proteína *PGR* é dependente de estrógeno, sendo sintetizada devido à estimulação de células-alvo com hormônios estrogênicos (Surowiak et al., 2001; Zaslowski et al., 2005). A interação entre os hormônios esteróides estrógeno e progesterona e seus respectivos receptores tem sido alvo de inúmeros estudos sendo descrito como promotor do crescimento dos LU. Há evidências demonstrando que o estrógeno eleva os níveis de *ESR* e *PGR* no miométrio, enquanto que o efeito da progesterona acarreta na diminuição dos níveis de *ESR* (Hsueh et al., 1975; Thi et al., 1975; Katzenellenbogen, 1980). Essas conclusões são consistentes com a apresentação subsequente desses hormônios durante o ciclo menstrual e observações predominantes que ambos os receptores *ESR* e *PGR* aumentam no miométrio durante a fase proliferativa (folicular) e decaem durante a fase secretória (luteal) do ciclo menstrual (Hsueh et al., 1975; Janne et al., 1975; Thi et al., 1975; Schmidt-Gollwitzer et al., 1979; Soules e McCarty, 1982; Buchi e Keller, 1983; Sadan et al., 1987; Marugo et al., 1989; Rein et al., 1990; Kawaguchi et al., 1991; Adams et al., 1993; Lessl et al., 1997; Englund et al., 1998).

Devido aos níveis diminuídos de *PGR* durante a fase secretória, há relatos que indicam que a progesterona pode diminuir a expressão do seu próprio receptor (Englund et al. 1998); Thi et al. (1975) demonstrou uma diminuição no *PGR* no miométrio de porcos da guiné ovariectomizados quando administrado progesterona. A maioria dos estudos demonstrou a existência de variações cíclicas semelhantes nos níveis de *ESR* e *PGR* em LU, embora haja controvérsias a respeito do grau, ou da existência, desse tipo de diminuição de *ESR* durante a fase secretória (Flake et al., 2003).

A literatura tem apresentado resultados discordantes entre as técnicas de qRT-PCR e IHQ. Recentemente, um trabalho do nosso grupo descrito por Rosa et al. (2008) avaliou o padrão de expressão gênica por RT-PCR e qRT-PCR e expressão protéica por imuno-histoquímica em 80 amostras de câncer de mama. Foram observadas discrepâncias para o gene *ESR1* entre os achados

de RT-PCR e imunohistoquímica em 30% dos casos e entre qRT-PCR e imuno-histoquímica em 22% dos casos, identificando que as diferenças metodológicas representam uma importante variável na detecção de níveis de expressão tanto em nível gênico quanto protéico. A análise de expressão das proteínas ESR1, ESR2 e PGR nas mesmas amostras deste estudo está em andamento (em uma plataforma de *tissue microarrays*) para permitir uma comparação mais refinada entre a análise de transcritos e das proteínas nos mesmos casos.

A expressão diminuída do gene *WNT7A* em leiomiomas uterinos foi observada no presente estudo em 52% dos casos. Li et al. (2001), avaliando o nível de expressão deste gene por RT-PCR quantitativa em 30 amostras de LU, encontraram níveis de expressão menores em leiomiomas uterinos, quando comparados com amostras de miométrio normais em 67% dos casos para o gene *WNT7A*, concordante aos nossos resultados. Entretanto, esses autores identificaram aumento de expressão de *ESR1* nos mesmos casos, identificando uma correlação inversamente proporcional da expressão de *WNT7A* e *ESR1*. Em nossos estudos, quatro amostras de leiomioma uterino (7%) apresentaram diminuição de expressão para o gene *WNT7A* e aumento para o *ESR1*, e três amostras (5%) apresentaram expressão normal de *WNT7A* e aumento de *ESR1*, não tornando esse resultado significativo. Diferentemente dos autores que relataram uma correlação inversa entre os genes *ESR1* e *WNT7A*, nós detectamos uma correlação positiva entre os níveis de expressão desses dois genes (teste de *Spearman*, $P < 0,0001$; $r = 0,5655$).

Apesar das evidências clínicas e experimentais sugerirem fortemente que o crescimento dos leiomiomas uterinos é dependente de hormônios esteróides (Walker et al., 2002), um dos achados surpreendentes dos estudos de *microarray* foi à falta de mudanças significativas dos receptores de estrógeno, receptores de progesterona ou os cofatores dos receptores nucleares (Arslan, 2005). Uma possível explicação é que os hormônios esteróides devem agir por meio dos seus genes alvo, que medeiam os efeitos hormonais (Catherino et al., 2004). Um grupo de genes dependente de estrógeno sugerido pelos dados de *microarray* são os genes envolvidos no metabolismo do ácido retinóico. Outra

possibilidade para esses resultados discrepantes em relação à literatura diz respeito à fase do ciclo menstrual em que se realizou a coleta da amostra controle para comparação com os leiomiomas uterinos, podendo influenciar na comparação dos níveis de expressão do *ESR1*. Entretanto, os autores que utilizaram *microarray* não correlacionaram o nível de expressão e a fase do ciclo menstrual das pacientes com LU.

No presente estudo, dentre as pacientes em fase reprodutiva (cíclicas) foram observados dois grupos divididos de acordo com a fase do ciclo: fase proliferativa (1º ao 14º dia) sob ação de hormônios esteróides e fase secretória (14º ao 28º dia) agindo sob influência predominante da progesterona, além dos hormônios hipofisários FSH e LH. Todos esses hormônios atuam diretamente no endométrio, não sendo clara sua atuação sobre o miométrio uterino.

É possível notar que as amostras controle de miométrio normal, quando agrupadas de acordo com a fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretória), possuíam um perfil de amplificação distinto das amostras de LU, embora sem poder estatístico devido ao baixo número de miométrios normais, mostrando que há um mecanismo envolvido no desenvolvimento de LU que acarreta na perda ou alteração do padrão de expressão de genes relacionados aos esteróides durante o ciclo menstrual feminino.

Já foi estabelecido em literatura que a diminuição do número de ciclos estrogênicos na vida reprodutiva feminina previne o aparecimento de leiomiomas uterinos. Dentre os fatores que interferem no número de ciclos menstruais está a idade da menarca e a paridade. Para a idade da menarca, não foram observadas associações significativas para nenhum dos genes analisados.

Para o nosso conhecimento, há apenas um estudo relatando o uso de expressão do gene *ESR1* por RT-PCR quantitativa em tempo real em leiomiomas uterinos de pacientes pós-menopáusicas (Strissel et al., 2007). A maioria dos dados em literatura utilizam diferentes procedimentos como *Western blot*, imunohistoquímica e RT-PCR semi-quantitativa, apresentando resultados contraditórios aos observados neste estudo na avaliação da expressão dos receptores de estrógeno. Estes estudos

mostram níveis de receptores hormonais similares ou maiores em LU comparados ao miométrio normal (Benassayag et al., 1999; Bodner et al., 2004; Jakimiuk et al., 2004; Wei et al., 2005; Levy et al., 2007; Bakas et al., 2007).

Jakimiuk et al. (2004) utilizaram a metodologia de RT-PCR semi-quantitativa para avaliar os genes *ESR1* e *ESR2* em 17 amostras de LU de mulheres pré-menopáusicas. Os autores não observaram diferença no padrão de expressão dos genes nas amostras de LU quando comparadas as de miométrio normal adjacente, bem como na comparação estatística entre a expressão dos genes e a fase do ciclo menstrual, porém, a expressão do gene *ESR1* nos leiomiomas e no miométrio normal foi maior do que a expressão do gene *ESR2*. Nossos achados foram similares aos dos autores, mostrando que os receptores hormonais parecem não mudar de status no miométrio de mulheres pré-menopáusicas com leiomioma uterino durante as fases do ciclo menstrual. Na verdade, sabe-se que o endométrio passa por alterações no nível de receptores hormonais, entretanto, a modulação destes receptores no miométrio durante as fases do ciclo não está esclarecida (Mertens et al., 2001). O relato de Jakimiuk et al. (2004) é um dos poucos que mostra diminuição de expressão de *ESR1* em nível de RNAm em leiomiomas uterinos, o mesmo observado por nosso grupo.

Recentemente, Strissel et al. (2007) avaliaram o padrão de expressão por qRT-PCR dos genes *ESR1* e *ESR2* em 14 casos de LU e 14 amostras de miométrio normal adjacente de mulheres pós-menopáusicas. Os autores não observaram diferença estatística entre os níveis de expressão do gene *ESR1* nas amostras de LU em relação ao miométrio normal adjacente das pacientes pós-menopáusicas, porém, os níveis de expressão do receptor *ESR2* foram significativamente maiores em amostras de LU comparadas com seu miométrio normal adjacente. Os autores sugeriram que a expressão elevada do *ESR2* deve ser responsável pela regressão ou manutenção do tumor em mulheres pós-menopáusicas. As amostras avaliadas no presente estudo são de mulheres que se encontram no período reprodutivo e/ou pré-menopáusico, diferentemente das pacientes utilizadas por Strissel et al. (2007). Cramer e Patel (1990) descreveram que a incidência de leiomiomas em mulheres

pós-menopáusicas não foi menor que a incidência em mulheres pré-menopáusicas, embora os leiomiomas pós-menopáusicos eram menores e em menor quantidade.

Nossos estudos demonstraram que as pacientes menopáusicas (oito amostras) expressam níveis significativamente maiores do receptor de estrógeno *ESR1* quando comparadas às pacientes pré-menopáusicas ($P=0,0415$). Alguns estudos mostram que não existe uma diferença mínima nos níveis de RNAm entre LU e miométrio normal nas análises de RT-PCR e cDNA-microarray (Viville et al., 1997; Catherino et al., 2004), o que sugeriu aos autores a presença de uma modulação pós-transducional destes receptores.

Entre outros fatores de risco associados com o desenvolvimento de leiomiomas uterinos estão incluídos a idade tardia da primeira gravidez e o número reduzido de filhos (Chen et al., 2001). No presente estudo, foi observada a associação entre as pacientes que tiveram sua primeira gestação em idade inferior a 22 anos com a diminuição do nível de expressão para os genes *ESR1* ($P=0,0114$) e *WNT7A* ($P=0,0350$) em leiomiomas comparados ao miométrio normal. Quatro dos cinco genes analisados: *AHR* ($P=0,0096$), *ESR1* ($P=0,0031$), *ESR2* ($P=0,0253$) e *WNT7A* ($P=0,0126$) apresentaram nível de expressão diminuídos nos tumores de pacientes cuja paridade era inferior a três. Assim, estes genes podem ser considerados importantes fatores de predisposição para o desenvolvimento desta neoplasia.

Vários estudos têm demonstrado uma associação inversa entre a paridade e o risco de desenvolvimento de LU (Ross et al. 1986; Lumbiganon et al. 1996; Parazzini et al. 1996; Samadi et al. 1996). Foi relatado um risco relativo de 0,5 menor de desenvolvimento de LU em mulheres com filhos quando comparados com mulheres de paridade nula (Parazzini et al., 1988). Foi demonstrado também um declínio progressivo no risco relativo com o número de gestações (Ross et al., 1986; Lumbiganon et al., 1996; Parazzini et al., 1996; Marshall et al., 1998; Sato et al., 2000) concluindo-se que a gravidez reduz o tempo de exposição aos estrógenos, enquanto que a nuliparidade ou o número reduzido de

paridade pode estar associado com ciclos anovulatórios caracterizados por exposições a longo prazo de estrógenos (Flake et al., 2003).

Outra possibilidade é os LU serem realmente a causa da infertilidade, ao invés da sua consequência; entretanto, a diminuição do risco relativo de LU associados à paridade permanece essencialmente a mesma após a exclusão de mulheres com história de infertilidade (Marshall et al., 1998).

Nossos achados corroboram para a hipótese de que a paridade elevada nas mulheres protege, por algum mecanismo, o aparecimento de LU. Porém, não sabemos se o baixo número de gestações é a causa ou a consequência do desenvolvimento dos LU. Não temos dados em nossa casuística que justifiquem se, as mulheres com baixa ou nula paridade se devem pelo aparecimento inicial dos LU, o qual acarretaria na infertilidade ou em abortos recorrentes ou se essas mulheres, após a ausência de gestações, apresentaram risco aumentado para desenvolverem esses tumores.

Os leiomiomas uterinos estão associados com subfertilidade em 5 a 10% dos casos, porém, quando todas demais causas para disfunções reprodutivas são excluídas, os LU essa frequência cai para 2 a 3% dos casos (Buttram e Reiter, 1981). Embora haja muitos estudos que avaliam a correlação entre os LU e infertilidade, os mecanismos pelos quais esses tumores afetam na função uterina permanecem obscuros. Inúmeras teorias foram postuladas para desvendar esse mecanismo, entre elas um relato que correlaciona condições hiperestrogênicas em fibróides resultando em subfertilidade (Deligdish e Loewenthal, 1970), além de alterações patológicas no endométrio como atrofia, distorção das glândulas, ulceração e ectasia venular, assim como disfunções na contratilidade uterina interferem no transporte normal do espermatozoide, do óvulo e do embrião, interferindo na nidação (Richards et al., 1998; Casini et al., 2006; Khaund e Lumsden, 2008).

No passado, quando a contra-concepção não era disponível, as mulheres eram praticamente livres de menstruações devido ao alto número de paridades (Short, 1984). Atualmente, as mulheres

chegam a ter até 400 menstruações durante a idade reprodutiva, ocasionando grandes alterações menstruais e aumentando o risco do surgimento de leiomiomas uterinos (Klatsky et al., 2008).

Outro achado do presente estudo foi a correlação entre um maior nível de expressão do gene *PGR* em mulheres brancas quando comparadas às mulheres não-brancas. Dados em literatura indicam que mulheres afro-americanas possuem um risco três vezes maior de desenvolverem LU do que mulheres brancas (Schwartz, 2001). Entretanto, a população brasileira é altamente miscigenada, resultado de cinco séculos de cruzamento inter-étnico entre indivíduos de três continentes: os colonizadores Europeus e imigrantes, escravos africanos e Ameríndios, assim, a estratificação de pacientes quanto à raça se torna um assunto controverso (Pimenta et al., 2006). Por essa razão consideramos apenas a cor segundo os parâmetros estabelecidos em material e métodos.

Recentemente, Gomes et al. (2007) compararam um polimorfismo na região codificadora do domínio de ligação ao hormônio do gene *PGR* em 122 mulheres brasileiras brancas e não-brancas com leiomiomas uterinos. Esta variante aparentemente permite uma codificação alternativa do éxon 8 e conseqüente expressão de *PGR* aberrante, como perda de capacidade de ligação ao ligante e ativação transcricional (Rowe et al., 1995). Sessenta e uma pacientes declararam-se brancas e 61 não-brancas (mulatas e negras). Os autores identificaram 10/61 (16%) mulheres brancas portadoras de pelo menos um alelo polimórfico *versus* 3/61 (4,9%) mulheres não-brancas que apresentaram o mesmo alelo. Eles concluíram que apenas em mulheres não brancas foi observada uma “proteção” dos alelos em relação a ocorrência dos fibróides. O mesmo resultado não foi encontrado para mulheres brancas que não apresentaram nenhuma associação entre polimorfismo e presença da doença. O tamanho da amostra, a natureza multifatorial da doença e o comportamento heterogêneo dos LU, especialmente em grupos étnicos distintos, podem justificar estes achados. Os achados dos autores não se aplicam aos nossos, porém, vale a pena ser ressaltado tratando-se do único relato que avaliou *PGR* em mulheres brasileiras.

Em resumo, o presente estudo permitiu identificar o padrão de expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *WNT7A* em leiomiomas uterinos revelando algumas associações significativas como o baixo nível de expressão do *AHR* em LU quando comparados aos miométrios normais. Além disso, 60% dos casos apresentaram diminuição de expressão do gene *ESR2*. O padrão de expressão dos genes *AHR* e *ESR1* mostrou-se significativamente aumentado em mulheres na pós-menopausa. Algumas associações com parâmetros como fase do ciclo menstrual, idade da primeira gestação, e paridade mostraram-se também significantes. Os dados do presente estudo contribuem para um melhor conhecimento da biologia dos leiomiomas uterinos e revela o envolvimento dos genes associados aos esteróides como relevantes no desenvolvimento destes tumores. Estudos adicionais podem contribuir para o delineamento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento desta freqüente neoplasia ginecológica.

Conclusão

Conclusão

Neste estudo foi observada a diminuição da expressão dos genes *AHR*, *ESR1*, *WNT7A*, *ESR2* e *PGR* em um número considerável de amostras de leiomiomas uterinos e uma correlação positiva entre os genes *AHR* e *ESR1* e os genes *WNT7A* e *ESR1*, sugerindo o envolvimento da via Wnt e da via dos hormônios esteróides no desenvolvimento destes tumores.

Os estrógenos ligados aos ERs têm capacidade de alterar a sinalização do Wnt e promover mudanças drásticas na morfologia e fisiologia celular. Determinar como a ação dos ERs interage com o eixo Wnt/ β -catenina/Tcf para regulação do ciclo celular normal e patológico é um grande desafio para o desenvolvimento de inibidores de moléculas alvo, assim como estudar a real atuação das dioxinas na regulação da expressão dos hormônios esteróides.

É concebível que haja um grande interesse na utilização de novos métodos científicos para explorar receptores esteróides, além dos genes *AHR* e *WNT7A* como potenciais alvos terapêuticos para leiomiomas uterinos. Análises futuras para a identificação dos níveis protéicos desses receptores serão necessárias para confirmar nossos achados de expressão gênica e corroborar para a hipótese de serem os receptores estrogênicos importantes genes alvos no desenvolvimento de leiomiomas uterinos e o gene *AHR* um importante alvo terapêutico para o tratamento destes tumores.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ABDELRAHIM, M.; SMITH, R.; SAFE, S. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. **Mol Pharmacol.** v.63, n.6, p.1373-81, 2003.
- ADAMS, A. et al. Regulation of estrogen (E) and progestin (P) receptors (R) in leiomyomas during the cycle and leuprolide acetate treatment. In: **Proceedings of the Forty-Ninth Annual Meeting of the American Fertility Society**, 11–14 October 1993, Montreal, Quebec, Canada. Birmingham, AL: The American Fertility Society, S134. 1993.
- AL-HENDY, A. et al. Gene therapy of uterine leiomyomas: adenovirus-mediated expression of dominant negative estrogen receptor inhibits tumor growth in nude mice. **Am J Obstet Gynecol.** v.19, p.1621-31, 2004.
- AL-HENDY, A.; SALAMA, S. Gene therapy and uterine leiomyoma: a review. **Hum Reprod Update.** v.12, n.4, p.385–400. 2006.
- ALI, S. et al. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. **EMBO J.** v.12, n.3, p.1153-60. 1993.
- ANDERSSON, P. et al. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.99, n.15, p.9990-5. 2002.
- ARSLAN, A.A. Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. **Hum Reprod.** v.20, n.4, p.852-63. 2005.
- BABA, T. et al. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. **Mol Cell Biol.** v.25, p.10040–51. 2005
- BAKAS, P. et al. Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. **Fertil Steril.** 2007.
- BARBIERI, R.L.; ANDERSEN, J. Uterine leiomyomas. The somatic mutation theory. **Sem Reprod Endocrinol.** v.10, p.301-309. 1992.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell.** v.56, p.335–344. 1989.
- BEKKER, G. et al. Symptomatic fibroid uterus in a 15-year-old girl. **Int Surg.** v.89, n.2, p.80-2. 2004.
- BENASSAYAG, C. et al. Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. **Am J Physiol.** v.276, p.1112-18, 1999.
- BENASSAYAG, C. et al. Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. **Am J Physiol.** v.276, n.6, p.1112-8. 1999.

- BODNER, K. et al. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors. **Fertility and Sterility**, v.81, n.4, 2004.
- BOVERHOF, D.R. et al. Inhibition of estrogen-mediated uterine gene expression responses by dioxin. **Mol Pharmacol**. v.73, n.1, p.82-93. 2008
- BOZZINI, N. FEBRASGO – Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, Manual de Orientação: Leiomioma Uterino – São Paulo. p.117, 2004.
- BRANDON, D.D. et al. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomas. **J Clin Endocrinol Metab**; v.80,p.1876-81.1995.
- BRAUZE, D. et al. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. **Toxicol Lett**. v.167, n.3, p.212-20. 2006.
- BRZOZOWSKI, A.M. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**. v.75389, n.6652, p.753-8. 1997.
- BUCHI, K.A.; KELLER, P.J. Cytoplasmic progestin receptors in myomal and myometrial tissues. Concentrations and hormonal dependency. **Acta Obstet Gynecol Scand**. v.62, p.487–492. 1983.
- BUI T.D. et al. Expression of Wnt5a is downregulated by extracellular matrix and mutated c-Ha-ras in the human mammary epithelial cell line MCF-10A. **Biochem Biophys Res Commun**. v.239, n.3, p.911-7, 1997.
- BUTTRAM, V.C.; REITER. R.C. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. **Fertil Steril**. v.36 p.433–45. 1981.
- CANEVARI, R.A. et al. Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis. **Am J Obstet Gynecol**. v.193, n.4,p.1395-1403. 2005b.
- CANEVARI, R.A.; PONTES. A.; ROGATTO. S.R. Microallelotyping defines novel regions of loss of heterozygosity in uterine leiomyomas. **Mol Carcinog**.v.42, n.3, p.177-82. 2005a.
- CANEVARI, R.A.; ROGATTO, S.R. Uterine Leiomyoma: updates in cytogenetics and molecular analysis. **Recent Advances Research Updates**. v.7, n.2, p.187-206. 2006.
- CARLSON, K.J.; MILLER, B.A.; FOWLER, F.J. The Maine Women's Health Study: II, outcomes of nonsurgical management of leiomyomas, abnormal bleeding, and chronic pelvic pain. **Obstet Gynecol**. v.83, p.566-72. 1994.
- CASINI, M.L. et al. Effects of the position of fibroids on fertility. **Gynecol Endocrinol**, v.22, p.106–109. 2006.

- CATHERINO, W.; MALIK, M. Uterine leiomyomas express a molecular pattern that lowers retinoic acid exposure. **Fertil Steril**, v.87, n.6, p.1388-98. 2007.
- CATHERINO, W.H. et al. Reduced dermatopontin expression is a molecular link between uterine leiomyomas and keloids. **Genes Chromosomes Cancer**. v.40, p.204–17. 2004.
- CHEGINI, N. et al. Gene expression profile of leiomyoma and myometrium and the effect of gonadotropin releasing hormone analogue therapy. **J Soc Gynecol Investig**. v.10,n.3, p.161-71. 2003.
- CHEN, C.R. et al. Risk factors for uterine fibroids among women undergoing tubal sterilization. **Am J Epidemiol**, v.153 p.27-29. 2001.
- CHEN, H.W. et al. Combined differential gene expression profile and pathway enrichment analyses to elucidate the molecular mechanisms of uterine leiomyoma after gonadotropin-releasing hormone treatment. **Fertil Steril**. 2008.
- COOK, J.D.; WALKER , C.L. The Eker rat: establishing a genetic paradigm linking renal cell carcinoma and uterine leiomyoma. **Curr Mol Med**. v.4, n.8, p.813-24. 2004.
- CORONADO, G.D.; MARSHALL, L.M.; SCHWARTZ, S.M. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. **Obstet Gynecol**. n.95, p.764-9. 2000.
- COTRAN, R.S.; Kumar, V. Robbins, S.L. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989.
- COUSE, J.F. et al., Estrogen Receptor- α Knockout Mice Exhibit Resistance to the Developmental Effects of Neonatal Diethylstilbestrol Exposure on the Female Reproductive Tract. **Dev. Biol**. v.238,n.2, p.224–38. 2001.
- CRAMER, S.F.; PATEL, A. The frequency of uterine leiomyomas. **Am J Clin Pathol**. v.94 p.435-8. 1990.
- CRITCHLEY, H.O. et al. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. **J Clin Endocrinol Metab**. v.86, n.3, p.1370-8. 2001.
- DATASUS. <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>>. Acesso em 27 de janeiro de 2007.
- DELIGDISH, L.; LOEWENTHAL, M. Endometrial changes associated with myomata of the uterus. **J Clin Pathol**. v.23, p.676–680. 1970.
- DI LIETO, A. et al. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. **J Soc Gynecol Investig**. v.12, n.2, p.123-128. 2005.

- DIESEN, D.L.; PRICE, T.M.; SKINNER, M.A. Uterine leiomyoma in a 14-year-old girl. **Eur J Pediatr Surg**. v.18, p.53-55. 2008.
- DRUMMOND, A.E. et al. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. **Mol Cell Endocrinol**. v.191, n.1, p.27-33. 2002.
- ELIZONDO, G. et al. Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. **Mol Pharmacol**. v.57, n.5, p.1056-63. 2000.
- ENGLUND, K. et al. Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. **J Clin Endocrinol Metab** v.83, p.4092–4096. 1998.
- ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **J Clin Endocrinol Metab**. v.82, n.12, p.4258-65. 1997.
- ENTREZ GENE. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>. Acesso em 03 de novembro de 2008.
- ESTEVA, F.J.; HORTOBAGYI, G.N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. **Breast Cancer Res**. v.6, p.109–18. 2004.
- FERENCZY, A.; RICHART, R.M.; OKAGAKI, T. A comparative ultrastructural study of leiomyosarcoma, cellular leiomyoma, and leiomyoma of the uterus. **Cancer**. v.28 ,p.1004–18. 1971.
- FERRO, P. et al. Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanisms of exon skipping. **Int J Mol Med**. v.12, n.3, p.355-63. 2003.
- FIELDS, K.R.; NEINSTEIN, L.S. Uterine myomas in adolescents: case reports and a review of the literature. **J Pediatr Adolesc Gynecol**. v.9, p.195-8. 1996.
- FINDLAY, J.K. et al. The road to ovulation: the role of oestrogens. **Reprod Fertil Dev**. V.13, n.7-8 p. 543-7. 2001.
- FLAKE, G.P.; ANDERSEN, J.; DIXON, D. Etiology and Pathogenesis of Uterine Leiomyomas: A Review. **Environ Health Perspect**. v.111, p.1037–1054. 2003.
- FUKUSHIMA-UESAKA, H. et al. Genetic variations of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet**, v.19, n.4, p.320-6. 2004.
- NATIONAL UTERINE FIBROIDS FOUNDATION. <http://www.nuff.org/health_uterinefibroids.htm>. Acesso em 06 de junho de 2008.
- GALIEN, R.; GARCIA, T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. **Nucleic Acids Res**. v.25, n.12, p.2424-9. 1997.

- GARGETT, C.E. et al. Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. **Hum Reprod.** v.14, n.8, p.2080-8. 1999.
- GASIEWICZ, T.A. Dioxins and the Ah receptor: probes to uncover processes in neuroendocrine development. **Neurotoxicology.** v.18, n.2, p.393-413. 1997.
- GOMES, M.T.V. et al. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. **Fertil and Steril.** v.87, n.5. 2007.
- GONZALEZ, F.J.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. **Drug Metab Dispos.** v.26, n.12, p.1194-8. 1998.
- GUSTAFSSON, J.A.; WARNER, M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.74, p.245–48. 2000.
- HALL, J.M.; KORACH, K.S. Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. **J Biol Chem.** v.277, n.46, p.44455-61. 2002.
- HASHIMOTO, K. et al. Clonal determination of uterine leiomyomas by analyzing differential inactivation of the X-chromosomelinked phosphoglycerokinase gene. **Gynecol Obstet Invest.** v.40, p.204-8. 1995.
- HASSAN, M.H. et al. Adenovirus-mediated delivery of a dominant-negative estrogen receptor gene in uterine leiomyoma cells abrogates estrogen- and progesterone-regulated gene expression. **J Clin Endocrinol Metab.** v.92, n.10, p.3949-57. 2007.
- HENNIG, Y. et al. Chromosomal translocations affecting 12q14–15 but not deletions of the long arm of chromosome 7 associated with a growth advantage of uterine smooth muscle cells. **Mol Hum Reprod.** v.5 p.1150–54. 1999.
- HEWITT, S.C.; DEROO, B.J.; KORACH, K.S. Signal transduction. A new mediator for an old hormone? **Science.** v.307, n.5715, p.1572-3. 2005.
- HILLIER, L.W. et al. The DNA sequence of human chromosome 7. **Nature.** v.424 p.157-64. 2003.
- HOFFMAN, P.J. et al. Molecular characterization of uterine fibroids and its implication for underlying mechanisms of pathogenesis. **Fertil Steril.** v.82, n.3, p.639-49. 2004.
- HOUSTON, K.D. et al. Uterine leiomyomas: mechanisms of tumorigenesis. **Toxicol Pathol.** n.29, p.100-04. 2001.
- HSUEH, A.J.; PECK, E.J. JR.; CLARK, J.H. Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. **Nature,** v. 254, p.337–339. 1975.

- HUBBARD, T. et al. The Ensembl genome database project. **Nucleic Acids Res.** v.30 p.38–41. 2002.
- HUMAN INTERACTOME MAP. <<http://www.himap.org>>. Acesso em 03 de julho de 2008.
- ING, N.H. et al. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). **J Biol Chem.** v.267 p.17617–23. 1992.
- ISHWAD, C.S. et al. Molecular and cytogenetic analysis of chromosome 7 in uterine leiomyomas. **Genes chromosomes cancer.** v.14, n.1, p.51-55. 1995.
- ISHWAD, C.S. et al. Two discrete regions of deletion at 7q in uterine leiomyomas. **Genes Chromosomes Cancer.** v.19, n.3. p.156-60. 1997.
- JACOB, J. et al. Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. **Mol Cell Endocrinol.** v.246, n.1-2, p.34-41. 2006.
- JAKACKA, M. et al. Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. **J Biol Chem.** v.276, n.17, p.13615-21. 2001.
- JAKIMIUK, A.J. et al. Estrogen receptor alpha and beta expression in uterine leiomyomas from premenopausal women. **Fertil Steril.** v.82, n.3, p.1244-49. 2004.
- JANNE, O. et al. Oestrogeninduced progesterone receptor in human uterus. **J Steroid Biochem.** v.6, p.501–509. 1975.
- JOEL, P.B.; TRAISH, A.M.; LANNIGAN, D.A. Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem.** V.273, n.21, p.13317-23. 1998.
- KATZENELLENBOGEN BS. Dynamics of steroid hormone receptor action. **Annu Rev Physiol.** v.42, p.17–35. 1980.
- KAWAGUCHI, K. et al. Immunohistochemical analysis of oestrogen receptors, progesterone receptors and Ki-67 in leiomyoma and myometrium during the menstrual cycle and pregnancy. **Virchows. Arch A Pathol Anat Histopathol.** V.419, p.309–315. 1991.
- KAWAGUCHI, K. et al. Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol.** v.160, p.637–41. 1989.
- KAWAGUCHI, K. et al. Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. **Gynecol Oncol.** v.21, n.1, p.32-41. 1985.
- KESHGEGIAN, A.A.; CNAAN, A. Estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma: poor clinical outcome. **Arch Pathol Lab Med.** v.120, p.970–73. 1996.

- KHAUND, A.; LUMSDEN, M.A. Impact of fibroids on reproductive function. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** v.22, n.4, p.749-60. 2008.
- KHORRAM, O.; GARTHWAITE, M., GOLOS, T. Uterine and ovarian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in benign and malignant gynaecological conditions. **Mol Hum Reprod.** v.8, n.1, p.75-80. 2002.
- KJERULFF, K.H. et al. Uterine leiomyomas: racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. **J Reprod Med.** v.41, p.483-90. 1996.
- KLATSKY, P.C. et al. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. **Am J Obstet Gynecol.** v.198, n.4, p.357-66. 2008.
- KLINGE, C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. **Steroids.** v.65 p.227–51. 2000.
- KOBAYASHI, A. et al. CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). **J Biochem.** v.122:703–10. 1997.
- KOGAN, E.A. et al. Ignatova VE, Rukhadze TN, Kudrina EA, Ishchenko AI. A role of growth factors in development of various histological types of uterine leiomyoma. **Arkh Patol.** v.67, n.3, p.34-38. 2005.
- KOHAMA, T. et al. Large uterine myoma with erythropoietin messenger RNA and erythrocytosis. **Obstet Gynecol.** v.96 p.826–28. 2000.
- KOUSTENI, S. et al., Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell.** v.104, p.719–30. 2001.
- KOVÁCS, K.A. et al. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. **Mol Hum Reprod.**, v.11, p.1085-91, 2001.
- KRISHNAN, V.; WANG, X.; SAFE. S. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. **J Biol Chem.** V.269, n.22, p.15912-17. 1994.
- KUIPER, G.G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.93 p.5925–30. 1996.
- KUMAR, M.B.; PERDEW, G.H. Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. **Gene Expression.** v.8 p.273–86. 1999.
- LAHVIS, G.P.; BRADFIELD, C.A. Ahr null alleles: distinctive or different? **Biochem. Pharmacol.** v.56 p.781–87. 1998.

- LAWRENCE, A.S. et al. Management of submucous uterine fibroid with buserelin, gemeprost and hysteroscopic resection. **Med J Aust.** v.154, n.4, p.280-82. 1991.
- LEPPERT, P.C.; CATHERINO, W.H.; SEGARS, J.H. A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. **Am J Obstet Gynecol.** v.195 p.415-20. 2006.
- LESSL, M. et al. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. **J Clin Endocrinol Metab** v.82, p.2596–2600. 1997.
- LEVY, B.; MUKHERJEE, T.; HIRSCHHORN, K. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyomata and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet.** v.121 p.1-8. 2000.
- LEVY, M. et al. Differential expression of selected gene products in uterine leiomyomata and adenomyosis. **Fertil Steril.** v.88, n.1, p.220-3. 2007.
- LI, S. et al. Decreased expression of WNT7A mRNA is inversely associated with the expression of estrogen receptor-alpha in human uterine leiomyoma. **J Clin Endocrinol Metab.** v.86 p.454-57. 2001.
- LIGON, A.H.; MORTON, C.C. Genetics of uterine leiomyomata. **Genes Chromosomes Cancer.** v.28, p.235-45. 2000.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods.** v.25, n.4, p.402-08. 2001.
- LUMBIGANON, P. et al. Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study. **Br J Obstet Gynaecol.** V.103, p.909–914. 1996.
- MANGIONI, S. et al. Overexpression of the Wnt5b Gene in Leiomyoma Cells: Implications for a Role of the Wnt Signaling Pathway in the Uterine Benign Tumor. **J Clin Endocrinol Metab.** v.90, n.9, p.5349–55. 2005.
- MAO, X. et al. Allelotype of uterine leiomyomas. **Cancer Genet Cytogenet.** v.114, n.2, p.89-95. 1999.
- MARSHALL, L.M. et al. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. **Fertil Steril.** v. 70, p.432–439. 1998a.
- MARUGO, M. et al. Estrogen and progesterone receptors in uterine leiomyomas. **Acta Obstet Gynecol Scand.** v.68, p.731–735. 1989.

- MARUO, T. et al. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. **Hum Reprod Update**. v.10, n.3, p.207-20. 2004.
- MATSUZAKI, S. et al. Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Mol Hum Reprod**. v.5, n.6, p.559-64. 1999.
- MATTHEWS, J. et al. Co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorinated biphenyl and non-co-planar 2,2',4,6,6'-pentachlorinated biphenyl differentially induce recruitment of oestrogen receptor α to aryl hydrocarbon receptor target genes. **Biochem. J.** v.406, p.343-53. 2007.
- MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Prog Horm Res**. v.57, p.357-84, 2002.
- MENDELSON, M.E. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. **Am J Cardiol**. v.90, n.1A, p.3F-6F. 2002.
- MERICSKAY, M.; CARTA. L.; SASSOON. D.; Diethylstilbestrol exposure in utero: a paradigm for mechanisms leading to adult disease. **Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol**. v.73, p.133-35. 2005.
- MERTENS, H.J. et al. Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the menstrual cycle. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v.98, n.1, p.58-65. 2001.
- MILLER, C.; DEGENHARDT, K.; SASSOON, D.A. Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. **Nat Genet**. V.20, n.3, p.228-30. 1998.
- MILLER, C.; SASSOON, D.A. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. **Development**. V.125, n.16, p.3201-11. 1998.
- MOENNIKES, O. et al. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. **Cancer Res**. v.64,n.14, p.4707-10. 2004.
- MOOREHEAD, M.E.; CONARD, C.J. Uterine leiomyomas. A Treatable condition. **Ann N Y Acad Sci**. v.948, p.121-129. 2001.
- MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett**, v.392, p.49-53. 1996.
- NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev**. v.81, n.4, p.1535-65. 2001.
- NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. **Breast Cancer Res**. v.2, n.5, p.360-66. 2000.
- O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr Rev**. v.22, n.3, p.289-318. 2001.
- OHTAKE, F. et al. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. **Biochem Biophys Res Commun**. v.370, n.4, p.541-46. 2008.

- OHTAKE, F. et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. **Nature**. v.423, n.6939, p. 545-50. 2003.
- OMOTO, Y. et al. Evaluation of oestrogen receptor beta wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. **Eur J Cancer**, v.38, p.380-86. 2002.
- PACKENHAM, J.P. et al. Analysis of genetic alterations in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas by comparative genomic hybridization. **Mol Carcinog**. v.19 p.273-79. 1997.
- PAECH, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science**. v.277, p.1508–10. 1997.
- PARAZZINI, F. et al. Epidemiologic characteristics of women with uterine fibroids: a case-control study. **Obstet Gynecol**. v.72, p.853–857. 1988.
- PARAZZINI, F. et al. Reproductive factors and risk of uterine fibroids. **Epidemiology**. v.7, p.440–442. 1996.
- PARKER, W.H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. **Fertil Steril**. v.87, p725–36. 2007.
- PARR, B.A.; MCMAHON, A.P. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. **Nature**. v.374, p.350-53. 1995.
- PEDEUTOUR, F. et al. Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata. **Genes Chromosomes Cancer**. v.23, n.4, p.361-6.1998.
- PETRULIS, J.R.; PERDEW, G.H. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. **Chem Biol Interact**. v.141, n.1-2, p.25-40. 2002.
- PIKE, A.C. et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. **EMBO J**. v.18, n.17, p.4608-18. 1999.
- PIMENTA, J.R. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Hum Hered**. v.62, n.4, p.190-5. 2006.
- PLATET, N. et al. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. **Crit Rev Oncol Hematol**. v.51, n.1, p.55-67. 2004.
- POLAND, A.; KNUTSON, J.C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.22, p.517-54. 1982
- QUADE, B.J. et al. Molecular pathogenesis of uterine smooth muscle tumors from transcriptional profiling. **Genes Chromosomes Cancer**. v.40, n.2, p.97-108. 2004.

- QUADE, B.J. Pathology, cytogenetics and molecular biology of uterine leiomyomas and other smooth muscle lesions. **Curr Opin Obstet Gynecol.** v.7 p.35-42. 1995.
- REGIDOR, P.A. et al. Estrogen and progesterone receptor content of GnRH analogue pretreated and untreated uterine leiomyomata. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v.63, n.1, p.69-73. 1995.
- REID, G. et al. Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation. **Cell Mol Life Sci.** v.59, n.5, p.821-31. 2002.
- REIN, M.S. et al. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate. **Fertil Steril.** v.53, p.1018–1023. 1990c.
- REIN, M.S.; BARBIERI, R.L.; FRIEDMAN, A.J. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. **Am J Obstet Gynecol.** v.160, p.14-18. 1995.
- REIN, M.S.; NOWAK, R.A. Biology of uterine myomas and myometrium in vitro. In Barbieri RL (eds) **Seminars in Reproductive Endocrinology.** Thieme, New York, USA. p.310-19. 1992
- RIBY, J.E. et al. Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. **Biochem Pharmacol.** v.60, p.167–77. 2000.
- RICHARDS, P.A.; RICHARDS, P.D.; TILTMAN, A.J. The ultrastructure of fibromyomatous myometrium and its relationship to infertility. **Hum Reprod Update,** v.4, p. 520–525. 1998.
- RIKALA, S.M. et al. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. **Hum Pathol.** v.29, p.476-81. 1998.
- ROGATSKY, I.; TROWBRIDGE, J.M.; GARABEDIAN, M.J. Potentiation of human estrogen receptor α transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. **J Biol Chem.** v.274, n.32, p.22296-302. 1999.
- ROGATTO, S.R. et al. Integrated molecular and cytogenetic analyses of uterine leiomyoma identifies novel imbalances of chromosomes 3q27, 7p21, 8q21.1, 15q26 and 20p21. **Ann Genet.** v.46, p.168. 2003.
- ROGERS, J.M.; DENISON, M.S. Analysis of the antiestrogenic activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human ovarian carcinoma BG-1 cells. **Mol Pharmacol.** v.61, n.6, p.1393-403. 2002.
- ROMKES, M.; PISKORSKA-PLISZCZYNSKA, J.; SAFE, S. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.87, n.2, p.306-14. 1987.
- ROSA, F.E. et al. Polymorphisms of CYP17A1, CYP19, and androgen in Brazilian women with uterine leiomyomas. **Clin Chem Lab Med.** v.46, n.6, p.814–23. 2008.

- ROSS, R.K. et al. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. **Br Med J**. v.293, p.359-62. 1986.
- ROSS, R.K. et al. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. **Br Med J (Clin Res Ed)**. v.293, p.359-362. 1986.
- ROWE, S.M. et al. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. **Cancer Res**. v.55, p.2743-5. 1995.
- SADAN, O. et al. Oestrogen and progesterone receptor concentrations in leiomyoma and normal myometrium. **Ann Clin Biochem**. v.24, p.263-267. 1987.
- SAFE, S.; KRISHNAN, V. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. **Arch Toxicol Suppl**. v.17, p.99-115. 1995.
- SAKAGUCHI, H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in uterine endometrial and ovarian cancers. **Eur J Cancer**. v.38, n.6, p.74-75. 2002.
- SAMADI, A.R., et al.. Risk factors for self-reported uterine fibroids: a case-control study. **Am J Public Health**. v.86, p.858-862. 1996.
- SASSOON, D. Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.158, p.1-19. 1995.
- SATO, F. et al.. Fertility and uterine size among Asian women undergoing hysterectomy for leiomyomas. **Int J Fertil**. v.45, p.34-37. 2000a.
- SAVILLE, B. et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. **J Biol Chem**. v.275, p.5379-87. 2000.
- SCHERER, S.W. et al. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. **Science**. v.300, n.5620, p.767-72. 2003.
- SCHMIDT, J.V.; BRADFIELD, C.A. Ah receptor signaling pathways. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v.12, p.55-89. 1996.
- SCHMIDT-GOLLWITZER, M. et al.. Determination of estradiol, estrone, and progesterone in serum and myometrium: correlation with the content of sex steroid receptors and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity throughout the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**. v.49, p.370-376. 1979.
- SCHWARTZ, S.M. Epidemiology of uterine leiomyomata. **Clin Obst Gynecol**. v.44, n.316-26. 2001.

- SHAW, J.A. et al. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. **J Pathol.** v.198, p.450-57. 2002.
- SHORT, R.V. Oestrous and menstrual cycles. In *Hormonal Control of Reproduction*. Edited by: Austin C.R., Short R.V. Cambridge: Cambridge University Press. p.115-52. 1984.
- SKUBITZ, K.M.; SKUBITZ, A.P. Differential gene expression in leiomyosarcoma. **Cancer.** v.98, n.5, p.1029-38. 2003.
- SOULES, M.R.; MCCARTY, K.S. Jr. Leiomyomas: steroid receptor content. Variation within normal menstrual cycles. **Am J Obstet Gynecol.** v.143, p.6–11. 1982.
- SOZEN, I.; ARICI, A. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. **Fertil Steril.** v.78,n.1, p.1-12. 2002.
- SPEIRS, V. et al. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. **J Clin Pathol.** v.55, n.5, p.371-4. 2002.
- SPINK, D.C. et al. Stimulation of 17 beta-estradiol metabolism in MCF-7 cells by bromochloro- and chloromethyl-substituted dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: correlations with antiestrogenic activity. **J Toxicol Environ Health.** v.41, n.4, p.451-66. 1994.
- STEWART, E.A. et al. Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.** v.79, p.900–6. 1994.
- STEWART, E.A. Uterine Fibroids (Seminar). **Lancet.** v.357, p.293-98. 2001.
- STEWART, E.A.; MORTON, C.C. The Genetics of Uterine Leiomyomata. **Obstetrics & Gynecology.** v.107, n.4, p.917-21. 2006.
- STOVALL, D.W. Clinical symptomatology of uterine leiomyomas. **Clin Obstet Gynecol.** n.44, p.364-71. 2001.
- STRISSEL, P.L. et al. Transcriptional analysis of steroid hormone receptors in smooth muscle uterine leiomyoma tumors of postmenopausal patients. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.107, n.1-2, p.42-47. 2007.
- SUROWIAK, P. et al. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. **Folia Histochem Cytobiol,** v.39, p.141–42. 2001.
- SWARTZ, C.D. et al. Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. **Mol Hum Reprod.** v.11, n.6, p.441–50. 2005.

- TELLES, E.E. Racial ambiguity among the Brazilian population. **Ethn Racial Stud.** v.25, p.415-41. 2002.
- THI, M.T.; BAULIEU, E.E.; MILGROM, E. Comparison of the characteristics and of the hormonal control of endometrial and myometrial progesterone receptors. **J Endocrinol.** v.66, p.349–356. 1975.
- TOWNSEND, D.E. et al. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Am J Obstet Gynecol.** v.107, p.1176-79. 1970.
- TOWNSON, S.M.; O'CONNELL, P. Identification of estrogen receptor alpha variants in breast tumors: implications for predicting response to hormonal therapies. **J Surg Oncol.** v.94, n.4, p.271-3. 2006.
- TREMBLAY, G.B. et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. **Mol Endocrinol.** v.11, n.3, p.353-65. 1997.
- TSIBRIS, J.C. et al. Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata. **Fertil Steril.** v.78, n.1, p.114-21. 2002.
- UNIFIED HUMAN INTERACTOME. <<http://www.mdc-berlin.de/unihi>>. Acesso em 15 de julho de 2008.
- VALLADARES, F. et al. Characterization of estrogen receptors alpha and beta in uterine leiomyoma cells. **Fertil Steril.** v.86, n.6, p.1736-43. 2006.
- VAN DER HEIJDEN, O. et al. Allelotype analysis of uterine leiomyoma: localization of a potential tumor suppressor gene to a 4-cM region of chromosome 7q. **Mol Carcinog.** v.23, n.4, p.243-47. 1998.
- VISWANATHAN, M. et al. Management of uterine fibroids: an update of the evidence (Review). **Evid Rep Technol Assess**, v.154, p.1-122. 2007.
- VIVILLE, B. et al. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. **Hum Reprod.** v.12, p.815-22. 1997.
- WAGNER, J.; LEHMANN, L. Mol. Estrogens modulate the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells. **Nutr. Food Res.** v. 50, p.368–72. 2006.
- WALISSEER, J.A. et al. Patent ductus venosus and dioxin resistance in mice harboring a hypomorphic Arnt allele. **J. Biol. Chem.** v.279, p.16326–31. 2004.
- WALKER, C.L. Role of hormonal and reproductive factors in the etiology and treatment of uterine leiomyoma. **Recent Prog Horm Res.** v.57, p.277-94. 2002.
- WALKER, C.L.; STEWART, E.A. Uterine Fibroids: The Elephant in the Room (Review). **Science – Women's Health.** v.308, p.1589-92. 2005.

- WALLACH, 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.
- WANG, H. et al. Distinctive proliferative phase differences in gene expression in human myometrium and leiomyomata. **Fertil Steril.** v.80, n.2, p.266-76. 2003.
- WATANABE, M. et al. Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins. **Fertil Steril.** v.82, n.supl.3, p.1067-71. 2004.
- WEI, J.J.; CHIRIBOGA, L.; MITTAL, K. Expression profile of the tumorigenic factors associated with tumor size and sex steroid hormone status in uterine leiomyomata. **Fertil Steril.** v.84, n.2, p.474-84. 2005.
- WEIHUA, Z. et al. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.97, n.11, p.5936-41. 2000.
- WISE, L.A. et al. Risk of uterine leiomyomata in relation to tobacco, alcohol and caffeine consumption in the Black Women's Health Study. **Hum Reprod.** v.19, n.8, p.1746-54. 2004.
- WORMKE, M. et al. Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. **FEBS Lett.** V.478, n.1-2, p.109-12. 2000.
- WORMKE, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. **Mol Cell Biol.** v.23, p.1843-55. 2003.
- YAGER, J.D.; DAVIDSON, N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **N Engl J Med.** v.354, n.3, p.270-82. 2006.
- ZASLAWSKI, R. et al. Analysis of the expression of estrogen and progesteron receptors, and of PCNA and Ki-67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. **Med Sci Monit.** v.7, p.908-13. 2005.