

**O RECEPTOR DA DIOXINA É UM POTENTE CANDIDATO ENVOLVIDO NA ETIOLOGIA
DE LEIOMIOMAS UTERINOS
THE DIOXIN RECEPTOR IS A POTENTIAL CANDIDATE INVOLVED IN THE
ETIOLOGY OF UTERINE LEIOMYOMAS**

Caique Fernandes de Souza, Silvia Regina Rogatto

NeoGene Laboratório, Departamento de Urologia, FMB-UNESP- Distrito de Rubião Jr. s/n. - Botucatu-SP.

caiquef@gmail.com

RESUMO

Leiomiomas uterinos (LU) são tumores benignos comuns que ocorrem em aproximadamente 20% a 40% das mulheres, constituindo um problema significativo de saúde pública. A técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real permite a verificação dos níveis de expressão dos genes a partir da extração do RNA e subsequente construção do cDNA. Num estudo preliminar, nosso grupo utilizou hibridação genômica comparativa para avaliação de perdas e ganhos em LU. Esta metodologia possibilita a análise de todo o genoma em apenas um experimento, permitindo a identificação de ganhos, ampliações, perdas e deleções cromossômicas. Os resultados deste estudo revelaram perdas significativas em 7p21-p15, entre outras anormalidades. O gene *AHR* está localizado em 7p21.1 e codifica o receptor da dioxina, que forma dímeros com outro receptor (ARNT). O complexo resultante AHR-ARNT se liga a seqüências de DNA para modular 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 . Por estar associado com o receptor de estrógeno – (um dos promotores do crescimento dos leiomiomas) – e como o útero é um provável alvo da dioxina, o *AHR* é um excelente candidato envolvido no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. Foram avaliadas 43 amostras de leiomiomas e 5 amostras de miométrio normal com uso da metodologia de RT-PCR quantitativa em tempo real, para avaliação dos níveis de expressão do gene *AHR*. As etapas da PCR foram realizadas em um termociclador automático, o *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A fluorescência é capturada e coletada continuamente para cada amostra, e a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Nesta análise, foi observada diminuição de expressão gênica em 43 amostras analisadas (100%), confirmando a deleção na região 7p21 anteriormente verificada. Os resultados obtidos indicam que há uma forte associação entre a diminuição de expressão do gene *AHR* e leiomiomas uterinos, e tornam este gene um marcador em LU e possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: Leiomioma uterino, Gene *AHR*, RT-PCR quantitativa em tempo real.

ABSTRACT

Uterine Leiomyomas(UL) are common benign uterine neoplasm and develops in about 20% to 40% of women, representing a significant public health problem. The quantitative real time RT-PCR allows the quantification of gene expression levels by RNA extraction and subsequent cDNA amplification. In a preliminary study, our group used comparative genomic hybridization for evaluation of losses and gains in UL. This methodology permits the analysis of the whole genome in one experiment, and the detection of chromosomal gains, amplifications, losses and deletions. The results revealed significant losses in 7p21-p15, among others abnormalities. The AHR gene is located in 7p21.1 and codifies the dioxin receptor, which forms dimers with another receptor (ARNT). Resultant complex AHR-ARNT binds DNA sequences to modulate transcription rates of some genes, including those encoding drug-metabolizing enzymes such as CYP1A1, growth regulating factors such as the EGF receptor, the estrogen receptor, interleukin-1 β , and transforming growth factors TGF- α and TGF- β . AHR is an excellent candidate involved in the development of uterine leiomyomas since it is associated with the estrogen receptor and uterus is a probable target of the dioxin. Forty-three leiomioma samples and 5 normal miometrial samples were evaluated by quantitative real time RT-PCR to investigate the *AHR* gene expression levels. The PCR was performed in an automatic thermal cycler, the *ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*. The fluorescence is captured and collected continuously for each sample, and the intensity of detected fluorescence is directly proportional to the amount of cDNA in the sample. In this analysis, *AHR* downexpression was found in all samples, in comparison to normal uterus tissue. These results are in agreement with the previous data showing 7p21 deletion. The results indicated a strong association between the *AHR* downregulation expression and uterine leiomyomas and suggest a new therapeutic target in UL.

Keywords: Uterine leiomyomas, *AHR* gene, Quantitative real time RT-PCR.

INTRODUÇÃO

Leiomiomas uterinos (LU) são tumores benignos comuns que ocorrem em mulheres na idade reprodutiva. Acometendo cerca de 20% a 40% das mulheres durante seu período de vida (Day et al., 2003), os leiomiomas uterinos são de origem miometrial, sendo ricos em células de músculo liso e em matriz extracelular. Estes tumores são extremamente vascularizados, dependendo de um suprimento sanguíneo adequado para o seu desenvolvimento (Nowak et al., 2001).

Devido à sua alta prevalência e aos sintomas associados (sangramento uterino anormal, pressão e dor pélvica, disfunção reprodutiva), os leiomiomas uterinos constituem um problema significativo de saúde pública, sendo a indicação mais comum para histerectomia e para cirurgia uterina conservadora (Denschlag et al., 2005). A ocorrência e a severidade dos sintomas dependem do tamanho, número e localização dos leiomiomas (Tsai et al., 2005).

Durante os últimos 20 anos, progressos significativos foram feitos para a compreensão do comportamento e da patogênese molecular dos leiomiomas, embora a causa direta da doença ainda seja desconhecida (Maruo et al., 2004). Várias evidências, como o crescimento dos leiomiomas durante períodos reprodutivos, na gravidez e nos períodos de terapia de reposição hormonal sugerem que os hormônios esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, são importantes para o desenvolvimento do tumor, sendo reconhecidos como promotores do crescimento (Buttram e Reiter, 1981; Rein et al., 1995). Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores de predisposição, incluindo idade reprodutiva tardia, mulheres de descendência afro-americana, nuliparidade ou número de paridades baixo e obesidade (Flake et al., 2003).

Os leiomiomas uterinos são neoplasias mesenquimais de origem monoclonal derivados de uma única célula miometrial progenitora geneticamente anormal (Townsend et al., 1970). Essas neoplasias representam uma categoria tumoral ótima para estudos genéticos, pois são tumores homogêneos, com pouca ou nenhuma infiltração de células normais, e relativamente comuns, permitindo sua análise em larga escala. Apesar destes fatores, o entendimento sobre a patogênese desses tumores ainda é limitado. O conhecimento das vias moleculares envolvidas na conversão de células miometriais uterinas normais para células de leiomioma é importante pois possibilitará o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais efetivas e também a prevenção da doença.

As alterações genéticas em leiomiomas uterinos foram detectadas por alguns relatos utilizando a técnica de Hibridação Gênômica Comparativa (CGH). Esta metodologia possibilita a análise de todo o genoma em apenas um experimento, verificando ganhos, ampliações, perdas e deleções cromossômicas. Três relatos em literatura mostraram resultados da CGH em um total de 31 leiomiomas uterinos estudados (Pakenham et al., 1997; Sarlomo-Rikala et al., 1998; Levy et al., 2000). Dez casos mostraram alterações genéticas, incluindo ganhos dos cromossomos 9, 14 e 19 e perdas nos cromossomos 1, 4, 7 e 12 (Pakenham et al., 1997; Levy et al., 2000). Rogatto et al. (2003) analisaram 38 leiomiomas de 31 pacientes, e verificaram que as regiões cromossômicas mais frequentemente envolvidas em ganhos foram 8q21.1, 16p12-q12 e 20p12-pter, enquanto as seqüências mais frequentemente observadas em perdas afetaram 2p24-pter, 3q26-29, 7p21-15, 9p23-pter, 11p15.5-pter e 15q25-26.

As perdas de regiões do braço longo do cromossomo 7 constituem um dos rearranjos clonais mais comuns em leiomiomas uterinos (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/CytList>). Os estudos de citogenética clássica revelaram que aproximadamente 35% dos leiomiomas com cariótipos anormais apresentam monossomia ou deleções do cromossomo 7 (226 alterações do cromossomo 7 descritas em 653 leiomiomas cariotipicamente anormais (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2006). A deleção do braço longo do cromossomo 7 é o rearranjo mais frequentemente observado. Alterações em 7p são raramente descritas nestes tumores. Em um estudo da equipe, Rogatto

et al. (2003) relataram perdas genômicas em 7p21-p15 em quatro casos. Baseado nestes achados, Canevari et al (2005) avaliaram, entre outros, a perda dos marcadores D7S517, D7S513, D7S507 e D7S493 (mapeados em 7p22-15) 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.

Apesar dos progressos, ainda não foi identificado o gene deletado no cromossomo 7 responsável pelo desenvolvimento dos leiomiomas uterinos. As evidências acumuladas pelo mapeamento do cromossomo 7, pelos estudos de perda de heterozigose (Ishwad et al., 1995; Mao et al., 1999) e análise de *microarray* (Wang et al., 2003; Quade et al., 2004) não foram suficientes para a determinação do gene candidato.

Após a montagem completa da sequência do cromossomo 7, foram encontrados aproximadamente 81 genes mapeados em 7q22 e 100 genes mapeados em 7p22-p14. Atualmente, 20 genes mapeados ao longo do cromossomo 7 foram esporadicamente relatados com expressão diminuída em leiomiomas uterinos em comparação ao miométrio normal e considerados como candidatos para o desenvolvimento destes tumores, como os genes *DLX5*, *DLX6* (envolvidos no desenvolvimento embrionário), e o gene *PMS2L8* (relacionado a reparo a erros no DNA). Há ainda os genes *PAII* (*plasminogen activator inhibitor type 1*) e um fator de ligação ligante-dependente para receptores do hormônio da tireóide (*TRIP6*) (Ligon e Morton, 2000).

Um gene candidato envolvido no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos é o gene *AHR*. Este gene está localizado em 7p21.1 e codifica o receptor da dioxina, que forma dímeros com outro receptor (ARNT). O complexo resultante AHR-ARNT se liga a seqüências de DNA (reagentes à dioxina) em regiões regulatórias 5' de genes responsivos para modular 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 (Schmidt e Bradfield, 1996; Gasiewicz, 1997). 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.

Por estar associado com o receptor de estrógeno, e sendo o estrógeno um dos promotores do crescimento dos leiomiomas, e como o útero é um provável alvo da dioxina, o AHR constitui um excelente alvo para pesquisa em leiomiomas uterinos.

MATERIAL E MÉTODOS

CASUÍSTICA

A análise por qRT-PCR para o gene *AHR* foi realizada em 43 LU e cinco miométrios normais, obtidas em colaboração com o Depto de Ginecologia, FMB-UNESP-Botucatu, após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A idade das pacientes variou entre 26 e 52 anos. As amostras de miométrio normal são utilizadas para a normalização da reação de qRT-PCR em tempo real para a análise de expressão do gene *AHR*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelo CONEP (CONEP 25000.145314/2003-12).

EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA e qRT-PCR EM TEMPO REAL

Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente Trizol (Gibco), conforme as recomendações do fabricante. O RNA total foi ressuspensionado em 30 µl de tampão de eluição, checado em gel de agarose 2% e mantido a -70° C até o seu uso para a síntese de cDNA pelo sistema de pré-amplificação SUPERSCRIPT™ II (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) para promover a transcrição reversa.

As etapas da PCR quantitativa em tempo real foram realizadas no termociclador automático (*ABI Prism 7000 Sequence Detection System – Applied Biosystems*) e processadas pelo sistema de detecção após um número variável de ciclos em fase exponencial. Os iniciadores para a PCR foram desenhados usando-se o programa *Primer Express (Applied Biosystems)*. Foi utilizado o corante fluorescente *SYBR Green I (Perkin Elmer)*, que apresenta alta especificidade de ligação à dupla fita de DNA. Durante a polimerização, um grande número de moléculas do corante se liga ao DNA de dupla fita recém sintetizado e o aumento na intensidade de fluorescência é monitorado em tempo real. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para a detecção de uma intensidade de fluorescência significativa. Este ponto é definido como limiar ou C_t e ocorre durante a fase exponencial de amplificação. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico.

CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO

Para a construção das curvas-padrão foram realizadas diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA de placenta. Foram utilizadas como normalizador as cinco amostras de miométrio normal. Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene informativo (*AHR*) e o gene referência (calibrador), *GAPDH*. Este gene é comumente adotado em estudos de quantificação de DNA e RNAm em diferentes tipos tumorais.

RESULTADOS

O padrão de expressão do gene *AHR* foi avaliado por RT-PCR quantitativa em tempo real em um total de 43 leiomiomas uterinos e 5 amostras de miométrio normal. Este gene se expressa em diferentes tecidos, como: pulmonar, muscular, cerebral, mamário, prostático, placentário pancreático, estomacal, testicular, de timo e em tecido uterino (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>). O valor de $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ foi utilizado para calcular a média e o desvio padrão entre as amostras controles (miométrio normal).

Com esses valores foi obtido o intervalo de confiança [0,63-1,56] para considerar perda ou aumento de expressão. Todos os casos foram analisados em duplicatas. Foi observada a perda de expressão do gene *AHR* nas 43 amostras de LU.

DISCUSSÃO

As deleções do cromossomo 7 são particularmente interessantes porque são observadas tanto em tumores benignos quanto em malignos (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/CytList>). As perdas de regiões do braço longo do cromossomo 7 constituem um dos rearranjos clonais mais comuns em leiomiomas uterinos. Relatos em citogenética clássica revelam que aproximadamente 35% dos leiomiomas com cariótipos anormais apresentam monossomia ou deleções do braço longo do cromossomo 7. Entretanto, não foram relatadas perdas em 7p (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2006).

Neste estudo, investigamos a diminuição dos níveis de expressão do gene *AHR* em leiomiomas uterinos. A seleção deste gene foi baseada em resultados prévios do grupo onde a análise da CGH que revelou uma região de perda de segmentos genômicos em 7p21-p15 em 4/38 leiomiomas (11%) (Rogatto et al., 2003) e a avaliação de LOH (Canevari et al., 2005) em 64 leiomiomas confirmando a perda de alelos para o marcador D7S517 (localizado em 7p21.1-p22.2 -11% dos casos informativos) e para o marcador D7S493 (mapeado em 7p15.3 - 12% dos casos).

O gene *AHR* humano está localizado em 7p21.1 é composto por 12 exons incluindo um não codificador (exon 12). O receptor codificado por este gene é um fator de transcrição que induz várias enzimas metabolizadoras em resposta a diversos ligantes exógenos e endógenos. Relatos em literatura revelam uma diferença inter-individual na capacidade de indução na proteína CYP1A1 pelos hidrocarbonetos aromáticos ligantes de AHR. Esta diferença poderia estar associada aos vários polimorfismos de base única relatados no *AHR* (Fukushima-Uesaka et al., 2004).

Codificando o receptor da dioxina, o gene *AHR* forma dímeros com outro receptor (ARNT). Estes receptores são membros da mesma família de fatores de transcrição, que mediam os efeitos tóxicos da dioxina. Ohtake et al. (2003) demonstraram que o heterodímero AHR/ARNT está associado diretamente com o receptor de estrógeno alfa e beta.

Principalmente pela sua função, o gene *AHR* foi selecionado para validação por análise de expressão quantitativa. Nossos resultados revelaram níveis diminuídos na expressão desse gene em todos os casos analisados. Estes dados sugerem que o gene *AHR* é um forte candidato para a regulação do desenvolvimento de leiomiomas uterinos. Um único relato em literatura mostrou redução na expressão dos genes *AHR* e *ARNT* em leiomiomas uterinos (6 casos) comparados com miométrio normal (15 amostras) por ensaio de proteção de ribonuclease (análise semi-quantitativa) (Khorram et al., 2002).

O AHR ativa a transcrição através de mecanismos dependentes e independentes de ligação ao DNA. O AHR e o ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) formam um fator de transcrição tipo heterodímero que se liga a uma variedade de carcinógenos químicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos halogenados e policíclicos. Antes dessa ligação, o AHR encontra-se no citoplasma em um complexo com a proteína *heat shock* 90, a *cochaperone* p23 e a imunofilina homóloga XAP2. Após a ligação ao ligante, a AHR move-se para o núcleo, dissocia-se do complexo cochaperone e forma um heterodímero com a proteína ARNT, o AHRC que é o complexo funcional (fator de transcrição). Como um complexo ativado, o AHRC é capaz de recrutar várias classes de co-ativadores como o SRC-1 (*steroid receptor co-activator 1*). Além disso, ele se liga ao elemento de resposta a xenobióticos (XRE) na região promotora e região de *enhancer* de genes alvos regulando sua transcrição. Embora estruturalmente não relacionada, a atividade do AHR divide várias características com membros da superfamília de receptores nucleares. Estes fatores de transcrição recrutam cofatores protéicos que atuam na regulação da transcrição. Estas proteínas são incorporadas em complexos multiméricos que interagem e modulam a atividade da maquinaria do *core transcricional*, assim como modifica a estrutura da cromatina e a acetilação de promotores de histonas (Carlson and Perdew, 2002). O efeito destas atividades entre outras, é relaxar a cromatina, reposicionar os nucleossomos e facilitar o recrutamento da RNA polimerase II (Hestermann e Brown, 2003).

O AHR e seus agonistas têm sido envolvidos na iniciação e progressão de cânceres em múltiplos órgãos (Poland e Knutson, 1982). Assim como o AHR/ARNT, o receptor de estrógeno (ER) é um fator de transcrição dependente de ligante. O ER liga-se aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs) e ativa a transcrição de maneira estrógeno dependente.

Ohtake et al. (2003) demonstraram que o heterodímero AHR/ARNT está diretamente associado com os receptores de estrógeno ER- α e ER- β . Esta associação resulta no recrutamento de ER não ligados e do co-ativador p300 nos promotores de genes estrógeno responsivos, promovendo a ativação transcricional e os efeitos estrogênicos. A função do ER ligado é atenuada. Os autores demonstraram uma ação agonista do AHR ao estrógeno quando utilizaram camundongas ovariectomizadas AHR -/- ou ER- α -/-. Assim, a ação agonista do AHR pode ser exercida por uma interação direta entre o AHR/ARNT e ER 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.

O significado e o mecanismo da expressão diminuída do *AHR* em leiomiomas uterinos não são conhecidos. Contudo, baseado nos efeitos antagonistas da dioxina e estrógeno pode-se sugerir que altos níveis de estrógeno produzidos localmente pelos LU (Sumitani et al., 2000) podem regular negativamente a expressão do *AHR* e seus ligantes. Há evidências que o AHR é um alvo terapêutico potencial desde que ratas Sprague-Dawley alimentadas em longo período com TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) apresentaram inibição do crescimento de vários cânceres, incluindo

tumores mamários e uterinos dependentes de 17- β -estradiol (Kociba et al., 1978). Estudos subsequentes demonstraram um *cross-talk* inibidor AHR-ER no útero de roedores bem como em tumores mamários e em linhagens celulares de câncer de mama e de endométrio (para revisão, Morrow et al., 2004).

CONCLUSÃO

Nesta análise, foi observada diminuição de expressão gênica em todas as amostras analisadas, confirmando a deleção na região 7p21 anteriormente verificada. Os resultados obtidos indicam que há uma forte associação entre a diminuição de expressão do gene *AHR* e leiomiomas uterinos, indicando que o AHR é um alvo terapêutico potencial no tratamento desses tumores.

AGRADECIMENTOS

À Nilva K. Cervigne, Cláudia Aparecida Rainho e Dra. Ana Glória Pontes pela colaboração no estudo. Este projeto foi financiado pela FAPESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buttram, V.C.Jr.; Reiter, R.C. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil. Steril.*, v.36, p.433-445, 1981.
- Canevari, R.A; Pontes, A.; Rogatto, S.R. 2005. Microallelotyping defines novel regions of loss of heterozygosity in uterine leiomyomas. *Mol Carcinog* 42:177-82.
- Carlson, D.B.; Perdew, G.H. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* v.16, p.317-325, 2002.
- Day, B.D.; Dunson, D.B.; Hill, M.C.; Cousins, D.; Schectman, J.M. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.188, p.100-107, 2003.
- Denschlag, D.; Bettendorf, H.; Watermann, D.; Keck, C.; Tempfer, C.; Pietrowski, D. Polymorphism of the p53 tumor suppressor gene is associated with susceptibility to uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*, v.84, p.162–166, 2005.
- Flake, G.P.; Andersen, J.; Dixon, D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ. Health Perspect.*, v.111(8), p.1037-1054, 2003.
- Fukushima-Uesaka, H.; Sai, K.; Maekawa, K.; Koyano, S.; Kaniwa, N.; Ozawa, S.; Kawamoto, M.; Kamatani, N.; Komamura, K.; Kamakura, S.; Kitakaze, M.; Tomoike, H.; Ueno, K.; Minami, H.; Ohtsu, A.; Shirao, K.; Yoshida, T.; Saijo, N.; Saito, Y.; Sawada, J. Genetic variations of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet*, v.19, p.320-326, 2004.
- Gasiewicz, T.A. Dioxins and the Ah receptor: probes to uncover processes in neuroendocrine development. *Neurotoxicology*, v.18(2), p.393-413, 1997.

Hestermannt, E.V.; Brown, M. Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Cell Biol.*, v.23, p.7920-7925, 2003.

Ishwad, C.S.; Ferrell, R.E.; Davare, J.; Meloni, A.M.; Sandberg, A.A.; Surti, U. Molecular and cytogenetic analysis of chromosome 7 in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer*, v.14(1), p.51-55, 1995.

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, p.75-80, 2002.

Kociba, R.J.; Keyes, D.G.; Beger, J.E.; Carreon, R.M.; Wade, C.E.; Dittenber, D.A.; Kalmins, R.P.; Frauson, L.E.; Park, C.L.; Barnard, S.D.; Hummel, R.A.; Humiston, C.G. Results of a 2-year chronic toxicity and oncogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.46, p.279-303, 1978.

Levy, B.; Mukherjee, T.; Hirschhorn, K. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyomata and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cyto.*, v.121, p.1-8, 2000.

Ligon, A.H.; Morton, C.C. Genetics of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer*. v.28(3), p.235-245, 2000.

Mao, X.; Barfoot, R.; Hamoudi, R.A.; Easton, D.F.; Flanagan, A.M.; Stratton, M.R. Allelotype of uterine leiomyomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.114(2), p.89-95, 1999.

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

Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2006). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Morrow, D.; Qin, C.; Smith, R.; Safe, S. 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.88:27-36.

Nowak, R.A. Identification of new therapies for leiomyomas: What in vitro studies can tell us. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.44, p.327-334, 2001.

Ohtake, F.; Takeyama, K.; Matsumoto, T.; Kitagawa, H.; Yamamoto, Y.; Nohara, K.; Tohyama, C.; Krust, A.; Mimura, J.; Chambon, P.; Yanagisawa, J.; Fujii-Kuriyama, Y.; Kato, S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, v.423(6939), p.545-550, 2003.

Packenham, J.P.; du Manoir, S.; Schrock, E.; Risinger, J.I.; Dixon, D.; Denz, D.N.; Evans, J.A.; Berchuck, A.; Barrett, J.C.; Devereux, T.R.; Ried, T. Analysis of genetic alterations in uterine

leiomyomas and leiomyosarcomas by comparative genomic hybridization. *Mol. Carcinog.*, v.19, p.273-279, 1997.

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. Pharm. T.*, v.22, p.517-554, 1982.

Quade, B.J.; Wang, T.Y.; Sornberger, K.; Dal Cin, P.; Mutter, G.L.; Morton, C.C. Molecular pathogenesis of uterine smooth muscle tumors from transcriptional profiling. *Genes Chromosomes Cancer*, v.40(2), p.97-108, 2004.

Rein, M.S.; Barbieri, R.L.; Friedman, A.J. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine leiomyomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.172, p.14-18, 1995.

Rogatto, S.R.; Canevari, R.A.; Bérghamo, N.A.; Pontes, A.; Rainho, C.A.; Squire, J.A. Integrated molecular and cytogenetic analysis of uterine leiomyomas identifies novel imbalances of chromosomes 3q25-29, 7p21-15, 8q21.1, 15q25-26, 16p12-q12 and 20p12-pter. *Int. J. Hum. Med. Genet.* v.46, p.168, 2003.

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.

Safe, S.; Krishnan, V. Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. *Toxicol. Letters*, v.82-83, p.731-736, 1995.

Sarlomo-Rikala, M.; El-Rifai, W.; Latineen, T.; Andersson, L.C.; Miettinen, M.; Knuutila, S. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Humam Pathol.*, v.29(5), p.476-481, 1998.

Schmidt, J.V.; Bradfield, C.A. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.12, p.55-89, 1996.

Sumitani, H.; Shozu, M.; Segawa, T.; Murakami, K.; Yang, H.J.; Shimada, K.; Inoue, M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyomas cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology*, v.141, p.3852-3861, 2000.

Townsend, D.E.; Sparkes, R.S.; Baluda, M.C.; McClelland, G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by eletrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.107, p.1168-1174, 1970.

Tsai, S.; Lin, S.; Cheng, Y.; Chen, H.; Wing, L.C. Expression and Functional Analysis of Pituitary Tumor Transforming Growth Factor-1 in Uterine Leiomyomas. *J. Clin. Endócrinol. Metab.*, v.90, p.3715-3723, 2005.

Wang, H.; Mahadevappa, M.; Yamamoto, K.; Wen, Y.; Chen, B.; Warrington, J.A.; Polan, M.L. Distinctive proliferative phase differences in gene expression in human myometrium and leiomyomata. *Fertil. Steril.*, v.80(2), p.266-276, 2003.