

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EXPRESSÃO DOS PROTOONCOGENES *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* EM MIOMÉTRIO E  
MIOMA HUMANOS**

**ANA LUIZA FERRARI**

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Co-Orientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, março de 2006

**F375e** Ferrari, Ana Luiza

Expressão dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio e mioma humanos / Ana Luiza Ferrari ; Edison Capp ; co-orient. Helena von Eye Corleta. – 2006.

90 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Miométrio 2. Proteínas proto-oncogênicas c-myc 3. Proteínas proto-oncogênicas c-fos 4. Proteínas proto-oncogênicas c-jun 5. Mioma I. Capp, Edison II. Corleta, Helena von Eye III. Título

NLM: QZ 340

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e das Pró-Reitorias de Pesquisa e de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Edison Capp, meu orientador, por sua dedicação, amizade, compreensão e confiança durante a realização deste trabalho. Seu conhecimento e entusiasmo foram fontes perenes de estímulo.

À Profa. Ilma Simoni Brum da Silva por sua incansável colaboração, como professora e constante atenção, apoio, dedicação, carinho e amizade o que se tornou essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Helena von Eye Corleta, co-orientadora deste estudo, pelo apoio, coleta de material e revisão do trabalho.

À Profa. Beatriz Kohek pelos ensinamentos em laboratório, pela constante preocupação com o desenvolvimento deste trabalho e pela demonstração de carinho e amizade.

À Profa. Maria Flávia Marques Ribeiro pela sua colaboração no desenvolvimento de técnicas de laboratório de extrema importância.

À Profa. Débora Martinho Morsch pelos auxílios e ensinamentos durante as atividades laboratoriais.

À Profa. Poli Mara Spritzer pela infra-estrutura disponibilizada.

Ao Colega de Mestrado Antônio Miragem por sua inestimável ajuda e amizade.

A Rafael Bueno Orcy pelo auxílio e ensinamentos necessários para a realização desta pesquisa.

A Mateus Reche e aos colegas de laboratório, Adriane Pozzobon, Vanderlei Biolchi, Gisele Branchini, Lolita Scheider, Simone Radavelli, Sheila B. Lecke, Polyana Sartori Maier pela ajuda, incentivo e companherismo.

Aos funcionários do PPG em Medicina: Ciências Médicas pela disponibilidade e eficiência na obtenção da documentação necessária e materiais de laboratório.

À secretária Miriam Sant´Helena na obtenção de materiais de laboratório.

À Idelma Oliveira Pithan pela preparação e manutenção do material utilizado no laboratório, pela sua amizade afabilidade e solicitude.

A minha grande amiga Karin Sachs, por sua colaboração no desenvolvimento deste estudo, apoio, e carinho.

A todos os amigos, em especial, Alice, Clarisse, Suzana, Neca, Martha, Ane e Kátia que contribuíram para realização deste trabalho através de seu constante interesse.

Ao meu marido Marco Antônio e meu filho João Pedro, pelo apoio, compreensão, estímulo e amor.

Ao meu pai Arnaldo por ser um modelo de dedicação como pesquisador, professor e médico, pelo apoio, carinho, amor e contribuições constantes.

À minha mãe, Maria Norma, pelo grande amor que me deu durante toda sua vida e que sempre estará presente dentro de mim.

A todos, muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. MIOMÉTRIO.....</b>	<b>8</b>
<b>3. MIOMAS.....</b>	<b>9</b>
<b>4. HORMÔNIOS ESTERÓIDES OVARIANOS, FATORES DE CRESCIMENTO E MIOMAS.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Hormônios esteróides ovariano e miomas .....</b>	<b>14</b>
4.1.1. Estrogênio e seus receptores.....	15
4.1.2. Progesterona e seus receptores .....	17
4.1.3. Mecanismos de ação dos hormônios esteróides .....	19
<b>4.2. Fatores de crescimento e miomas uterinos.....</b>	<b>20</b>
4.2.1. EGF e seus receptores .....	21
4.2.2. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) .....	22
4.2.3. IGF-1 e seus receptores.....	23
<b>4.3. Transdução do sinal do IGF-I.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Mecanismos de interação entre os esteróides e fatores de crescimento ...</b>	<b>25</b>
<b>5. PROTOONCOGENES .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. c-myc.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. c-fos.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. c-jun.....</b>	<b>29</b>
5.3.1. Expressão de c-myc, c-fos e c-jun .....	30
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>8. ARTIGO EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>46</b>
<b>9. ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Miomas humanos são tumores comuns do trato genital feminino. São comumente benignos, no entanto, causam distúrbios hemorrágicos, desconforto ou dor pélvica e não raramente aborto recorrente e infertilidade (1, 2). O único tratamento curativo disponível é a cirurgia, seja histerectomia ou enucleação dos miomas. É sabido que o ambiente endócrino é o maior determinante do crescimento dos miomas, uma vez que seu crescimento pára ou eles até mesmo diminuem de tamanho após a menopausa (1). O fato dos miomas aparecerem durante o período da vida reprodutiva, aumentarem durante a gestação e regredirem após a menopausa sugere sua dependência dos hormônios ovarianos (1, 3-8). Os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRHa), os quais reduzem a concentração sérica de estrogênio e progesterona, como visto na menopausa, têm sido usados como a terapia medicamentosa para diminuir miomas antes da cirurgia. No entanto, estes tratamentos não são adequados a longo prazo, devido ao grande número de efeitos colaterais, como por exemplo, diminuição da massa óssea (9-11).

Há crescentes evidências de que a insulina, o IGF-1 e seus receptores estejam envolvidos na transformação tumoral de tecidos dependentes de hormônio como: mama e trato gastrointestinal, e de tecidos não dependentes de hormônio como: cérebro, medula, rins (12, 13). O fato de muitos tumores renais conterem quantidades aumentadas de glicogênio, fosfolipídios e triglicerídios sugere o envolvimento da insulina e/ou IGF-1 no carcinoma renal (12). Estas observações indicam que os IGFs podem ter um importante papel na gênese de tumores.

A fim de possibilitar novas estratégias não invasivas no tratamento de miomas, torna-se essencial um maior conhecimento a respeito dos mecanismos que envolvem a regulação do crescimento dos miomas, como a expressão dos protoonco genes fos, myc e jun.

## 2. MIOMÉTRIO

É formado por células do músculo liso que sustentam o tecido vascular e estromal. O estrogênio e a progesterona, desempenham um papel chave na regulação dos genes que direcionam o desenvolvimento e o funcionamento deste tecido de forma semelhante ao que ocorre no endométrio e nos ovários. Este tecido, entretanto, possui baixo número de receptores de estrogênio no início da fase folicular (14), conseqüentemente a resposta do miométrio ao estrogênio também é baixa nesta fase. À medida que o nível de estrogênio se eleva, o miométrio se diferencia com o objetivo de se preparar para uma possível gravidez, ao passo que, os níveis dos receptores de progesterona são relativamente estáveis durante o ciclo menstrual (15).

A expressão dos genes regulados por estrogênio normalmente varia no miométrio durante o ciclo menstrual em resposta aos níveis de concentração dos hormônios esteróides. Alguns destes genes codificam fatores de crescimento e seus receptores, favorecendo o crescimento de tumores benignos conhecidos como miomas.



### 3. MIOMAS

Miomas humanos, também conhecidos como leiomas, fibromas, fibromiomas ou leiomiomas, são tumores comuns do trato genital feminino. São comumente benignos e se desenvolvem a partir do músculo liso miometrial que contém quantidades variáveis de tecido conjuntivo fibroso (16). São tumores monoclonais, derivados de um único tipo celular (17). Pode-se dizer também que são estruturas encapsuladas, ricas em colágeno e exibem uma vascularização dispersa. Possuem níveis elevados e variados de receptores de estrogênio e progesterona (14, 18).

Diversas evidências sugerem uma base genética para o surgimento de mioma uterino. Em comparação com outros grupos étnicos, mulheres descendentes de afro-americanos possuem risco maior de desenvolver miomas uterinos (19), os quais surgem em idade precoce e tendem a ficar maiores, mais numerosos e sintomáticos (20-22). Diferenças histológicas têm sido observadas entre o mioma e o miométrio em uma tentativa de explicar seu desenvolvimento, incluindo os diferentes níveis dos fatores de crescimento, aberrações cromossômicas com alterações genéticas, além dos diferentes níveis dos receptores de hormônios de esteróides sexuais (23). Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas. Porém, estudos cromossômicos mostram alterações citogenéticas heterogêneas, sendo cinco as mais freqüentes: translocação específica entre os cromossomos 12 e 14, trissomia do 2, deleção do cromossomo 7 e rearranjo envolvendo o braço longo do cromossomo 12 com o braço curto do 6 (24).

Miomas possuem uma capacidade de rápido crescimento, mas não ultrapassam a barreira do tecido conjuntivo que os separa do miométrio normal

adjacente. São tumores com baixa atividade mitótica (similar ao miométrio adjacente), porém contêm muita matriz extracelular, a qual pode contribuir para o seu crescimento (25).

O fato dos miomas aparecerem durante o período da vida reprodutiva, aumentarem durante a gestação e regredirem após a menopausa, sugere dependência dos hormônios ovarianos (1, 4, 8, 26, 27). O ambiente endócrino parece ser o maior determinante de seu crescimento (1). Os estrogênios tem recebido muita atenção como sendo o grande fator responsável pelo desenvolvimento dos miomas uterinos, entretanto, a progesterona também parece exercer um papel importante (26). A exata etiologia dos miomas uterinos permanece ainda desconhecida, (28). Certamente a questão sobre sua etiopatogênese ainda não foi totalmente esgotada e existem muitas perguntas a serem respondidas (29).

Uma característica histopatológica interessante dos miomas é a diferença em sua vascularização em relação ao miométrio adjacente. Recentemente foi demonstrado que os miomas têm uma área vascular e uma densidade microvascular menor do que o miométrio adjacente (30, 31). Isto é intrigante, uma vez que os tumores sólidos necessitam uma densidade microvascular maior, a fim de conseguirem sustentar seu crescimento (32). Os miomas podem se comportar de forma diferente justamente por serem tumores benignos. Entretanto, apesar desta densidade vascular reduzida, os fatores responsáveis por este mecanismo, permanecem desconhecidos (33).

Na maioria dos países, os miomas uterinos são a indicação mais freqüente para histerectomia em mulheres na pré-menopausa. Representam, conseqüentemente, um grande problema de saúde pública.

A incidência e a severidade dos sintomas associados aos miomas variam com o seu tamanho, sua quantidade e sua localização (16). A presença deste tumor é responsável por 1/3 dos 600.000 procedimentos realizados por ano em hospitais norte-americanos (34, 35). A etnia é um fator de risco epidemiológico importante na prevalência do mioma. Mulheres de raça negra possuem uma freqüência três vezes maior de miomatose uterina do que as mulheres de raça branca (36). No entanto, existe uma incidência cumulativa estimada de 70 - 80 % em mulheres acima de 50 anos (22, 35, 37). É o tumor ginecológico mais frequente com uma prevalência superior a 30 % em mulheres com idade acima de 30 anos (16). Diversos estudos realizados em grupos familiares demonstraram que a ocorrência de mioma é 4-5 vezes mais comum em mulheres (com mioma) parentes em primeiro grau, quando comparados a grupos de mulheres da população em geral (27, 35, 38). Estudos epidemiológicos sugerem que o risco de surgimento de mioma está associado à obesidade, gravidez tardia e a nuliparidade, porém, está inversamente associado à gravidez, idade da menarca e menopausa (39).

A maioria dos miomas é assintomática, mas até 25 % das mulheres acima de 30 anos podem apresentar sintomas tais como sangramento uterino anormal, dor pélvica e disfunções reprodutivas (1, 2, 40). O sangramento uterino anormal pode causar anemia por deficiência de ferro, estando associado à ausência das pacientes ao trabalho. O desconforto e a dor pélvica estão associados com a localização do

tumor. Quando anterior pode causar sintomas urinários e quando posterior, constipação (36). Além disso, até 50 % dos miomas podem causar sintomas graves, que justificam a intervenção clínica ou cirúrgica (41).

O diagnóstico dos miomas é freqüentemente realizado por palpação de um contorno uterino irregular, aumentado no exame físico. A ultra-sonografia pode auxiliar no diagnóstico e excluir a possibilidade de um tumor ovariano. A ressonância magnética (RM) fornece uma visualização melhor dos miomas, mas para a maioria das indicações clínicas, o custo extra com deste exame não se justifica (36).

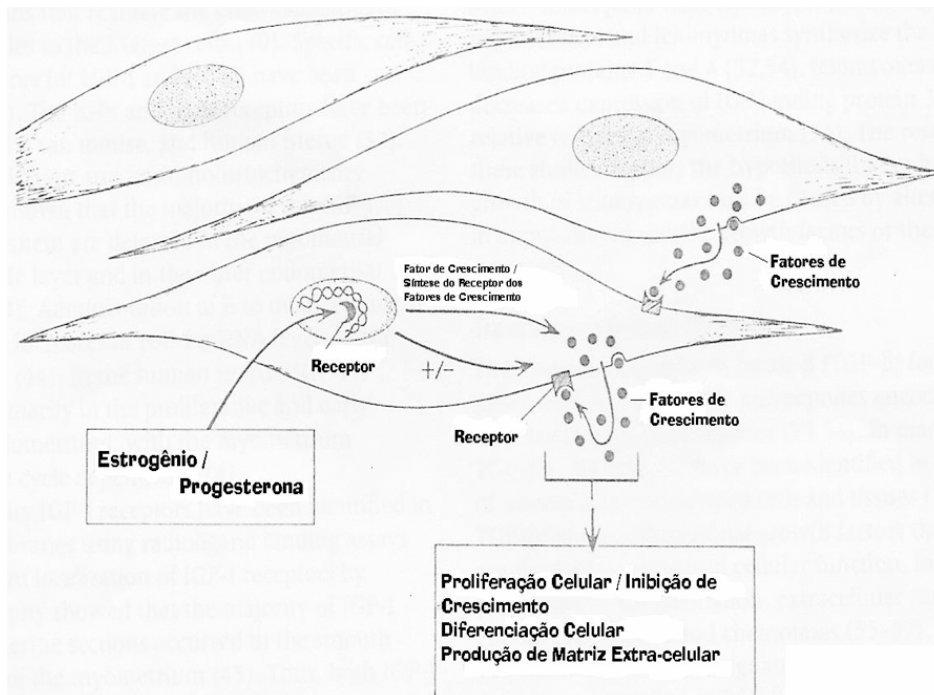
A conduta terapêutica nesses tumores pode ser expectante, medicamentosa ou cirúrgica, dependendo dos sintomas, da idade da paciente, do tamanho e da localização do tumor (36). Quando o mioma é reconhecido logo no início de seu desenvolvimento, é possível a utilização de terapias conservadoras efetivas e definitivas, que oferecem alívio dos sintomas (29).

Os GnRHa, os quais reduzem a concentração sérica de estrogênio e progesterona, têm sido usados como a terapia medicamentosa para diminuir os miomas antes da cirurgia (9-11). Estes agentes produzem uma redução significativa no volume uterino (35 % a 65 %), bem como amenorréia (36). Os tumores retornam ao volume do pré-tratamento em poucos meses após a descontinuação do agonista GnRH (26). Estes tratamentos não são adequados a longo prazo, devido ao grande número de efeitos colaterais como, por exemplo, a diminuição da massa óssea, fogachos e dispareunia (9, 10, 36).

#### **4. HORMÔNIOS ESTERÓIDES OVARIANOS, FATORES DE CRESCIMENTO E MIOMAS**

Muitos estudos demonstram a existência de uma interação entre os receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP) que envolve a modulação da transcrição dos genes nos miomas. Entretanto, isoladamente estes hormônios não modulam o surgimento e o crescimento celular de mioma. Este processo ocorre através da interação entre hormônios esteróides sexuais e fatores de crescimento (42)

Ambos os hormônios esteróides e peptídicos medeiam a proliferação e diferenciação celular em tecidos responsivos, afetando a expressão gênica (figura 1). A ação biológica destes hormônios é mediada por receptor específico nas células produtoras do fator de crescimento (autócrinas) ou nas células vizinhas (parácrinas). As moléculas de matrizes extracelulares, assim como colágeno, fibronectina e heparina, servem para limitar os fatores de crescimento quanto a sua localização, através de fortes ligações e evitar uma possível dispersão (43).

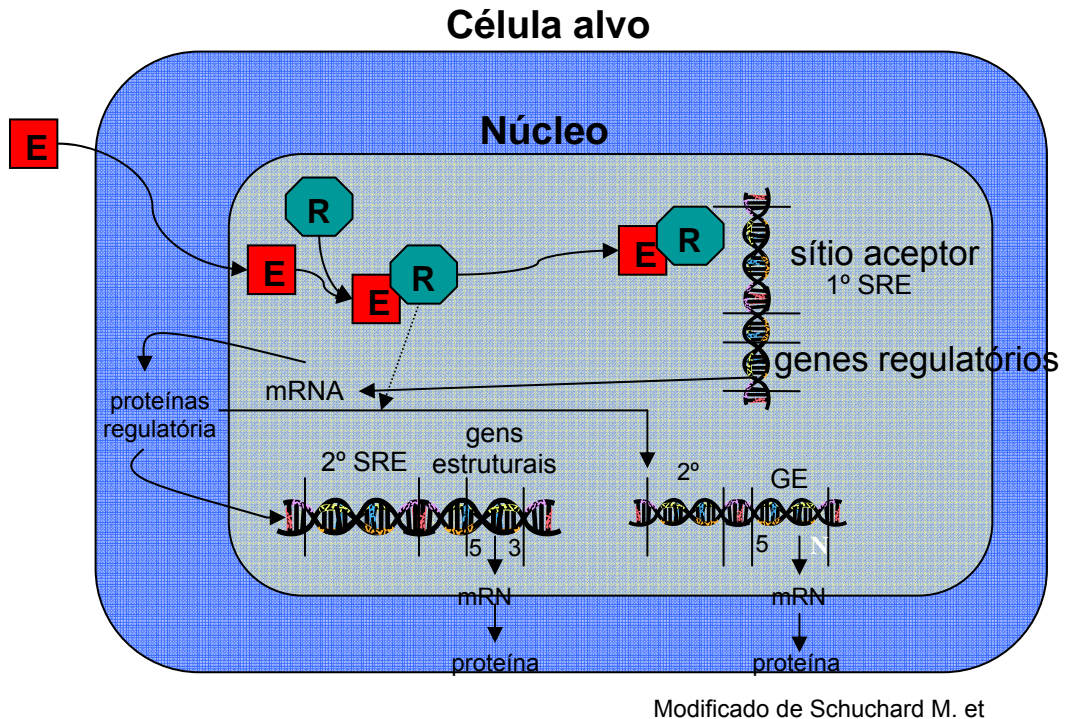


Fonte: Nowak, R.A - Blackwell Science, 1997:301-310.

**Figura 1 – Interação entre hormônios esteróides e fatores de crescimento**

#### 4.1. Hormônios esteróides ovariano e miomas

Os miomas uterinos se desenvolvem durante os anos reprodutivos da mulher e regredem após a menopausa, indicando um potencial de crescimento dependente de hormônios esteróides ovarianos. Os hormônios esteróides entram rapidamente na célula-alvo, ativam os receptores nucleares e estão envolvidos nos mecanismos da transcrição (figura 2). Ligados ao elemento responsivo hormonal, o receptor pode modificar a estrutura da cromatina e permitir a ligação de outros fatores transcricionais, necessários para transativação (44).



**Legenda:** E = Estrogênio; R = Receptor; SER = Elemento Responsivo a Esteróide; GE = Genes Estruturais.

**Figura 2 – Mecanismo de ação de hormônios esteróides**

#### 4.1.1. Estrogênio e seus receptores

O estrogênio (E) está intimamente relacionado a gênese e ao crescimento dos miomas. Este hormônio exerce seus efeitos fisiológicos nas células alvo, através de ligações com receptores nucleares específicos. Embora o número de receptores de estrogênio (RE) varie no miométrio durante o ciclo menstrual, o tecido do mioma continua a ter níveis elevados de RE, especialmente no início das fases folicular e lútea (14). Além disto, o tecido tumoral perde a capacidade de limitar os níveis de receptores de estrogênio.

Existem dois tipos de receptores de estrogênio: o receptor de estrogênio alfa ( $RE\alpha$ ) e o receptor de estrogênio beta ( $RE\beta$ ). O  $RE\beta$  é considerado homólogo ao

RE $\alpha$ , isto é, ocupa a mesma posição, possui a mesma estrutura porém apresenta diferente aspecto e função quando comparado ao RE $\alpha$  no domínio de ligação do DNA e no domínio de ligação ao ligante (45). O mRNA para RE $\alpha$  e RE $\beta$  são expressos no mioma e no miométrio (46-49) e estimulam a transcrição dos genes-alvo da mesma maneira, isto é, utilizam os mesmos mecanismos. Entretanto, o que varia é o grau de ativação destes receptores. O RE $\beta$  possui um grau mais baixo de ativação do que o RE $\alpha$  (50). Estas estruturas podem se combinar de três formas: RE $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ), RE $\beta$  ( $\beta\beta$ ) e RE $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ ). Assim, diferentes tecidos expressam estas combinações em diferentes proporções e cada combinação possui diferente afinidade com o elemento responsivo do estrogênio. O RE $\alpha$  é encontrado no endométrio, nas células de câncer de mama e células do estroma ovariano. Enquanto o RE $\beta$  é encontrado no rim, cérebro, pulmão, mucosa intestinal, próstata e células endoteliais. Embora 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) possa se ligar igualmente bem aos dois receptores, existe uma preferência do hormônio estrona e de raloxifeno de se ligarem ao receptor  $\alpha$  e o hormônio estriol e genistéina (inibidor de atividade de tirosina quinase) ao receptor  $\beta$  (51, 52).

Terapia do agonista GnRH por sua vez inibe a expressão da aromatase P450 nas células dos miomas, sugerindo que a supressão de estrogênio (*in situ*) pode ser um mecanismo adicional do GnRH agonista para induzir a regressão do mioma (53).

O estrogênio media os efeitos mitóticos nas células dos miomas, provocando uma ativação rápida e transitória na rota da MAP-quinase (*mitogen activated protein kinase*) e a transdução de sinais iniciais através da cascata de eventos pela estimulação do 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), incluindo a fosforilação das proteínas celulares em



resíduos de tirosinas, assim como as proteínas intracelulares associadas ao crescimento (GAP) e ativação da proteína quinase auxiliar estão relacionadas com a secreção de PDGF (*platelet-derived growth factor*) induzidas por E2 (54). Além disso, muitas evidências sugerem que a ação do estrogênio pode ser mediada em parte por fatores de crescimento como EGF (*epidermal growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor*) e PDGF (*platelet-derived growth factor*), produzidos pelas células-alvo do útero (55-57).

#### **4.1.2. Progesterona e seus receptores**

A participação da progesterona na patogênese do mioma também é indispensável porque estimula sua atividade mitótica e proliferação celular (58, 59). O crescimento da atividade mitótica em miomas, principalmente na fase secretora do ciclo menstrual, sugere que seu desenvolvimento é afetado pelos níveis de progesterona (60). Os efeitos fisiológicos da progesterona são mediados pela interação com proteínas intracelulares específicas chamadas receptores de progesterona (RPs) (61).

A modulação da expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, em nível de proteína e mRNA, sugere que o aumento de estrogênio regula os receptores de progesterona na fase proliferativa do ciclo menstrual e a diminuição da progesterona regula os receptores de estrogênio na fase secretora do ciclo menstrual. Ambos receptores são expressos em níveis mais elevados em miomas do que em miométrio. Contudo, não se conhece ainda o envolvimento destes hormônios e seus receptores na origem dos miomas (2). Sabe-se que existe um

aumento de mRNA dos RP e de níveis de proteínas no mioma, juntamente com uma elevada proliferação associada ao antígeno Ki-67 comparado ao miométrio adjacente. Isto sugere uma associação entre a sinalização mediada pela progesterona e o crescimento deste tumor (18).

Os receptores de progesterona se apresentam como duas isoformas diferentes: Uma RPA e outra RPB (62). Estes receptores funcionam como fatores de transcrição, mas ambos apresentam funções biológicas diferentes. O RPB funciona como ativador da transcrição do gene responsivo de progesterona (63), enquanto o RPA atua como um potente repressor, dependente do ligante da atividade transcricional do RPB, onde o RPA é inativo como ativador transcricional (64). Existe um complexo *cross-talk* entre os caminhos de sinalização de RE e RP. Como já foi observado, o estrogênio pode induzir a expressão de RP nas células miometriais (65) e aumentar o índice de transcrição do gene do RPB, contudo, ambos podem atuar como potentes repressores dependentes do ligante de atividade do RE (66). Além disso, a progesterona reduz (*down-regulation*) a transcrição do RP estimulado pelo estrogênio (66, 67).

Ambos, RPA e RPB são expressos em mioma e no miométrio. Entretanto os níveis destes fatores de transcrição estão mais elevados no mioma, sendo que o RPA tem uma predominância significativa sobre o RPB (68, 69). A expressão de mRNA do RPB mais elevada em mioma revela um fenótipo ativado para a proliferação estimulado pela progesterona (42, 70).

O crescimento de miomas é o resultado do balanço da dinâmica entre a proliferação, diferenciação e a morte celular (71). Contudo, os mecanismos celulares

fundamentais envolvidos na ação dos hormônios esteróides sexuais, na regulação da proliferação e na apoptose das células dos miomas ainda permanecem desconhecidos (42).

#### **4.1.3. Mecanismos de ação dos hormônios esteróides**

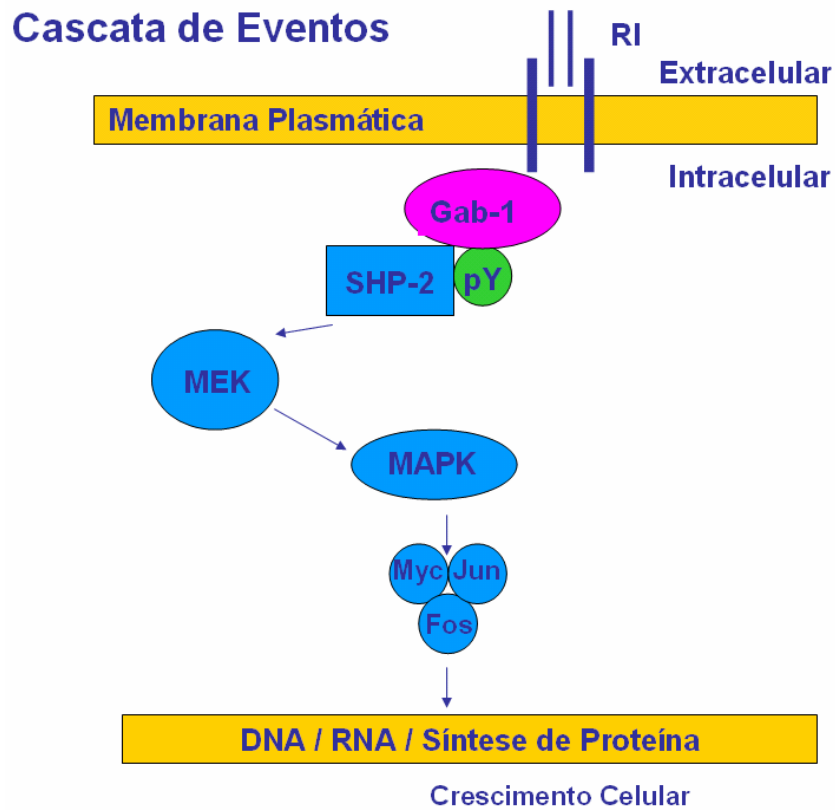
Os hormônios esteróides sexuais coordenam as vias intrincadas envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Contudo, para compreender como estes hormônios exercem o controle dessas vias é preciso conhecer os mecanismos moleculares, que estes hormônios utilizam para promover seus efeitos biológicos. A melhor descrição deste mecanismo, até o momento, é o modelo cascata e foi sugerida por Schuchard (72). Este modelo é aplicável ao estrogênio, progesterona, androgênio e glicocorticóides.

Os hormônios esteróides atravessam a membrana plasmática da célula-alvo e se ligam aos seus receptores nucleares específicos no interior da célula e promovem sua ativação. A ativação do receptor envolve mudanças conformacionais na estrutura do receptor, (associação proteína-proteína) que habilitam o complexo hormônio-receptor a ligar-se com alta afinidade às seqüências de DNA específicas, denominadas elementos responsivos a esteróides (SRE). Estes elementos responsivos são geralmente representados por seqüências de DNA de 15 a 20 pares de bases, localizados anteriormente (*upstream*) ao sítio de início da transcrição do gene responsivo aos esteróides. Uma vez ligado ao elemento responsivo, o complexo hormônio-receptor atua como fator de transcrição modulando a taxa de transcrição destes genes. Este modelo ainda propõe que a

ligação do complexo hormônio-receptor a elementos responsivos a esteróides ativa a transcrição dos chamados genes regulatórios precoces (*early genes*), que respondem em poucos minutos ao estímulo dos esteróides. As proteínas produzidas a partir destes genes entram no núcleo e regulam a transcrição dos chamados genes tardios (*late genes*). Assim, estes genes estruturais vão codificar mRNA para as proteínas que irão exercer o determinado efeito biológico (72).

#### **4.2. Fatores de crescimento e miomas uterinos**

Fatores de crescimento não possuem livre acesso ao interior das células. Para isto, estes hormônios peptídicos se ligam a receptores de membrana que vão dar início a uma cascata de sinalizações dentro das células chamada transdução do sinal (figura 3). Os sinais iniciais são mediados através dos mensageiros secundários assim como cAMP, IP<sub>3</sub>, diacilglicerol (DAG), e Ca<sup>2+</sup>. Estes mensageiros ativam proteínas quinases específicas, as quais ativam fatores de transcrição e ativam proteínas necessárias para promover a regulação da expressão gênica. A especificidade da resposta celular aos sinais extracelulares inicia com um receptor de membrana específico presente na célula-alvo. Na ausência do receptor adequado, a célula não emite resposta aos fatores de crescimento e nem aos hormônios peptídicos (23).



*Trends in Cell Biology*

**Figura 3 – Transdução do sinal de fatores de crescimento (modelo simplificado).**

#### **4.2.1. EGF e seus receptores**

O fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* - EGF) exerce um papel extremamente importante como um fator de crescimento local na regulação do crescimento do mioma (38, 55, 73-75). Mioma e miométrio possuem sítios de ligação específicos com alta afinidade para EGF (38). A expressão do mRNA do EGF e do

mRNA do EGF-R nas células dos miomas e miométrios sugerem que o EGF deve estar envolvido na regulação autócrina e parácrina do crescimento destes tecidos (74). Entretanto os miomas apresentam maior quantidade de mRNA para EGF do que o miométrio na fase secretora do ciclo menstrual (76). O envolvimento dos hormônios esteróides sexuais tem sido relevante na regulação do EGF devido ao tratamento com GnRH agonista que reduz, significativamente não apenas as ligações específicas do EGF, mas também do mRNA do EGF nas células dos miomas, quando comparado a grupos não tratados (77).

#### **4.2.2. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1)**

O IGF-1 é um hormônio peptídico essencial para a regulação do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (78), estruturalmente relacionado à pró-insulina. Este hormônio medeia os efeitos biológicos dos hormônios de crescimento nos mais variados tipos de células. As ações biológicas do IGF-1 são mediadas pelos receptores específicos de IGF-1 (79). Os IGFs são produzidos no fígado e em vários outros tecidos. Promovem efeitos de crescimento e estimulam a síntese de RNA e DNA (24, 80).

A sinalização do IGF-1 tem sido relacionada com muitos processos que envolvem crescimento celular tumoral. O fato de que tumores renais e outros contêm quantidades aumentadas de glicogênio, fosfolipídios e triglicerídios sugerem o envolvimento do IGF-1 no carcinoma renal (12). Estas evidências indicam que o IGF-1 exerce um importante papel na gênese e desenvolvimento de tumores (24, 80).

O IGF-1 está presente em maior quantidade no mioma do que no miométrio (81) e alguns estudos demonstram a presença do mRNA para IGF-1 em mioma e miométrio (80, 82, 83). Giudice e cols. (1) demonstrou que o mRNA para IGF-1 em mioma era mais abundante durante o final da fase proliferativa do ciclo menstrual. Os hormônios esteróides sexuais afetam os níveis de mRNA do IGF-1, mas não os níveis de mRNA do receptor do IGF-1 nas células cultivadas de mioma. Nenhuma diferença significativa foi observada na expressão do mRNA do receptor do IGF-1 entre as culturas tratadas e não tratadas tanto com estrogênio ou progesterona (84). Estes resultados fornecem evidências que a progesterona bloqueia (*down-regulated*) a expressão do IGF-1 em miomas cultivados, sem afetar a expressão do receptor do IGF-1. Além disto, as culturas de mioma e miométrio de mulheres tratadas com agonistas de GnRH secretam, significativamente, menos IGF-1 em comparação a tecidos não tratados (85). A administração do agonista de GnRH está associada com o decréscimo tanto dos níveis de mRNA de IGF-1 (86) como com a expressão do receptor de IGF-1 imunorreativo (87). Estes resultados sugerem que o IGF-1 possa estar envolvido na regulação do crescimento dos miomas, como mediador local de ação promotora de crescimento dos esteróides sexuais (79).

#### **4.2.3. IGF-1 e seus receptores**

Os receptores de membrana da (IGF-1R) são heterotetraméricos e possuem duas subunidades  $\alpha$  (135 kDa) e duas subunidades  $\beta$  (95 kDa). As subunidades são ligadas por pontes de dissulfeto. A subunidade  $\alpha$ , localizada fora da membrana plasmática, é o sítio de ligação para o IGF-1. As subunidades  $\beta$  são proteínas

transmembrana, com atividade intrínseca de tirosina quinase. A ligação do IGF-1 à subunidade  $\beta$  do receptor ativa as quinases e através da fosforilação de proteínas celulares em direção a resíduos de tirosina e serina transmite o sinal de IGF-1 à célula alvo (88, 89). Através da indução de protooncogenes (c-jun e c-fos), o IGF-1 regula a transcrição do DNA. Os produtos dos protooncogenes jun e fos (AP-1) formam heterodímeros que se ligam ao DNA em uma região promotora de genes e interferem no ciclo da divisão celular (24). O mRNA dos receptores de IGF-1 não é dependente dos estágios do ciclo menstrual (1).

#### **4.3. Transdução do sinal do IGF-I**

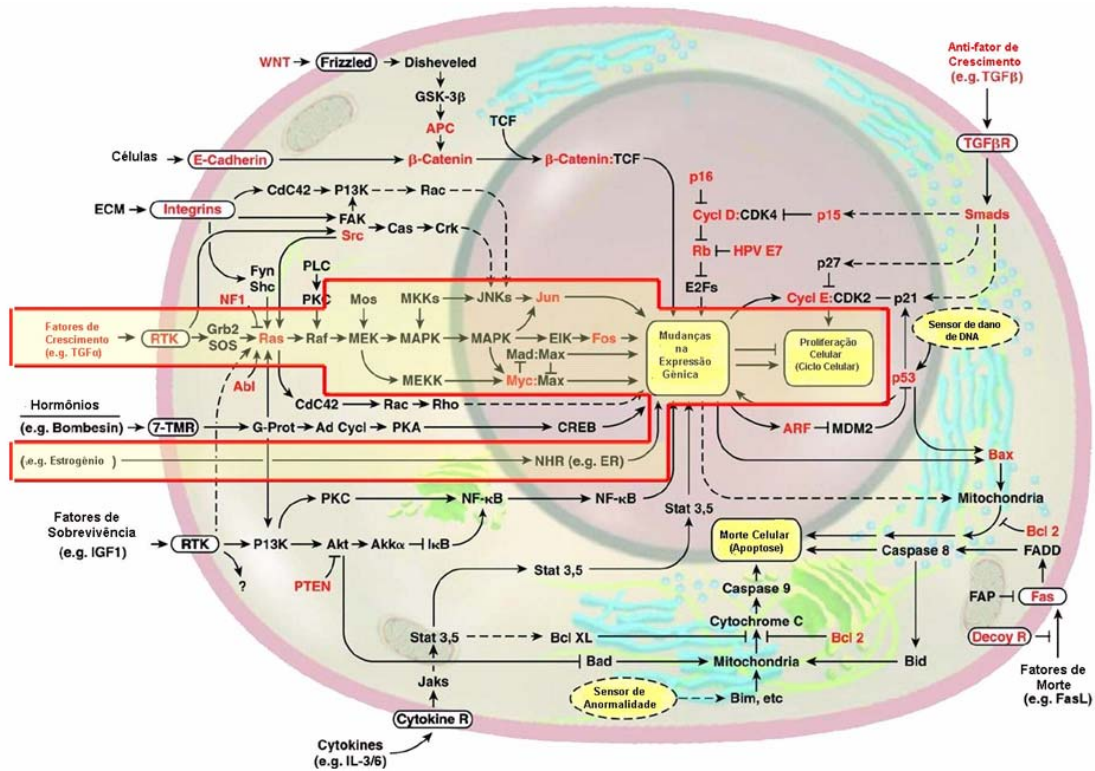
O processo inicia com a autofosforilação do receptor do IGF-1R e fosforilação de Shc, Grb2, Grb10 (79, 90). O IGF-1 se liga na subunidade  $\beta$  que permite a ligação do ATP no resíduo de lisina 1030. Com o ATP ligado, o domínio quinase sofre uma rotação ao longo do seu eixo principal e em direção ao domínio carboxi-terminal da subunidade  $\beta$ . Ocorre então a fosforilação nos três domínios de tirosina específicos na subunidade  $\beta$ . Estes domínios causam a fosforilação dos sítios ativos da outra subunidade  $\beta$ , num modelo chamado transforilação (91). Estas moléculas interagem com a transdução de sinal através da cascata de eventos, resultando na ativação da MAPK (*mitogen-activated protein-kinase*) e PI3K (fosfatidilinositol 3-kinase). A MAP quinase é uma serina-treonina quinase que transmite o sinal de IGF-1, ao núcleo onde regula a expressão gênica de proteínas envolvidas no ciclo e proliferação celular (92). A ativação da MAP quinase é considerada ponto crítico para a proliferação, embora o PI3K seja também importante para mediar os sinais



metabólicos e anti-apoptóticos do IGF-1. A PI3K é uma enzima heterodimérica, composta de uma unidade regulatória (p85) e de uma subunidade catalítica (p110). Esta enzima liga fosfoinosítídeos da membrana, catalizando sua fosforilação. Isto gera vários mediadores que estão envolvidos com a captação da glicose e síntese de glicogênio, lipídios, e proteínas, bem como a modulação gênica (93). Contudo, a MAP quinase fosforila os fatores de transcrição e induz à transcrição imediata dos genes precoces (protooncogenes) como c-fos e c-jun (92).

#### **4.4. Mecanismos de interação entre os esteróides e fatores de crescimento**

O  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) estimula a participação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), mas bloqueia a proteína p53 nas células dos miomas. Contudo, a progesterona aumenta o EGF, a proteína bcl-2 e inibe o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Sabe-se que o EGF e o IGF-1 atuam como fatores locais, estimulando o crescimento dos miomas. Estas evidências sugerem que a progesterona pode ter uma ação dupla, ou seja, uma ação estimulatória e outra inibitória no crescimento e na sobrevivência das células dos miomas, dependendo das condições locais do fator de crescimento ao redor de cada tumor (42), isto é, o efeito destes esteróides no crescimento tumoral é mediado pela produção local de fatores de crescimento que exercem efeitos autócrinos e parácrinos nas células ao seu redor (2) (figura 4).



Cell, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000, Copyright ©2000 by Cell Press  
The Hallmarks of Cancer Review

**Figura 4- Interação das rotas de transdução de sinal de hormônios esteróides e fatores de crescimento.**

## 5. PROTOONCOGENES

Os protooncogenes são genes celulares normais conhecidos como genes regulatórios precoces, cuja ativação ocorre em alguns minutos até uma hora após o estímulo. Os protooncogenes desempenham um papel importante na coordenação de eventos que levam à proliferação e diferenciação das células normais. Em resposta a fatores promotores de crescimento como, os fatores de crescimento polipeptídicos e hormônios esteróides, a expressão de protooncogenes nucleares são alterados rapidamente de maneira coordenada. Esta classe de protooncogenes

apresenta uma grande variedade como, por exemplo, c-myc, c-fos, c-jun, c-myb entre outros (72).

### **5.1. c-myc**

O protooncogene c-myc é homólogo celular normal do oncogene retroviral v-myc, identificado pela primeira vez na mielocitomatose aviária, o responsável pela leucemia em galinhas (94, 95). Este gene está localizado no cromossoma 8q24 em humanos, é organizado em três exons e apresenta dois promotores P1 e P2 (96). O gene c-myc é expresso durante a proliferação em uma grande variedade de tecidos adultos e em todos estágios de desenvolvimento embrionário. A proteína codificada por c-myc é expressa em quase todos os tipos celulares com um alto potencial de proliferação (97). Dentre as funções propostas para c-myc estão a promoção da replicação do DNA, a regulação das fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular, o controle da diferenciação e da morte celular (94, 95). Pertence a uma família de genes composta por sete membros, myc, mycn, mycl, pmyc, smyc e bmyc (95, 96). Dos genes desta família, c-myc é o mais estudado e pode ser regulado por hormônios esteróides, fatores de crescimento e diversos outros fatores (97).

A proteína MYC desempenha um importante papel nas vias do sinal de transdução promovendo a formação de células de proliferação e apoptose (98). As mudanças na expressão de c-myc podem ser encontradas em diversas neoplasias humanas. e produzidas por amplificação gênica (99, 100), translocação cromossomal (101) e outros eventos genéticos.

## 5.2. c-fos

O gene fos foi detectado a partir do oncogene v-fos do vírus osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MSV) (102) em 1982. Pouco tempo depois seu gene homólogo c-fos foi descrito e localizado no cromossomo 12q24.3-31. O protooncogene c-fos codifica uma fosfoproteína que juntamente com a fosfoproteína codificada por c-jun forma o complexo AP-1 (103, 104). Este complexo é um fator transcricional envolvido no crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento, com sua atividade modulada por fatores de crescimento, citocinas, oncogenes e promotores tumorais ativando a proteína quinase C (103).

O gene c-fos possui quatro exons, codifica 380 aminoácidos e a proteína Fos possui um peso molecular que pode variar de 55 a 62 kDa. A expressão de c-fos é mais transitória do que a expressão de c-jun, devido à instabilidade na transcrição e na seqüência do segmento da proteína codificada (104). Contudo, a proteína c-Fos possui regiões periódicas de repetições de resíduos de leucina a cada sete aminoácidos (zíper de leucina). Essas estruturas encontradas nos fatores de transcrição são necessárias para a formação de heterodímeros juntamente com os produtos de outro oncogene nuclear *jun* (105) e são responsáveis pela especificidade e estabilidade da formação homo-heterodimerização pelas proteínas Jun e Fos (106).

### 5.3. c-jun

O protooncogene c-jun foi descoberto por Maki Y. et al. em 1987 (107). É homólogo celular normal do oncogene v-jun de sarcoma, vírus 17 de aves e está localizado no cromossomo 1p32-31 (104). A expressão deste protooncogene também é alterada em resposta a fatores promotores do crescimento celular como os hormônios esteróides (72). A abundância e atividade de c-jun são moduladas quando as células são expostas a estímulos extracelulares. A família Jun contém ainda os genes JunB e JunD (108).

A proteína Jun possui um peso molecular de 38kDa e o gene c-jun codifica também uma fosfoproteína que pode formar homodímeros ou heterodímeros Jun/Fos, formando o complexo AP-1 que tem como finalidade ativar outros genes envolvidos na proliferação celular (72, 106). Portanto, na forma heterodímero Fos/Jun, Fos não só contribui no processo de ligação ao DNA como também colabora na ativação da transcrição celular. O complexo AP-1 exerce um papel de extrema importância no controle da transição de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>/S do ciclo celular (109). Assim, o dímero Fos/Jun exemplifica a intrincada regulação da resposta precoce dos genes aos estímulos externos (105) Nas células normais, a correlação entre estágios iniciais de proliferação e a expressão de fos, jun e myc sugere que estes protooncogenes funcionam como mediadores de vias bioquímicas reguladoras da proliferação e que suas respectivas formas oncogênicas podem atuar através da alteração dos mecanismos de controle do crescimento normal (110).

### 5.3.1. Expressão de c-myc, c-fos e c-jun

A expressão de c-myc, c-fos e c-jun tem sido analisada em diversos modelos experimentais. Estes genes são examinados em várias linhagens de células humanas responsivas ao hormônio esteróides sexuais.

Em células de mama humana normal, o estradiol aumenta a expressão de c-myc de forma bifásica (111). Considerando que o estrogênio, sob influência de progesterona, regula o crescimento do tecido uterino humano é possível dizer que este hormônio também induz mRNA de c-myc. O tratamento com estradiol aumentou a expressão do mRNA de c-myc em mioma e miométrio quando comparado aos tecidos controles mas não aumentou a expressão do mRNA de c-myc no endométrio (112).

Em células de câncer de mama humanas MCF-7, a expressão de c-fos é induzível apenas por  $17\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) (113) ou através de vários fatores de crescimento peptídeo (114). Tanto o quanto o tamoxifeno (agente anti-estrogênio) aumentam a expressão do mRNA de c-fos no crescimento de células em EnCa101 e EnCa-X em ratos. O E<sub>2</sub> também induz a expressão do mRNA de c-jun nestas células (115). Em endométrio e miométrio de ratos, o estrogênio é um mitógeno (116) e induz os mRNAs de c-fos e c-jun (117, 118).

O E<sub>2</sub> possui efeitos opostos na expressão de c-jun em epitélio endometrial e miométrio de ratos, induzindo c-jun em miométrio, mas por outro lado, diminuindo a expressão de mRNA em epitélio luminal. Não há nenhum estudo mostrando como as mudanças fisiológicas de hormônios esteróides sexuais afetam as expressões de c-jun e c-fos em tecidos uterinos humanos. Em miométrio de ratos, o estrogênio

estimula ambas as expressões de c-jun e c-fos, e a progesterona atenua o mRNA de c-fos induzido por estrogênio (119, 120). Portanto, acredita-se que a expressão irregular de protooncogenes em amostras de tecido de miométrio humano pode ser devido às proporções variáveis e ao delicado equilíbrio entre estimulação e inibição de fatores em cada indivíduo.

Considerando a associação de c-fos e c-jun com a proliferação da célula, a fraca expressão destes protooncogenes em miométrio é coerente com a baixa atividade mitótica neste tecido. Estas evidências demonstram ser muito difícil avaliar o papel independente do estrogênio ou da progesterona na expressão dos protooncogenes no miométrio (121) A função e a regulação hormonal de c-fos e c-jun em miométrio humano não estão claras e os reguladores parácrinos e/ou autócrinos da expressão de c-jun e c-fos no endométrio e em miométrio podem ser diferentes (122).

Os protooncogenes c-fos e c-jun são igualmente expressos no endométrio proliferativo e secretor, assim como durante a gestação. A expressão de c-fos e c-jun ser quase indetectável, fortalece a hipótese de que o estrogênio induz a transcrição dos genes c-fos e c-jun diretamente via seu próprio receptor, já que receptores de estrogênio estão presentes na fase proliferativa e secretora do endométrio, mas diminuídos no endométrio de grávidas (123, 124). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é capaz de ativar a transformação de c-jun e c-fos em várias células *in vitro* (103, 125-127). Além disso, o fator de transcrição c-jun é um alvo nuclear em resíduos de tirosina induzida por IGF-1, o que

se considera uma parte do sinal da transdução mitogênica das células (122, 128, 129).



## **6. OBJETIVOS**

Comparar a expressão gênica (mRNA) dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio e mioma humanos.

Comparar a expressão protéica dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio e mioma humanos.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, Pannier EM, Jin IH, Vu TH, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8(11):1796-806.
2. Lee BS, Margolin SB, Nowak RA. Pirfenidone: a novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):219-23.
3. De Leo V, la Marca A, Morgante G, Severi FM, Petraglia F. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75(3):632-3.
4. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;16(10):2103-8.
5. Strawn EY, Jr., Novy MJ, Burry KA, Bethea CL. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(6):1837-43; discussion 1843-4.
6. Otubu JA, Buttram VC, Besch NF, Besch PK. Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1982;143(2):130-3.
7. Novak RA. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K, Diamond M, editors. *Endometrium and Endometriosis*. Malden: Blackwell Science; 1997. p. 301-10.
8. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3 Pt 1):814-9.
9. Christman GM, McCarthy JD. Gene therapy and uterine leiomyomas. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):425-35.
10. Guarnaccia MM, Rein MS. Traditional surgical approaches to uterine fibroids: abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):385-400.

11. Stewart EA, Jackson KV, Friedman AJ, Rein MS, Fox JH, Hornstein MD. The effect of baseline complex ovarian cysts on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1992;57(6):1274-8.
12. Kellerer M, von Eye Corleta H, Muhlhofer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. Insulin- and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62(5):501-7.
13. Corleta HE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(12):1593-7.
14. Andersen J, Barbieri RL. Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Investig* 1995;2(5):663-72.
15. Geimonen E, Boylston E, Royek A, Andersen J. Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(4):1177-85.
16. Vollenhoven B. Introduction: the epidemiology of uterine leiomyomas. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1998;12(2):169-76.
17. Townsend DE, Sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 1970;107(8):1168-73.
18. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, et al. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(1):78-85.
19. Wei JJ, Chiriboga L, Arslan AA, Melamed J, Yee H, Mittal K. Ethnic differences in expression of the dysregulated proteins in uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 2006;21(1):57-67.
20. Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, Stolley PD, Guzinski GM. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *J Reprod Med* 1996;41(7):483-90.
21. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90(6):967-73.

22. Baird DD, Dunson DB. Why is parity protective for uterine fibroids? *Epidemiology* 2003;14(2):247-50.
23. Andersen J. Factors in fibroid growth. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1998;12(2):225-43.
24. Chaves EBM, Brum IS, Stoll J, Capp E, Corleta HE. Insulin-like growth factor 1 receptor mRNA expression and autophosphorylation in human myometrium and leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57(4):210-3.
25. Palmer SS, Haynes-Johnson D, Diehl T, Nowak RA. Increased expression of stromelysin 3 mRNA in leiomyomas (uterine fibroids) compared with myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 1998;5(4):203-9.
26. De Leo V, Morgante G, La Marca A, Musacchio MC, Sorace M, Cavicchioli C, et al. A benefit-risk assessment of medical treatment for uterine leiomyomas. *Drug Saf* 2002;25(11):759-79.
27. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):316-26.
28. Abbott JA, Garry R. The surgical management of menorrhagia. *Hum Reprod Update* 2002;8(1):68-78.
29. Akinyemi BO, Adewoye BR, Fakoya TA. Uterine fibroid: a review. *Niger J Med* 2004;13(4):318-29.
30. Casey R, Rogers PA, Vollenhoven BJ. An immunohistochemical analysis of fibroid vasculature. *Hum Reprod* 2000;15(7):1469-75.
31. Poncelet C, Madelenat P, Feldmann G, Walker F, Darai E. Expression of von Willebrand's factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor in uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 2002;78(3):581-6.
32. Folkman J. Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence. *Endocrinology* 1998;139(2):441-2.
33. Weston G, Trajstman AC, Gargett CE, Manuelpillai U, Vollenhoven BJ, Rogers PA. Fibroids display an anti-angiogenic gene expression profile when compared with adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9(9):541-9.
34. Farquhar CM, Steiner CA. Hysterectomy rates in the United States 1990-1997. *Obstet Gynecol* 2002;99(2):229-34.

35. Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen TC, Belitskaya-Levy I, Tang MS, et al. Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum Reprod* 2005;20(4):852-63.
36. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357(9252):293-8.
37. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94(4):435-8.
38. Hofmann GE, Rao CV, Barrows GH, Schultz GS, Sanfilippo JS. Binding sites for epidermal growth factor in human uterine tissues and leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58(5):880-4.
39. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1037-54.
40. Coronado GD, Marshall LM, Schwartz SM. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000;95(5):764-9.
41. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(2):CD000547.
42. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2004;10(3):207-20.
43. Skerrett PJ. "Matrix algebra" heals life's wounds. *Science* 1991;252(5010):1064-6.
44. Truss M, Chalepakis G, Slater EP, Mader S, Beato M. Functional interaction of hybrid response elements with wild-type and mutant steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol* 1991;11(6):3247-58.
45. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392(1):49-53.
46. Pedeutour F, Quade BJ, Weremowicz S, Dal Cin P, Ali S, Morton CC. Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23(4):361-6.
47. Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honore JC, Mignot TM, et al. Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the

- human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 1):E1112-8.
48. Kovacs KA, Oszter A, Gocze PM, Kornyei JL, Szabo I. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2001;7(11):1085-91.
49. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T. Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 2003;68(1):11-9.
50. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 1999;246(2):133-8.
51. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 2003;9(6):1980-9.
52. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):5925-30.
53. Shozu M, Sumitani H, Segawa T, Yang HJ, Murakami K, Inoue M. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuporelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5405-11.
54. Barbarisi A, Petillo O, Di Lieto A, Melone MA, Margarucci S, Cannas M, et al. 17-beta estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2001;186(3):414-24.
55. Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1990;4(3):510-23.
56. Murphy LJ, Ghahary A. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 1990;11(3):443-53.
57. Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetke NC, Bossert NL, Ross K, et al. Transforming growth factor-alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 1992;131(4):1657-64.

58. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000;65(10-11):585-92.
59. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 5:791-3.
60. Kawaguchi K, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Nonogaki H, Mori T. Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160(3):637-41.
61. Conneely OM, Lydon JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65(10-11):571-7.
62. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* 1990;9(5):1603-14.
63. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8356-64.
64. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7(10):1244-55.
65. Okulicz WC, Savasta AM, Hoberg LM, Longcope C. Immunofluorescent analysis of estrogen induction of progesterone receptor in the rhesus uterus. *Endocrinology* 1989;125(2):930-4.
66. Graham JD, Roman SD, McGowan E, Sutherland RL, Clarke CL. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1995;270(51):30693-700.
67. Hodges LC, Houston KD, Hunter DS, Fuchs-Young R, Zhang Z, Wineker RC, et al. Transdominant suppression of estrogen receptor signaling by progesterone receptor ligands in uterine leiomyoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;196(1-2):11-20.
68. Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and

protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 1997;12(4):815-22.

69. Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999;14(11):2844-50.

70. Fujimoto J, Hirose R, Ichigo S, Sakaguchi H, Li Y, Tamaya T. Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma. *Tumour Biol* 1998;19(2):126-31.

71. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.

72. Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 1993;14(6):659-69.

73. Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(1):21-5.

74. Yeh J, Rein M, Nowak R. Presence of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor demonstrable in monolayer cell cultures of myometria and leiomyomata. *Fertil Steril* 1991;56(5):997-1000.

75. Rossi MJ, Chegini N, Masterson BJ. Presence of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and their receptors in human myometrial tissue and smooth muscle cells: their action in smooth muscle cells in vitro. *Endocrinology* 1992;130(3):1716-27.

76. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(5):1179-84.

77. Lumsden MA, West CP, Bramley T, Rumgay L, Baird DT. The binding of epidermal growth factor to the human uterus and leiomyomata in women rendered hypo-oestrogenic by continuous administration of an LHRH agonist. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95(12):1299-304.



78. Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 1999;11(8):563-74.
79. Duan C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol* 2002;175(1):41-54.
80. Gloudemans T, Prinsen I, Van Unnik JA, Lips CJ, Den Otter W, Sussenbach JS. Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. *Cancer Res* 1990;50(20):6689-95.
81. Chandrasekhar Y, Heiner J, Osuamkpe C, Nagamani M. Insulin-like growth factor I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166(1 Pt 1):64-9.
82. Hoppener JW, Mosselman S, Roholl PJ, Lambrechts C, Slebos RJ, de Pagter-Holthuizen P, et al. Expression of insulin-like growth factor-I and -II genes in human smooth muscle tumours. *Embo J* 1988;7(5):1379-85.
83. Boehm KD, Daimon M, Gorodeski IG, Sheean LA, Utian WH, Ilan J. Expression of the insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues. *Mol Reprod Dev* 1990;27(2):93-101.
84. Yamada T, Nakago S, Kurachi O, Wang J, Takekida S, Matsuo H, et al. Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-I expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod* 2004;19(4):815-21.
85. Rein MS, Friedman AJ, Pandian MR, Heffner LJ. The secretion of insulin-like growth factors I and II by explant cultures of fibroids and myometrium from women treated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Obstet Gynecol* 1990;76(3 Pt 1):388-94.
86. Englund K, Lindblom B, Carlstrom K, Gustavsson I, Sjoblom P, Blanck A. Gene expression and tissue concentrations of IGF-I in human myometrium and fibroids under different hormonal conditions. *Mol Hum Reprod* 2000;6(10):915-20.
87. Di Lieto A, Iannotti F, De Falco M, Staibano S, Pollio F, Ciociola F, et al. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor type I receptor and uterine volume changes in gonadotropin-releasing hormone analog-treated uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(3):702-6.
88. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995;16(2):117-42.

89. Damon SE, Plymate SR, Carroll JM, Sprenger CC, Dechsukhum C, Ware JL, et al. Transcriptional regulation of insulin-like growth factor-I receptor gene expression in prostate cancer cells. *Endocrinology* 2001;142(1):21-7.
90. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001;22(1):53-74.
91. Dupont J, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res* 2001;55 Suppl 2:22-6.
92. Seedorf K. Intracellular signaling by growth factors. *Metabolism* 1995;44(10 Suppl 4):24-32.
93. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341(4):248-57.
94. De Pinho RA, Schreiber-Agus N, Alt FW. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991;57:1-46.
95. Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 2003;416(2):129-36.
96. Hesketh R. *The Oncogenes*. Academic Press, London 1995;The Oncogene Facts Book:45-289.
97. Hann SR, Eisenman RN. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 1984;4(11):2486-97.
98. Hueber AO, Evan GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet* 1998;14(9):364-7.
99. Shibuya M, Yokota J, Ueyama Y. Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1985;5(2):414-8.
100. Alitalo K, Ramsay G, Bishop JM, Pfeifer SO, Colby WW, Levinson AD. Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature* 1983;306(5940):274-7.
101. Hamlyn PH, Rabbitts TH. Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 1983;304(5922):135-9.

102. Curran T, Teich NM. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *J Virol* 1982;42(1):114-22.
103. Sato A. Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;28(272):17485-17494.
104. Sng JC, Taniura H, Yoneda Y. A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 2004;27(5):606-12.
105. Ransone LJ, Verma IM. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:539-57.
106. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 25):5965-73.
107. Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(9):2848-52.
108. Minden A, Karin, M. The JNK Family of MAP Kinases: Regulation and Function. Academic Press, San Diego. In Bert W O' Malley Ed. 1998;Hormones and Signaling:209-233.
109. Lotfi CF, Costa ET, Schwindt TT, Armelin HA. Role of ERK/MAP kinase in mitogenic interaction between ACTH and FGF2 in mouse Y1 adrenocortical tumor cells. *Endocr Res* 2000;26(4):873-7.
110. Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr Rev* 1997;18(4):435-61.
111. Leygue E, Gol-Winkler R, Gompel A, Louis-Sylvestre C, Soquet L, Staub S, et al. Estradiol stimulates c-myc proto-oncogene expression in normal human breast epithelial cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52(4):299-305.
112. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Nishigaki M, Tamaya T. Tissue differences in the expression of mRNAs of Ha-ras, c-myc, fos and jun in human uterine endometrium, myometrium and leiomyoma under the influence of estrogen/progesterone. *Tumour Biol* 1994;15(6):311-7.

113. Burg DL, Feldbush TL. Late events in B cell activation. Expression of membrane alkaline phosphatase activity. *J Immunol* 1989;142(2):381-7.
114. Wilding G, Lippman ME, Gelmann EP. Effects of steroid hormones and peptide growth factors on protooncogene c-fos expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1988;48(4):802-5.
115. Sakakibara K, Kan NC, Satyaswaroop PG. Both 17 beta-estradiol and tamoxifen induce c-fos messenger ribonucleic acid expression in human endometrial carcinoma grown in nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166(1 Pt 1):206-12.
116. Kirkland JL, LaPointe L, Justin E, Stancel GM. Effects of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. *Biol Reprod* 1979;21(2):269-72.
117. Weisz A, Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol* 1988;2(9):816-24.
118. Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 1990;18(17):5097-106.
119. Bigsby RM, Li A. Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology* 1994;134(4):1820-6.
120. Nephew KP, Tang M, Khan SA. Estrogen differentially affects c-jun expression in uterine tissue compartments. *Endocrinology* 1994;134(4):1827-34.
121. Gustavsson I, Englund K, Faxen M, Sjoblom P, Lindblom B, Blanck A. Tissue differences but limited sex steroid responsiveness of c-fos and c-jun in human fibroids and myometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(1):55-9.
122. Salmi A, Rutanen FM. C-fos and c-jun expression in human endometrium and myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 1996;117(2):233-40.
123. Huang SJ, Cheng L, Lewin KJ, Fu YS. Immunohistochemical estrogen receptor assessment in hyperplastic, neoplastic, and physiologic endometria. *Pathol Res Pract* 1991;187(4):487-95.
124. Noci I, Borri P, Periti E, Branconi F, Messeri G, Tozzi P, et al. Decidual progesterone and estrogen receptors in the first trimester of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:26-32.

125. Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 1994;8(1):40-50.
126. Pirskanen A, Jaaskelainen T, Maenpaa PH. Insulin-like growth factor-1 modulates steroid hormone effects on osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells. *Eur J Biochem* 1993;218(3):883-91.
127. Viard I, Jaillard C, Saez JM. Regulation by growth factors (IGF-I, b-FGF and TGF-beta) of proto-oncogene mRNA, growth and differentiation of bovine adrenocortical fasciculata cells. *FEBS Lett* 1993;328(1-2):94-8.
128. Oemar BS, Law NM, Rosenzweig SA. Insulin-like growth factor-1 induces tyrosyl phosphorylation of nuclear proteins. *J Biol Chem* 1991;266(36):24241-4.
129. Rosenzweig SA, Oemar BS, Law NM, Shankavaram UT, Miller BS. Insulin like growth factor 1 receptor signal transduction to the nucleus. *Adv Exp Med Biol* 1993;343:159-68.

## 8. ARTIGO EM PORTUGUÊS

### **EXPRESSÃO DOS PROTOONCOGENES *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS**

### **EXPRESSION OF PROTOONCOGENES *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* IN HUMAN NORMAL MIOMETRIUM AND LEIOMYOMA**

Ana Luiza Ferrari<sup>1,4</sup>, Antônio Miragem<sup>3,4</sup>, Mateus Reche<sup>2,4</sup>, Ilma S. Brum<sup>2,4</sup>, Maria Beatriz Kohek<sup>5</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,2,4</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, <sup>2</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, <sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <sup>5</sup>Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Endereço para correspondência:

Edison Capp

Rua Dr. Barros Cassal, 411/22

CEP 90035 003 - Porto Alegre, RS

edcapp@ufrgs.br

FAX: (051) 3311 6588

## RESUMO

Miomas uterinos são tumores comumente benignos do trato genital feminino. A expressão dos elementos (entre eles os protooncogenes c-myc, c-fos e c-jun) que compõem a cascata de transdução do sinal de fatores de crescimento parece estar envolvida no seu desenvolvimento. **Objetivo:** comparar a expressão gênica (mRNA) e protéica dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun em miométrio e mioma humano. **Material e Método:** foi realizado um estudo do tipo caso-controle. O material foi coletado de 12 pacientes submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A expressão do mRNA específico para c-myc, c-fos, c-jun e  $\beta$ -microglobulina foi avaliada pela técnica de RT-PCR, utilizando primers específicos para cada gene. A expressão protéica destes protooncogenes foi avaliada através de *western blot* com anticorpos específicos. **Resultados:** não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica destes proto-oncogenes entre miométrio normal e mioma (c-myc  $0,87 \pm 0,08$  X  $0,87 \pm 0,08$ ,  $p = 0,952$ ; c-fos  $1,10 \pm 0,17$  X  $1,01 \pm 0,11$ ,  $p = 0,21$ ; e c-jun  $1,03 \pm 0,12$  X  $0,96 \pm 0,09$ ,  $p = 0,168$ , respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão protéica destes protooncogenes entre miométrio normal e mioma (c-Myc  $1,36 \pm 0,48$  X  $1,53 \pm 0,29$ ,  $p = 0,569$ ; c-Fos  $8,85 \pm 5,5$  X  $6,56 \pm 4,22$ ,  $p = 0,434$ ; e c-Jun  $6,47 \pm 3,04$  X  $5,42 \pm 2,03$ ,  $p = 0,266$ , respectivamente). **Conclusão:** a expressão gênica (transcrição) e a expressão protéica (tradução) dos protooncogenes c-myc, c-fos e c-jun não são diferentes entre mioma e miométrio normal.

**Palavras-chave:** miométrio, mioma, hormônios esteróides, fatores de crescimento, protooncogenes, c-myc, c-fos, c-jun.

## ABSTRACT

Uterine myomas are common benign tumors of the female genital tract. The expression of growth factors signal transduction cascade components, among them the protooncogenes c-myc, c-fos and c-jun, seems to be involved in the development of myomas. **Objective:** to compare the gene (mRNA) and protein expression of the protooncogenes c-fos, c-myc and c-jun in human myometrium and leiomyoma.

**Material and Methods:** a case-control study was performed. Samples were collected from 12 patients submitted to hysterectomy at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The expression of the specific mRNA for c-myc, c-fos, c-jun and  $\beta$ -microglobulin was assessed through the RT-PCR technique, using specific primers to each gene. The protein expression of those protooncogenes was evaluated through western blot with specific antibodies. **Results:** there was no statistically significant difference in the gene expression of these protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c-myc  $0.87 \pm 0.08$  X  $0.87 \pm 0.08$ ,  $p = 0.952$ ; c-fos  $1.10 \pm 0.17$  X  $1.01 \pm 0.11$ ,  $p = 0.21$ ; e c-jun  $1.03 \pm 0.12$   $0.96 \pm 0.09$ ,  $p = 0.168$ , respectively). There was no statistically significant difference in the protein expression of these protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c-Myc  $1.36 \pm 0.48$  X  $1.53 \pm 0.29$ ,  $p = 0.569$ ; c-Fos  $8.85 \pm 5.5$  X  $6.56 \pm 4.22$ ,  $p = 0.434$ ; e c-Jun  $6.47 \pm 3.04$  X  $5.42 \pm 2.03$ ,  $p = 0.266$ , respectively). **Conclusion:** there are no differences in the gene expression (transcription), neither in the protein expression (translation) of the protooncogenes c-myc, c-fos, and c-jun between leiomyoma and myometrium.

**Key-words:** myometrium, leiomyoma, steroid hormones, growth factors, protooncogenes, c-myc, c-fos, c-jun.



## INTRODUÇÃO

Os miomas ou leiomiomas são os tumores mais comuns do trato genital feminino e acometem 20 a 40 % das mulheres em idade reprodutiva (1). São comumente benignos, no entanto, podem causar distúrbios hemorrágicos, dor pélvica e não raramente abortamento recorrente e infertilidade (2, 3). O único tratamento curativo disponível é a cirurgia, seja histerectomia ou enucleação dos miomas. É sabido que o ambiente endócrino é o maior determinante do crescimento dos miomas, uma vez que seu crescimento pára ou eles até mesmo diminuem de tamanho após a menopausa (2). O fato dos miomas aparecerem durante o tempo de vida reprodutiva, aumentarem durante a gestação e regredirem após a menopausa sugere que eles dependem dos hormônios ovarianos (4-8).

Há crescentes evidências de que insulina, fatores de crescimento (IGF-1, EGF, VEGF) e seus receptores e elementos da cadeia de transdução do sinal estejam envolvidos na transformação tumoral de tecidos dependentes de hormônios peptídicos (mama e trato gastrointestinal) e de tecidos não dependentes de hormônio (cérebro, medula, rins) (9-12). A cascata de transdução de sinal destes hormônios peptídicos envolve quinases (que fosforilam resíduos de tirosina, serina e treonina), fosfatases e protooncogenes.

Protooncogenes são genes celulares normais, conhecidos como genes regulatórios precoces, cuja ativação ocorre dentro de alguns minutos até uma hora após o estímulo. Os protooncogenes têm papel importante na coordenação de eventos que levam à proliferação e diferenciação em células normais. Em resposta a

fatores de crescimento e hormônios esteróides, a expressão de protooncogenes (como fos, myc e jun) é alterada rapidamente e de maneira coordenada (13).

A fim de possibilitar novas estratégias terapêuticas para os miomas, torna-se essencial um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação do seu crescimento. O objetivo deste trabalho foi identificar e comparar a expressão dos protooncogenes, c-fos, c-myc e c-jun em miométrio e mioma humanos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Delineamento do estudo**

Foi realizado estudo do tipo caso-controle.

### **População e amostra**

Participaram deste estudo 12 mulheres que foram a histerectomia por indicações não relacionadas com esta pesquisa no Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sem influência deste protocolo de pesquisa. Foram excluídas pacientes que utilizavam medicação hormonal ou que tinham diabetes mellitus. As pacientes foram informadas e autorizaram a utilização de parte do material para estudo da expressão dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun. O material obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até ser preparado por técnicas efetivas no estudo da atividade da expressão dos protooncogenes c-fos, c-myc e c-jun.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Extração do RNA e Síntese do cDNA**

Para extração de RNA e a síntese de cDNA, as amostras de miométrio e mioma foram homogeneizadas em fenol-isotiocianato de guanidina (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). O RNA total foi extraído com clorofórmio e precipitado com isopropanol por centrifugação a 12.000 g a 4°C. O pellet do RNA foi lavado duas vezes com etanol e ressuscitado em água tratada com dietilpicrocarbonato e quantificado por espectrofotometria a 260 nm. O primeiro molde de cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do total de RNA, usando o Sistema de Pré-amplificação SuperScript (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

### **Transcrição Reversa e Reação de Polimerase em Cadeia (RT-PCR)**

RT-PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. Dois µL da primeira reação de síntese da fita (com aproximadamente 4 ng de cDNA) foi desnaturado a 94°C por 1 min em presença de 20 mM Tris-HCl pH 8.4 , 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Depois do aquecimento inicial, adicionou-se 1,25 U de Taq DNA polimerase a mesma solução tampão Tris-HCl , 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de primers *sense* e *antisense* e 0,2 mM dNTP mix. A seqüência dos primers e o tamanho do fragmento de cDNA estão listados na tabela 1 e as condições da PCR dos diferentes genes estudados estão na Tabela 2.

O número de ciclos foi adaptado para cada primer. Todos os reagentes foram provenientes da empresa Gibco BRL (*SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*). Uma amostra da mistura da PCR (15  $\mu$ L) foi separada por eletroforese em um gel de 1,5 % agarose com brometo de etídio e visualizada sob luz ultravioleta. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica utilizando-se um sistema processador de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

### **Western blots**

Aproximadamente 0,5 g de tecido foi homogeneizado individualmente em um ultra-turrax por 30 s em velocidade 3, a 4°C na presença de 500  $\mu$ l de uma solução tampão contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 100 mM fluoreto de sódio (NaF), 10 mM de pirofosfato decahidrato de sódio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) e 2 mM de vanadato de sódio ( $\text{NaVO}_4$ ), 0,1 % Triton X-100. O material foi solubilizando por 16 h e após foi centrifugado durante 30 minutos, a 4°C em uma velocidade de 12000 x g. Foi realizada dosagem de proteínas no sobrenadante através do método de Bradford (14). 50  $\mu$ g de proteína total de cada amostra foi desnaturada em solução de Laemmli (30 % glicerol, 10 % SDS; 62,5 mM TRIS, 750 mg ditiotreitol e 0,001 % azul de bromofenol) a 95°C por 10 minutos. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 12%.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose (NC) foram incubadas durante uma

hora em solução bloqueadora contendo: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Triton X-100, pH 7,4 (NET), 5 % leite em pó desnatado. Após bloqueio dos sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas por 16 h, sob agitação constante a 4°C, com o anticorpos específicos anti-fos, anti-myc e anti-jun (Upstate Biotechnology) suspensos em NET. Após as membranas foram lavadas com NET e 2 % leite desnatado (5 vezes 10 minutos). Logo após as membranas foram incubadas com o 2º anticorpo (c-fos com *goat antimouse IgG conjugate*; c-myc e c-jun com *goat antirabbit IgG conjugate*, Bio-Rad Laboratories) por uma hora e lavadas novamente com NET e leite (5 vezes 10 minutos). Após a incubação com solução para quimioluminescência, as membranas foram colocadas em contato com o filme fotográfico (Kodak X-Omat) por aproximadamente um minuto. Após a revelação seguiram-se a visualização e a análise de resultados. Como normalizador para a quantificação utilizou-se a coloração de Ponceau. A densidade óptica das bandas obtidas por foi medida através de um sistema de processamento de imagem (Image-Master VDS Pharmacia Biotech).

### **Análise estatística**

Os níveis de mRNA para c-myc, c-fos e c-jun foram comparados utilizando o teste t de Student após normalização pela expressão do mRNA para a proteína constitutiva  $\beta$ -microglobulina. A expressão protéica de c-Myc, c-Fos e c-Jun foi comparada, utilizando o teste t de Student após a normalização, através da coloração de Ponceau. O poder da amostra foi calculado para uma diferença de pelo menos 20 % do valor mais alto entre as médias das amostras. Para comparar a

expressão de mRNA para c-myc, c-fos e c-jun o poder da amostra foi > 90 %. Para comparar a expressão protéica de c-Myc (n = 12), c-Fos (n = 8) e c-Jun (n = 4) entre mioma e miométrio o poder da amostra foi 43%, 10% e 9,4%, respectivamente.

## RESULTADOS

Figuras 1, 2 e 3 mostram a expressão gênica dos proto-oncogenes c-myc, c-fos e c-jun, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica destes proto-oncogenes entre miométrio normal e mioma (c-myc  $0,87 \pm 0,08$  X  $0,87 \pm 0,08$ ,  $p = 0,952$ ; c-fos  $1,10 \pm 0,17$  X  $1,01 \pm 0,11$ ,  $p = 0,21$ ; e c-jun  $1,03 \pm 0,12$  X  $0,96 \pm 0,09$ ,  $p = 0,168$ , respectivamente).

Figuras 4, 5 e 6 mostram a expressão protéica através de *western blot* dos proto-oncogenes c-Myc, c-Fos e c-Jun, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão protéica destes proto-oncogenes entre miométrio normal e mioma (c-Myc  $1,36 \pm 0,48$  X  $1,53 \pm 0,29$ ,  $p = 0,569$ ; c-Fos  $8,85 \pm 5,5$  X  $6,56 \pm 4,22$ ,  $p = 0,434$ ; e c-Jun  $6,47 \pm 3,04$  X  $5,42 \pm 2,03$ ,  $p = 0,266$ , respectivamente).

## DISCUSSÃO

Os miomas uterinos são a indicação mais freqüente para histerectomia nos Estados Unidos (aproximadamente 290000/ano) (15). Sua etiologia ainda não é conhecida, mas tem sido associada a fatores de risco como idade (mulheres pré-menopáusicas), fatores étnicos (mulheres de raça negra possuem freqüência três

vezes maior do que mulheres de raça branca) (1), obesidade, gravidez tardia e nuliparidade (16).

As células do miométrio possuem alta capacidade de divisão e crescimento celular (17). A modulação e o crescimento celular dos miomas ocorre através da interação entre hormônios esteróides sexuais e fatores de crescimento (18). O estrogênio é considerado responsável pela proliferação destas células. Exerce seus efeitos fisiológicos nas células-alvo, através de ligações com receptores nucleares específicos (19). O estrogênio tem efeito mitótico nas células do miométrio e sua ação parece ser mediada por fatores de crescimento (20, 21). A participação da progesterona também parece ser importante na formação deste tumor benigno através da estimulação de atividade mitótica e proliferação celular (22, 23). Recentemente foi observado que fármacos que antagonizam a ação dos progestágenos nos seus receptores (mifepristona) diminuem o volume dos miomas (24).

A expressão e a atividade dos receptores de IGF-1 e de insulina em mioma e miométrio humano foi demonstrada em estudos recentes (25, 26). O IGF-1, entre outros fatores de crescimento, é um hormônio peptídico essencial para regulação do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (27). Os protooncogenes exercem um papel importante na transdução do sinal.

Este estudo teve como objetivo identificar genes envolvidos nos mecanismos moleculares do desenvolvimento de miomas uterinos. Foram selecionados os protooncogenes c-myc, c-fos, c-jun. Não houve diferença na expressão de mRNA e protéica para estes protooncogenes entre mioma e miométrio normal.

Níveis elevados de c-myc foram descritos em tumores de mama, cólon e pulmão, e estão associados a mal prognóstico (28). Contudo, de forma semelhante aos nossos resultados, a expressão de mRNA para c-myc em fibroadenomas de mama, tumores benignos como os miomas, é semelhante à expressão em tecido mamário normal (29).

O gene c-fos não é necessário para a promoção de tumor, mas parece ter um papel essencial na progressão de tumor benigno para maligno. É possível que os níveis de c-fos sendo semelhantes entre mioma e miométrio, como encontrado em nosso estudo, ou diminuídos em miomas em relação ao miométrio, conforme publicação de Lessl e cols., possam explicar a baixa frequência de malignização neste tipo de tecido (30, 31). A transformação maligna de miomas é um evento raro e a baixa expressão de c-fos faz parte deste fenótipo benigno que impediria a progressão para tumor maligno (32, 33).

Não encontramos diferença na expressão de c-jun comparando mioma e miométrio. O miométrio normal pode apresentar uma elevação transitória do c-jun durante o início de trabalho de parto (34). c-jun e c-fos são os produtos que interagem formando o complexo AP-1 no núcleo e iniciam a cascata de eventos que leva ao crescimento e proliferação celular. Em outros tumores (adenomas de glândula salivar e adenocarcinoma de cólon) a expressão protéica destes protooncogenes também não está alterada (35, 36).

## **CONCLUSÃO**



A expressão gênica (transcrição) e a expressão protéica (tradução) dos protooncogenes c-myc, c-fos e c-jun não são diferentes entre mioma e miométrio normal. É possível que outros protooncogenes estejam envolvidos no surgimento e crescimento destes tumores (Ha-ras, erb-A e src). Outros estudos com o objetivo de identificar potenciais mediadores da proliferação e regulação do crescimento celular, bem como esclarecer a interação entre hormônios esteróides, peptídicos e protooncogenes deverão ser realizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357(9252):293-8.
2. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, Pannier EM, Jin IH, Vu TH, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8(11):1796-806.
3. Lee BS, Margolin SB, Nowak RA. Pirfenidone: a novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):219-23.
4. De Leo V, la Marca A, Morgante G, Severi FM, Petraglia F. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75(3):632-3.
5. Dawood MY, Khan-Dawood FS. Plasma insulin-like growth factor-I, CA-125, estrogen, and progesterone in women with leiomyomas. *Fertil Steril* 1994;61(4):617-21.
6. Novak RA. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K, Diamond M, editors. *Endometrium and Endometriosis*. Malden: Blackwell Science; 1997. p. 301-10.
7. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3 Pt 1):814-9.
8. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):316-26.
9. Corleta HE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(12):1593-7.
10. Kellerer M, von Eye Corleta H, Muhlhofer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. Insulin- and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62(5):501-7.

11. Wei JJ, Chiriboga L, Arslan AA, Melamed J, Yee H, Mittal K. Ethnic differences in expression of the dysregulated proteins in uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 2006;21(1):57-67.
12. Wei JJ, Zhang XM, Chiriboga L, Yee H, Perle MA, Mittal K. Spatial differences in biologic activity of large uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2006;85(1):179-87.
13. Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 1993;14(6):659-69.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
15. Chaves EBM, Corleta HE, Toscani GK, Capp E. Miomatose uterina - papel do IGF-1 e seu receptor. *Femina* 2002;30(4):255.
16. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1037-54.
17. Salmi A, Rutanen FM. C-fos and c-jun expression in human endometrium and myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 1996;117(2):233-40.
18. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2004;10(3):207-20.
19. Andersen J, Barbieri RL. Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Investig* 1995;2(5):663-72.
20. Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1990;4(3):510-23.
21. Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetteke NC, Bossert NL, Ross K, et al. Transforming growth factor-alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 1992;131(4):1657-64.
22. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000;65(10-11):585-92.
23. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 5:791-3.
24. Eisinger SH, Bonfiglio T, Fiscella K, Meldrum S, Guzik DS. Twelve-month safety and efficacy of low-dose mifepristone for uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol* 2005;12(3):227-33.
25. Toscani GK, Chaves EM, Cervi FL, Tavares MB, Silva IS, von Eye Corleta H, et al. Gene expression and tyrosine kinase activity of insulin receptor in uterine leiomyoma and matched myometrium. *Arch Gynecol Obstet* 2004;270(3):170-3.
26. Chaves EBM, Brum IS, Stoll J, Capp E, Corleta HE. Insulin-like growth factor 1 receptor mRNA expression and autophosphorylation in human myometrium and leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57(4):210-3.
27. Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 1999;11(8):563-74.
28. Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog* 1993;4(4):435-49.
29. Cericatto R, Pozzobon A, Morsch DM, Menke CH, Brum IS, Spritzer PM. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids* 2005;70(3):153-60.

30. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 1995;82(5):721-32.
31. Swartz CD, Afshari CA, Yu L, Hall KE, Dixon D. 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* 2005;11(6):441-50.
32. Gustavsson I, Englund K, Faxen M, Sjoblom P, Lindblom B, Blanck A. Tissue differences but limited sex steroid responsiveness of c-fos and c-jun in human fibroids and myometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(1):55-9.
33. Lessl M, Klotzbuecher M, Schoen S, Reles A, Stockemann K, Fuhrmann U. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2596-600.
34. Roh CR, Lee BL, Oh WJ, Whang JD, Choi DS, Yoon BK, et al. Induction of c-Jun mRNA without changes of estrogen and progesterone receptor expression in myometrium during human labor. *J Korean Med Sci* 1999;14(5):552-8.
35. Birek C, Lui E, Dardick I. c-fos oncogene underexpression in salivary gland tumors as measured by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1993;142(3):917-23.
36. Sugio K, Kurata S, Sasaki M, Soejima J, Sasazuki T. Differential expression of c-myc gene and c-fos gene in premalignant and malignant tissues from patients with familial polyposis coli. *Cancer Res* 1988;48(17):4855-61.
37. Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* 2001;27(1-2):153-69.
38. Rossi D, Del Giacco L, Doneda L, Nicolini U, Acaia B, Brioschi D, et al. Expression pattern of c-sis, c-fos and c-jun in human placenta and embryofetal organs. *Gynecol Obstet Invest* 1996;42(1):1-7.

**Tabela 1** - Características dos primers sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

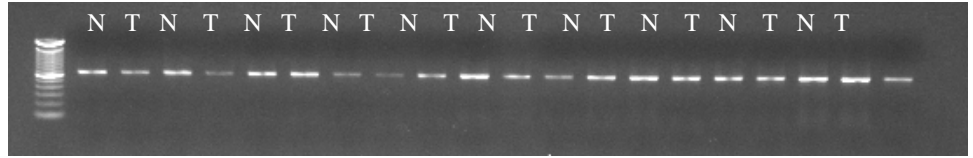
<b>Gene</b>	<b>Seqüência sintetizada</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Ref.</b>
<b><i>c-myc</i></b>			
Sense	5'CAAGAGGCGAACACACAACGTCT 3'	218 pb	(37)
Antisense	5'AACTGTTCTCGTCGTTTCCGCAA3'		
<b><i>c-fos</i></b>			
Sense	5'AGCTCTGCTTCACAGCGC 3'	442 pb	(38)
Antisense	5'GGCCTCCTGTCATGGTCTT 3'		
<b><i>c-jun</i></b>			
Sense	5'GGAAACGACCTTCTATGACGATGCCCTCAA 3'	315 pb	(38)
Antisense	5'GAACCCCTCCTGCTCATCTGTCACGTTCTT 3'		
<b><i>β2m</i></b>			
sense	5'ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 pb	(37)
antisense	5'AAATTGAAAGTAACTTATGCACGC 3'		

**Tabela 2** - Programação adotada para os ciclos de PCR

<b>Gene</b>	<b>Desnaturação</b>		<b>Anelamento</b>		<b>Extensão</b>		<b>Ciclos</b>	<b>Extensão Final</b>		<b>Ref.</b>
<i>c-myc</i>	94°C	1min	55°C	1min	72°C	1min	30	72°C	5min	(37)
<i>c-fos</i>	94°C	30s	54°C	45s	72°C	90s	30	72°C	5min	(38)
<i>c-jun</i>	94°C	90s	58°C	2min	72°C	3min	35	72°C	9min	(38)
<i>β2m</i>	94°C	1min	55°C	1min	72°C	1min	30	72°C	5min	(37)

Figura 1

$\beta_2m$   
623 pb



c-myc  
218 pb

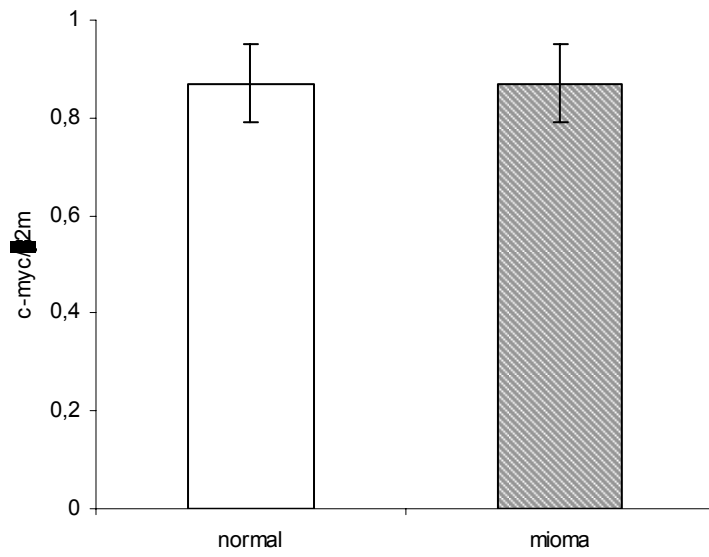
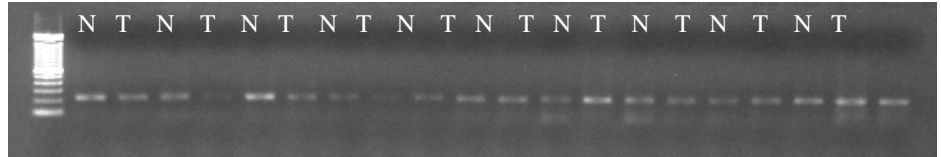
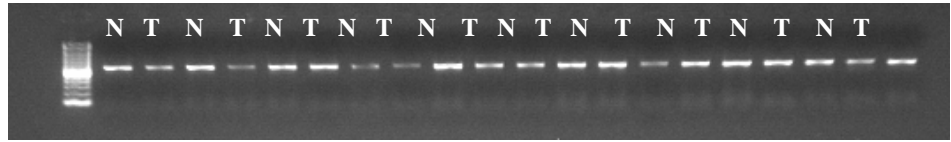


Figura 2

$\beta_2m$   
623 pb



c-fos  
442 pb

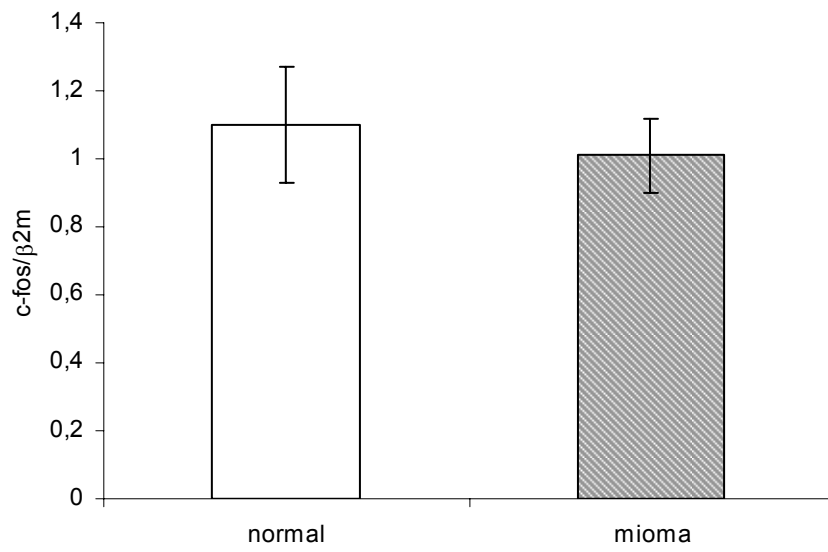
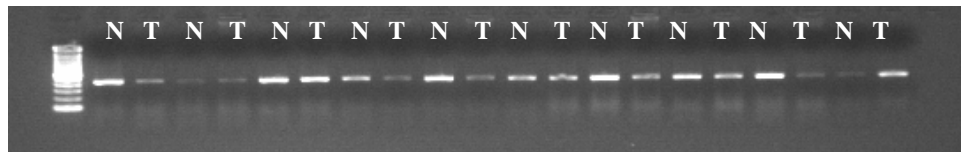
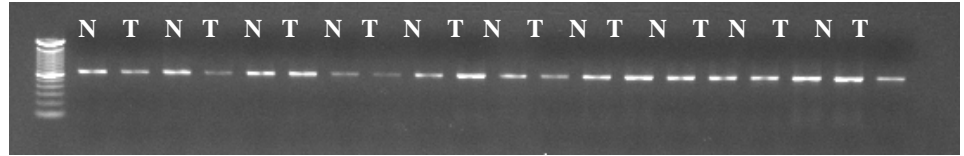


Figura 3

$\beta_2m$   
623 pb



c-jun  
315 pb

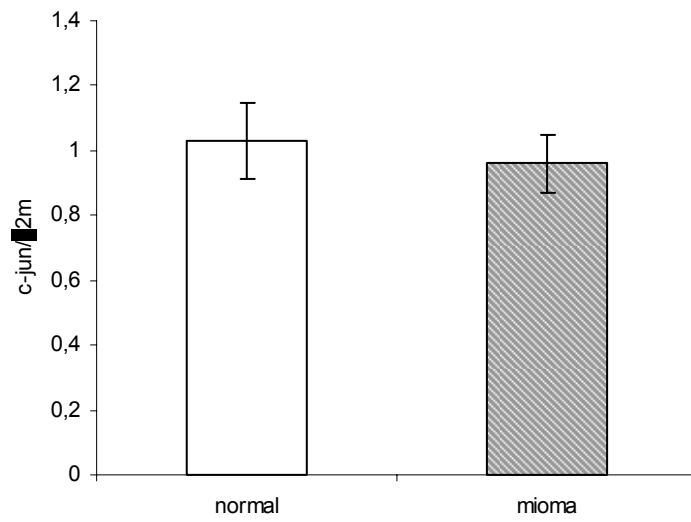
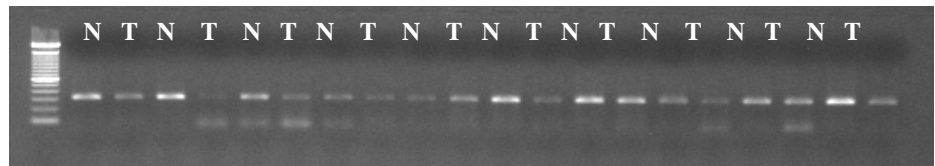




Figura 4

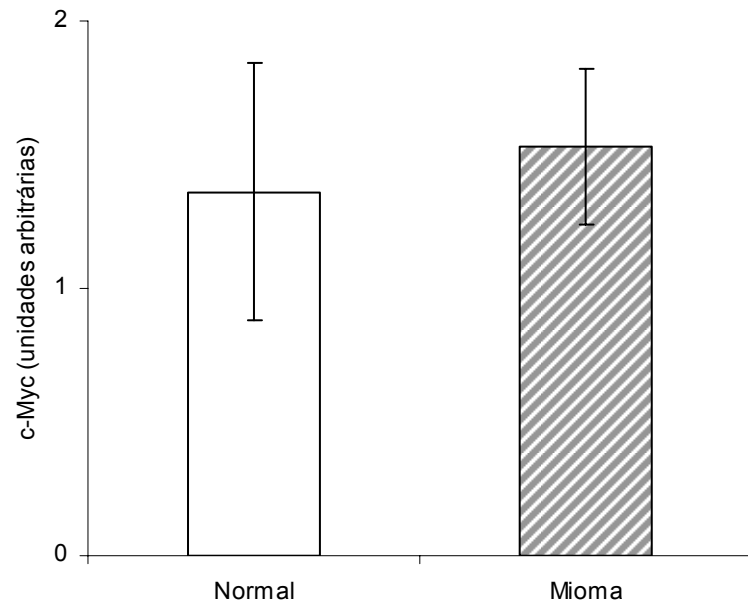


Figura 5

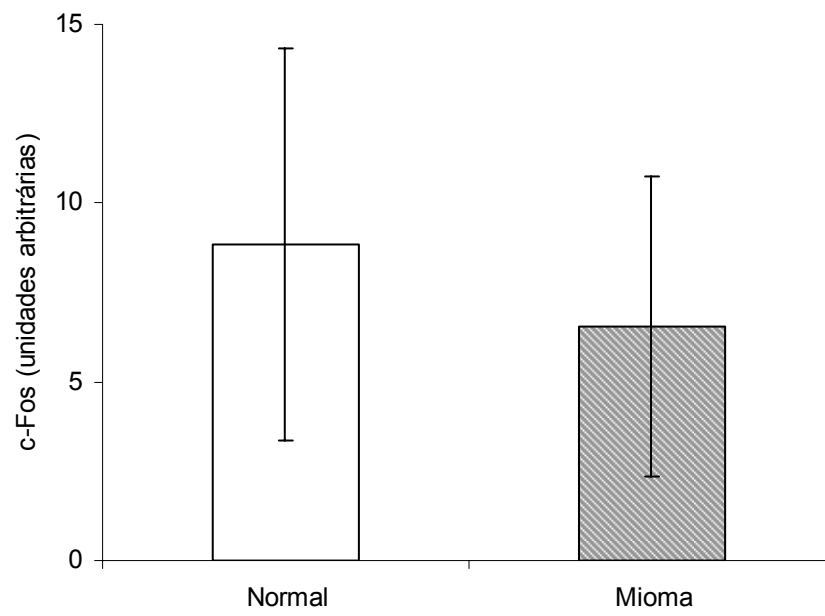
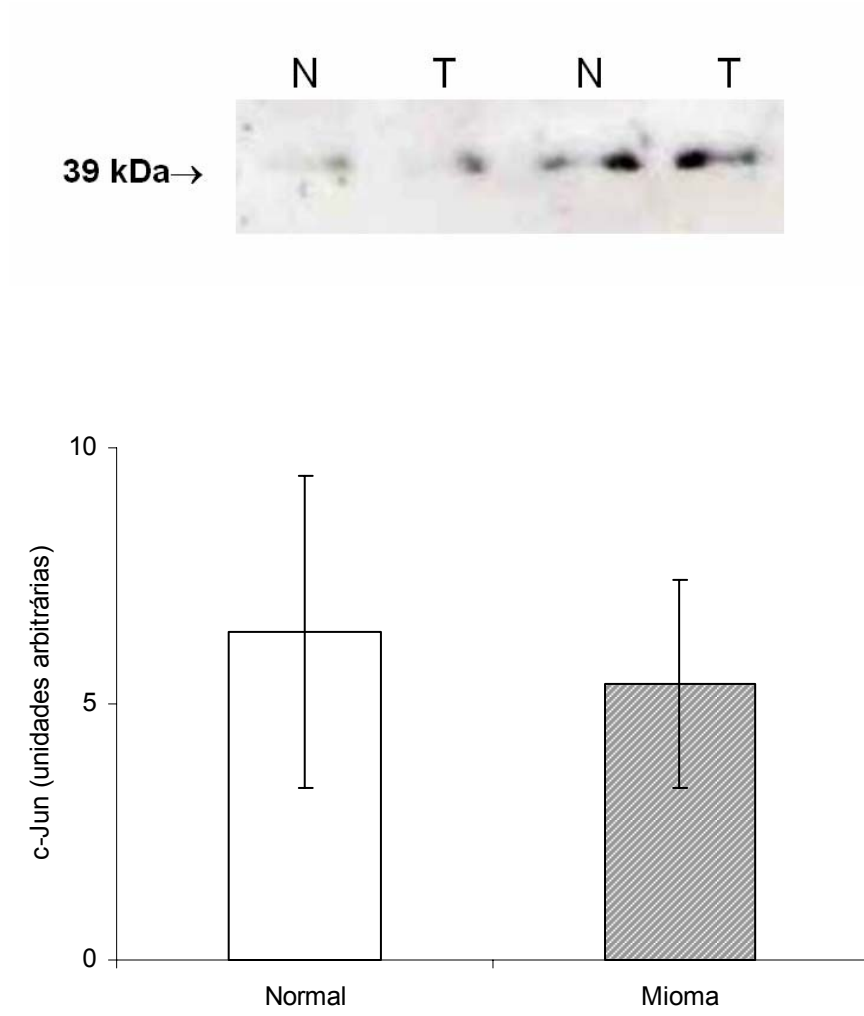


Figura 6



### Legendas das figuras

Figura 1 – Gel de agarose e densitometria das bandas representativos de um total de 12 produtos de RT-PCR. Fragmento de 218 bp correspondendo ao protooncogene c-myc e fragmento de 623 bp a  $\beta_2$ -microglobulina. Miométrio (N) e mioma (T).

Figura 2 – Gel de agarose e densitometria das bandas representativos de um total de 12 produtos de RT-PCR. Fragmento de 442 bp correspondendo ao protooncogene c-fos e fragmento de 623 bp correspondendo a  $\beta_2$ -microglobulina. Miométrio (N) e mioma (T).

Figura 3 – Gel de agarose e densitometria das bandas representativos de um total de 12 produtos de RT-PCR. Fragmento de 315 bp correspondendo ao protooncogene c-jun e fragmento de 623 bp correspondendo a  $\beta_2$ -microglobulina. Miométrio (N) e mioma (T).

Figura 4 – Western blot e densitometria das bandas representativos de um total de 12 amostras utilizando anticorpo específico para c-Myc. Foram utilizadas quantidades iguais de proteínas (50  $\mu$ g) de cada amostra. Miométrio (N) e mioma (T).

Figura 5 – Western blot e densitometria das bandas representativos de um total de 8 amostras utilizando anticorpo específico para c-Fos. Foram utilizadas quantidades iguais de proteínas (50  $\mu$ g) de cada amostra. Miométrio (N) e mioma (T).

Figura 6 – Western blot e densitometria das bandas representativos de um total de 4 amostras utilizando anticorpo específico para c-Jun. Foram utilizadas quantidades iguais de proteínas (50  $\mu$ g) de cada amostra. Miométrio (N) e mioma (T).

## 9. ARTIGO EM INGLÊS

### EXPRESSION OF PROTOONCOGENES *c-fos*, *c-myc* e *c-jun* IN HUMAN NORMAL MYOMETRIUM AND LEIOMYOMA

Ana Luiza Ferrari<sup>1,4</sup>, Antônio Miragem<sup>3,4</sup>, Mateus Reche<sup>2,4</sup>, Ilma S. Brum<sup>2,4</sup>, Maria Beatriz Kohek<sup>5</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,2,4</sup>, Edison Capp<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, <sup>2</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, <sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <sup>5</sup>Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Correspondence to:

Edison Capp

Rua Dr. Barros Cassal, 411/22

90035 003 - Porto Alegre, RS Brazil

edcapp@ufrgs.br

FAX: (051) 3311 6588

## ABSTRACT

Uterine myomas are common benign tumors of the female genital tract. The expression of growth factors signal transduction cascade components, among them the protooncogenes c-myc, c-fos and c-jun, seems to be involved in the development of myomas. **Objective:** to compare the gene (mRNA) and protein expression of the protooncogenes c-fos, c-myc and c-jun in human myometrium and leiomyoma.

**Material and Methods:** a case-control study was performed. Samples were collected from 12 patients submitted to hysterectomy at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The expression of the specific mRNA for c-myc, c-fos, c-jun and  $\beta$ -microglobulin was assessed through the RT-PCR technique, using specific primers to each gene. The protein expression of those protooncogenes was evaluated through western blot with specific antibodies. **Results:** there was no statistically significant difference in the gene expression of these protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c-myc  $0.87 \pm 0.08$  X  $0.87 \pm 0.08$ ,  $p = 0.952$ ; c-fos  $1.10 \pm 0.17$  X  $1.01 \pm 0.11$ ,  $p = 0.21$ ; e c-jun  $1.03 \pm 0.12$   $0.96 \pm 0.09$ ,  $p = 0.168$ , respectively). There was no statistically significant difference in the protein expression of these protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c-Myc  $1.36 \pm 0.48$  X  $1.53 \pm 0.29$ ,  $p = 0.569$ ; c-Fos  $8.85 \pm 5.5$  X  $6.56 \pm 4.22$ ,  $p = 0.434$ ; e c-Jun  $6.47 \pm 3.04$  X  $5.42 \pm 2.03$ ,  $p = 0.266$ , respectively). **Conclusion:** there are no differences in the gene expression (transcription), neither in the protein expression (translation) of the protooncogenes c-myc, c-fos, and c-jun between leiomyoma and myometrium.

**Key-words:** myometrium, leiomyoma, steroid hormones, growth factors, protooncogenes, c-myc, c-fos, c-jun.

## INTRODUCTION

Myomas or leiomyomas are common tumors of the female genital tract and affect 20 a 40 % of women in reproductive age (1). They are generally benign, however, they may cause hemorrhagic disturbances, pelvic pain and not seldom recurrent abortion and infertility (2, 3). The only healing treatment available is surgery, either by hysterectomy or by leiomyoma enucleation. It is known that the endocrine environment is the main factor of the leiomyoma growth, since its growth stops or even has its size reduced after the menopause (2). The fact that the leiomyomas appear during the reproductive years, grow during gestation and diminish after the menopause suggests that they depend on the ovarian hormones (4-8).

There are growing evidences that insulin, growth factors (IGF-1, EGF, VEGF) and their receptors and elements of the signal transduction cascade are involved in the tumoral transformation of the peptide hormone depending tissues (breast and gastrointestinal tract) and of hormone non-dependending tissues (brain, marrow, kidneys) (9-12). The signal transduction cascade of these hormones involves kinases (which phosphorylate residues of tyrosine, serine and treonine), phosphatases and protooncogenes.

Protooncogenes are normal cellular genes, known as early regulatory genes, whose activation occurs within few minutes to one hour after the stimulation. The protooncogenes have an important role in the coordination of the events that lead to the proliferation and differentiation in normal cells. As a response to growth factors

and steroid hormones, the expression of the protooncogenes (like fos, myc and jun) is rapidly and coordinately altered (13).

In order to develop new therapeutic approaches to the leiomyomas, it becomes essential a greater knowledge of the mechanisms involved in their growth regulation. The objective of this study was to identify and to compare the expression of the protooncogenes, c-fos, c-myc and c-jun in human myometrium and leiomyoma.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

A case-control study was performed.

### **Patients**

Samples were obtained from 12 patients at the time of hysterectomy indicated by their doctors in the Serviço de Ginecologia e Obstetrícia of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, independently of this study. The patients were not taking any hormonal medication or oral contraceptives, and did not have diabetes. Leiomyomas smaller than 1 cm or larger than 5 cm in diameter were not used. This size of leiomyomas was selected to avoid contamination by myometrium and minimize the chance of tissue necrosis and degeneration. The patients were informed and have authorized the use of part of the material for the study of the expression of the protooncogenes c-fos, c-myc and c-jun. The material obtained was immediately frozen in liquid



nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until preparation using effective techniques in the study of the expression activity of the protooncogenes c-fos, c-myc and c-jun.

This study was approved by the Ethics Committee of Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **RNA Extraction and cDNA Synthesis**

In order to perform the RNA extraction and the synthesis of cDNA, the myometrium and leiomyoma samples were homogenized in guanidine-phenolisoithiocyanate (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). The total RNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol by centrifugation at  $12.000\text{ g}$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . The RNA pellet was rinsed twice with ethanol and resuspended in water treated with diethylpyrocarbonate and quantified by spectrophotometry at  $260\text{ nm}$ . The first strand cDNA was synthesized from  $2\text{ }\mu\text{g}$  of the total RNA, using the SuperScript Pre-amplifying System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

### **Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

RT-PCR was carried out in a final volume of  $50\text{ }\mu\text{L}$ . Two  $\mu\text{L}$  of the first strand synthesis reaction (with an cDNA yield of approximately  $4\text{ ng}$ ) were denatured at  $94^{\circ}\text{C}$  for  $1\text{ min}$  in the presence of  $20\text{ mM}$  Tris-HCl pH  $8.4$ ,  $50\text{ mM}$  KCl and  $1.5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ . After the initial heating,  $1.25\text{ U}$  of Taq DNA polimerase was added together

with the same Tris-HCL buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 μM sense and antisense primers and 0.2 mM dNTP mix. The primers sequence and cDNA fragment size are listed in Table 1 and the PCR conditions of the different genes studied are listed in Table 2.

The number of cycles was adjusted to each primer. All reagents were from Gibco BRL (*SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*). A sample of the PCR mixture (15 μL) was separated by electrophoresis on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The bands were quantified by densitometric analysis using an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

### **Western blots**

Approximately 0.5 g of tissue was individually homogenized by an ultra-turrax for 30 s at speed 3, at 4°C in the presence of 500 μl of a buffer solution containing 50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 100 mM sodium fluoride (NaF), 10 mM de sodium pyrophosphate decahydrate (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e 2 mM sodium vanadate (NaVO<sub>4</sub>), 0.1 % Triton X-100. Samples were shaken overnight at 4°C and the they were centrifuged at 12,000 X g for 30 min at 4°C. Protein dosage of the supernatant was performed through the Bradford method (14). 50 μg of total protein from each sample were denatured in Laemmli solution (30% glicerol, 10% SDS, 62.5 mM TRIS, 750 mg dithiothreitol and 0.001% bromophenol blue) at 95°C for 10 minutes. The proteins were separated in SDS-PAGE 12 %.

After the electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes (NC) were incubated for one hour in block solution containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.05% Triton X-100, pH 7.4 (NET), 5% non-fat dry milk. After blocking, the membranes were incubated for 16 h, under constant agitation at 4°C, with the specific antibodies anti-fos, anti-myc and anti-jun (Upstate Biotechnology) suspended in NET. The membranes were then rinsed with NET and 2% skim milk (5 times 10 minutes). Right after the membranes were incubated with the 2<sup>nd</sup> antibody (c-fos with *goat antimouse IgG conjugate*; c-myc and c-jun with *goat antirabbit IgG conjugate*, Bio-Rad Laboratories) for one hour and then rinsed again with NET and non-fat dry milk (5 times 10 minutes). The Ponceau staining was used as a normalizer by means of quantification. The bands were detected by a Western blotting detection system (chemoluminescence reaction; ECL, Amersham) with film (Kodak X-Omat) exposure for 60 sec. The optical density (OD) of the bands obtained by chemoluminescence was measured by means of densitometric analysis with an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

### **Statistical analysis**

The mRNA levels to c-myc, c-fos and c-jun were compared using Student's *t*-test after normalization by the mRNA expression to the constitutive protein  $\beta$ -microglobulin. The protein expression of c-myc, c-fos and c-jun was compared using the Student *t*-test. The sample power was calculated to a difference of at least a 20 % between the means in each experiment. The sample power to the mRNA expression to c-myc, c-fos and c-jun was > 90 %. In order to compare the protein

expression c-Myc (n = 12), c-Fos (n = 8) and c-Jun (n = 4) between leiomyoma and myometrium the sample power was 43%, 10% and 9,4% respectively.

## RESULTS

The figures 1, 2 and 3 show the gene expression of the protooncogenes c-myc, c-fos and c-jun, respectively. There was no statistically significant difference in the gene expression of those protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c-myc  $0.87 \pm 0.08$  X  $0.87 \pm 0.08$ ,  $p = 0.952$ ; c-fos  $1.10 \pm 0.17$  X  $1.01 \pm 0.11$ ,  $p = 0.21$ ; and c-jun  $1.03 \pm 0.12$  X  $0.96 \pm 0.09$ ,  $p = 0.168$ , respectively).

The figures 4, 5 and 6 show the protein expression by western blot of the protooncogenes c-Myc, c-Fos and c-Jun, respectively. There was no statistically significant difference in the protein expression of those protooncogenes between normal myometrium and leiomyoma (c- Myc  $1.36 \pm 0.48$  X  $1.53 \pm 0.29$ ,  $p = 0.569$ ; c-Fos  $8.85 \pm 5.5$  X  $6.56 \pm 4.22$ ,  $p = 0.434$ ; and c-Jun  $6.47 \pm 3.04$  X  $5.42 \pm 2.03$ ,  $p = 0.266$ , respectively).

## DISCUSSION

Uterine leiomyomas are the most frequent indication for hysterectomy in the United States (nearly 290.000/year) (15). Their etiology is not clear yet, but has been associated with risk factors such as age (pre-menopausal women), ethnic factors (African-Americans have a frequency three times higher than caucasian women) (1), obesity, late parity and nuliparity (16).

The myometrium cells have high capacity of division and cell growth (17). The modulation and cellular growth of leiomyomas take place through the interaction between sexual steroids hormones and growth factors (18). Estrogen is considered responsible for these cells proliferation. Its physiologic effects are exerted upon the target cells, through binding with specific nuclear receptors (19). Estrogen has a mitotic effect on the myometrium cells and its action seems to be mediated by growth factors (20, 21). The progesterone participation also seems to be important in the formation of this benign tumor through the stimulation of the mitotic activity and cellular proliferation (22, 23). It has recently been observed that drugs that antagonize progestagenic action in their receptors (ex. mifepristone) diminish the volume of leiomyomas (24).

The expression and activity of IGF-1 receptors and insulin in human myometrium and leiomioma have been shown in recent studies (25, 26). The IGF-1, among other factors, is a peptide hormone essential to the regulation of the metabolism, growth and cellular differentiation (27). The protooncogenes exert an important role on the signal transduction.

The aim of this study was to identify genes involved in the cellular mechanisms of the uterine leiomyomas. The protooncogenes c-myc, c-fos and c-jun were selected. There was no difference in the mRNA and protein expression to those protooncogenes between leiomyoma and normal myometrium.

High levels of c-myc were described in breast, colon and lung tumors, and they are associated to poor prognosis (28). Nevertheless, in a similar way to our

results, the mRNA expression to c-myc in breast fibroadenomas, benign tumors like leiomyomas, is similar to the expression in normal mammary tissue (29).

The c-fos gene is not necessary to promote tumor, but seems to play an essential role in the tumor progression from benign to malignant. It is likely that the c-fos levels, being similar between leiomyoma and myometrium, as found in our study, or diminished in leiomyomas in relation to myometrium, according to Lessl and cols., might explain the low malignant frequency in this tissue (30, 31). The malignant transformation of the leiomyomas is a rare event and the low expression of c-fos may take a part in this benign phenotype, hindering its progression into a malignant tumor (32, 33).

There was no difference in the expression of c-jun, when comparing leiomyoma and myometrium. The normal myometrium may show a transitory elevation of c-jun during the beginning of the parturition (34). c-jun and c-fos are the products that interact, forming the AP-1 complex in the nucleus and start the cascade of events that takes cells to growth and proliferation. In other tumors (adenomas of salivary glands and colon adenocarcinoma), the protein expression of those protooncogenes is also not altered (35, 36).

## **CONCLUSION**

The gene expression (transcription) and the protein expression (translation) of the protooncogenes c-myc, c-fos and c-jun are not different between leiomyoma and normal myometrium. It is likely that other protooncogenes are involved in the initiation

and development of those tumors (Ha-ras, erb-A e src). Further studies should be conducted to identify potential mediators of the proliferation and regulation of cellular growth, as well as to clarify the interaction between peptide, steroid hormones and protooncogenes.

## REFERENCES

1. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357(9252):293-8.
2. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, Pannier EM, Jin IH, Vu TH, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8(11):1796-806.
3. Lee BS, Margolin SB, Nowak RA. Pirfenidone: a novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):219-23.
4. De Leo V, la Marca A, Morgante G, Severi FM, Petraglia F. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75(3):632-3.
5. Dawood MY, Khan-Dawood FS. Plasma insulin-like growth factor-I, CA-125, estrogen, and progesterone in women with leiomyomas. *Fertil Steril* 1994;61(4):617-21.
6. Novak RA. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K, Diamond M, editors. *Endometrium and Endometriosis*. Malden: Blackwell Science; 1997. p. 301-10.
7. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3 Pt 1):814-9.
8. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):316-26.

9. Corleta HE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(12):1593-7.
10. Kellerer M, von Eye Corleta H, Muhlhofer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. Insulin- and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62(5):501-7.
11. Wei JJ, Chiriboga L, Arslan AA, Melamed J, Yee H, Mittal K. Ethnic differences in expression of the dysregulated proteins in uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 2006;21(1):57-67.
12. Wei JJ, Zhang XM, Chiriboga L, Yee H, Perle MA, Mittal K. Spatial differences in biologic activity of large uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2006;85(1):179-87.
13. Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 1993;14(6):659-69.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
15. Chaves EBM, Corleta HE, Toscani GK, Capp E. Miomatose uterina - papel do IGF-1 e seu receptor. *Femina* 2002;30(4):255.
16. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1037-54.
17. Salmi A, Rutanen FM. C-fos and c-jun expression in human endometrium and myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 1996;117(2):233-40.
18. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2004;10(3):207-20.
19. Andersen J, Barbieri RL. Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Investig* 1995;2(5):663-72.
20. Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1990;4(3):510-23.
21. Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetkeke NC, Bossert NL, Ross K, et al. Transforming growth factor-alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 1992;131(4):1657-64.



22. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000;65(10-11):585-92.
23. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 5:791-3.
24. Eisinger SH, Bonfiglio T, Fiscella K, Meldrum S, Guzick DS. Twelve-month safety and efficacy of low-dose mifepristone for uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol* 2005;12(3):227-33.
25. Toscani GK, Chaves EM, Cervi FL, Tavares MB, Silva IS, von Eye Corleta H, et al. Gene expression and tyrosine kinase activity of insulin receptor in uterine leiomyoma and matched myometrium. *Arch Gynecol Obstet* 2004;270(3):170-3.
26. Chaves EBM, Brum IS, Stoll J, Capp E, Corleta HE. Insulin-like growth factor 1 receptor mRNA expression and autophosphorylation in human myometrium and leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57(4):210-3.
27. Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 1999;11(8):563-74.
28. Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog* 1993;4(4):435-49.
29. Cericatto R, Pozzobon A, Morsch DM, Menke CH, Brum IS, Spritzer PM. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids* 2005;70(3):153-60.
30. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 1995;82(5):721-32.
31. Swartz CD, Afshari CA, Yu L, Hall KE, Dixon D. 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* 2005;11(6):441-50.
32. Gustavsson I, Englund K, Faxen M, Sjoblom P, Lindblom B, Blanck A. Tissue differences but limited sex steroid responsiveness of c-fos and c-jun in human fibroids and myometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(1):55-9.
33. Lessl M, Klotzbuecher M, Schoen S, Reles A, Stockemann K, Fuhrmann U. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex

steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2596-600.

34. Roh CR, Lee BL, Oh WJ, Whang JD, Choi DS, Yoon BK, et al. Induction of c-Jun mRNA without changes of estrogen and progesterone receptor expression in myometrium during human labor. *J Korean Med Sci* 1999;14(5):552-8.

35. Birek C, Lui E, Dardick I. c-fos oncogene underexpression in salivary gland tumors as measured by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1993;142(3):917-23.

36. Sugio K, Kurata S, Sasaki M, Soejima J, Sasazuki T. Differential expression of c-myc gene and c-fos gene in premalignant and malignant tissues from patients with familial polyposis coli. *Cancer Res* 1988;48(17):4855-61.

37. Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* 2001;27(1-2):153-69.

38. Rossi D, Del Giacco L, Doneda L, Nicolini U, Acaia B, Brioschi D, et al. Expression pattern of c-sis, c-fos and c-jun in human placenta and embryofetal organs. *Gynecol Obstet Invest* 1996;42(1):1-7.

**Table 1** – Characteristics of synthesized primers to specific fragments of cDNA amplification.

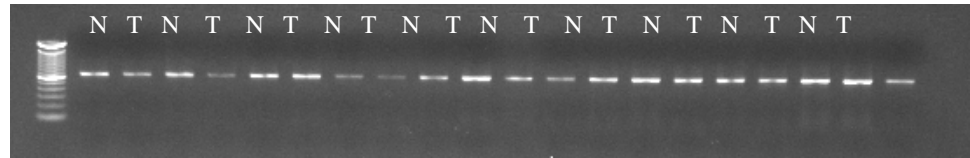
<b>Gene</b>	<b>Synthesized sequence</b>	<b>Fragment</b>	<b>Ref.</b>
<b><i>c-myc</i></b>			
Sense	5'CAAGAGGGCGAACACACAACGTCT 3'	218 pb	(37)
Antisense	5'AACTGTTCTCGTCGTTTCCGCAA3'		
<b><i>c-fos</i></b>			
Sense	5'AGCTCTGCTTCACAGCGC 3'	442 pb	(38)
Antisense	5'GGCTCCTGTCATGGTCTT 3'		
<b><i>c-jun</i></b>			
Sense	5'GGAAACGACCTTCTATGACGATGCCCTCAA 3'	315 pb	(38)
Antisense	5'GAACCCCTCCTGCTCATCTGTCACGTTCTT 3'		
<b><i>β2m</i></b>			
sense	5'ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 pb	(37)
antisense	5'AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		

**Table 2** - Programation used at the PCR cycles.

<b>Gene</b>	<b>Desnaturation</b>		<b>Annealing</b>		<b>Extension</b>		<b>Cycles</b>	<b>Final Extension</b>		<b>Ref.</b>
<b><i>c-myc</i></b>	94°C	1min	55°C	1min	72°C	1min	30	72°C	5min	(37)
<b><i>c-fos</i></b>	94°C	30s	54°C	45s	72°C	90s	30	72°C	5min	(38)
<b><i>c-jun</i></b>	94°C	90s	58°C	2min	72°C	3min	35	72°C	9min	(38)
<b><i>β2m</i></b>	94°C	1min	55°C	1min	72°C	1min	30	72°C	5min	(37)

Figure 1

$\beta_2m$   
623 pb



c-myc  
218 pb

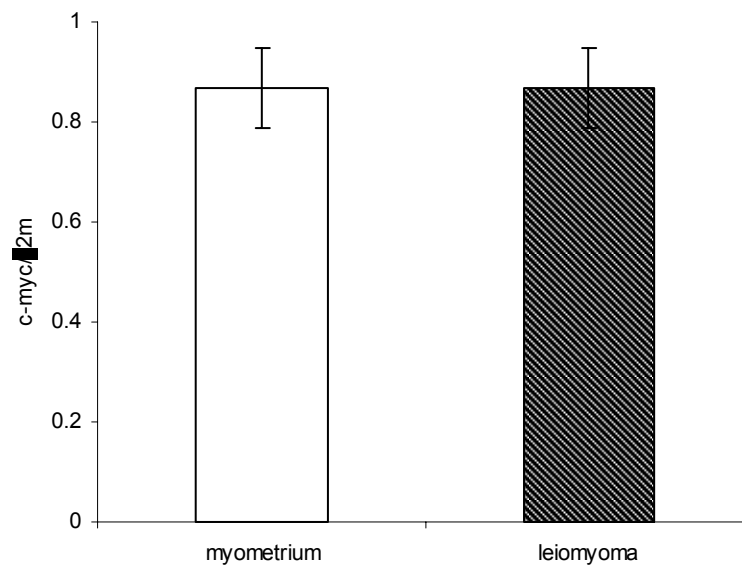
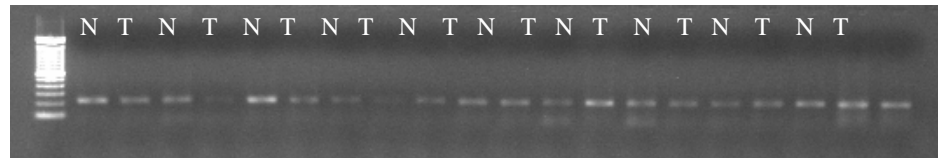
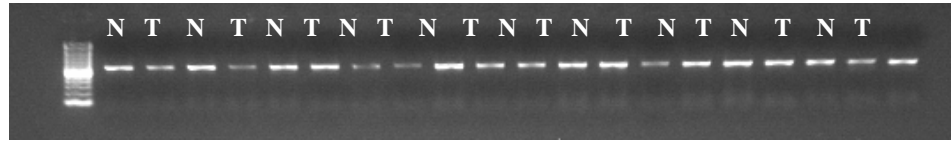


Figure 2

$\beta_2m$   
623 pb



c-fos  
442 pb

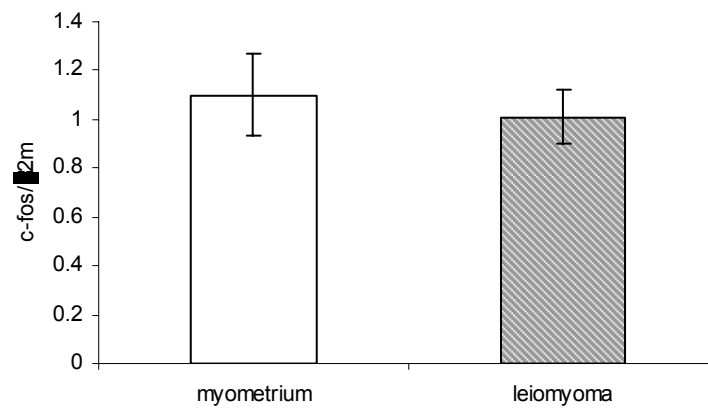
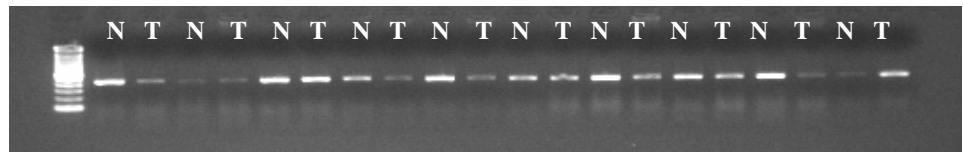
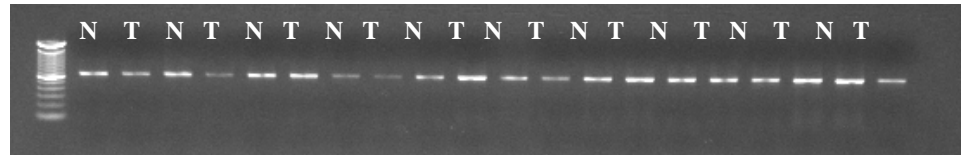


Figure 3

$\beta_2m$   
623 pb



c-jun  
315 pb

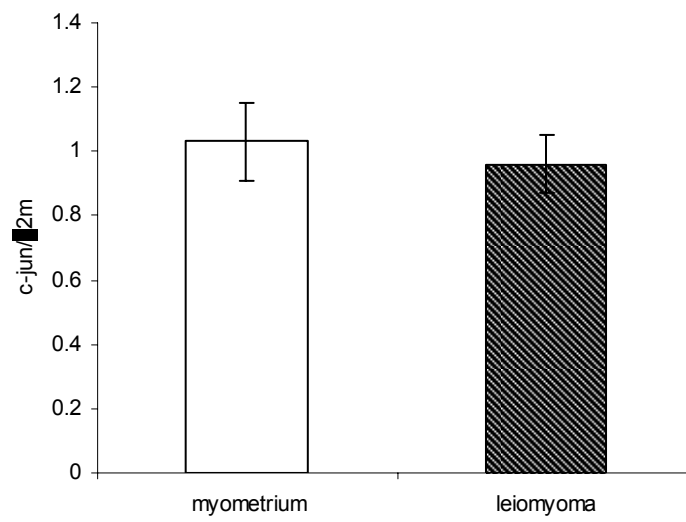
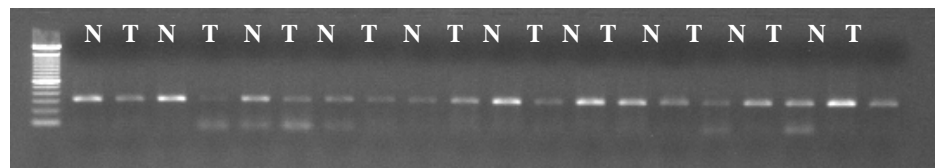


Figure 4

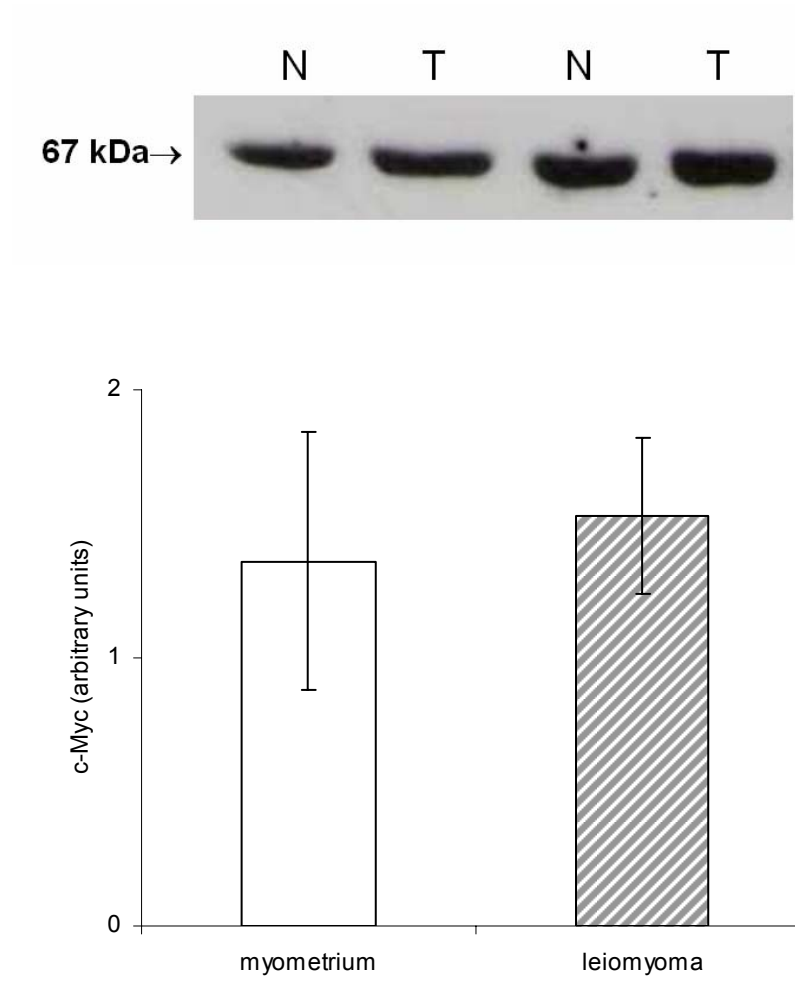




Figure 5

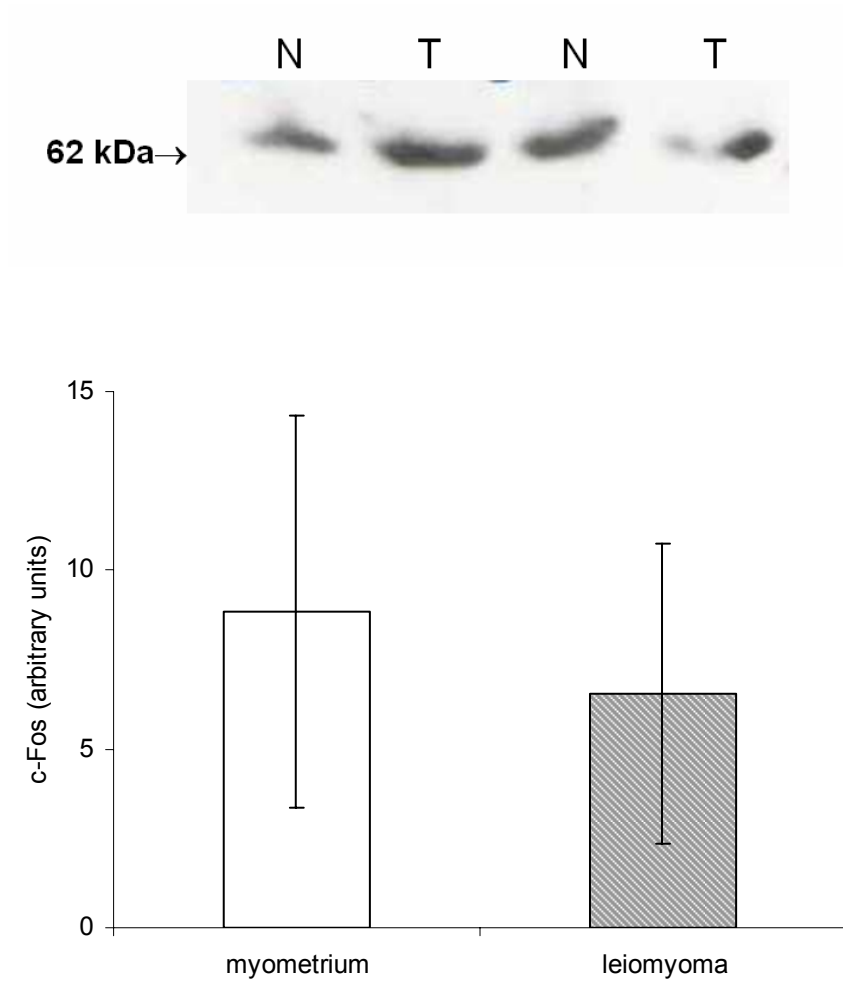
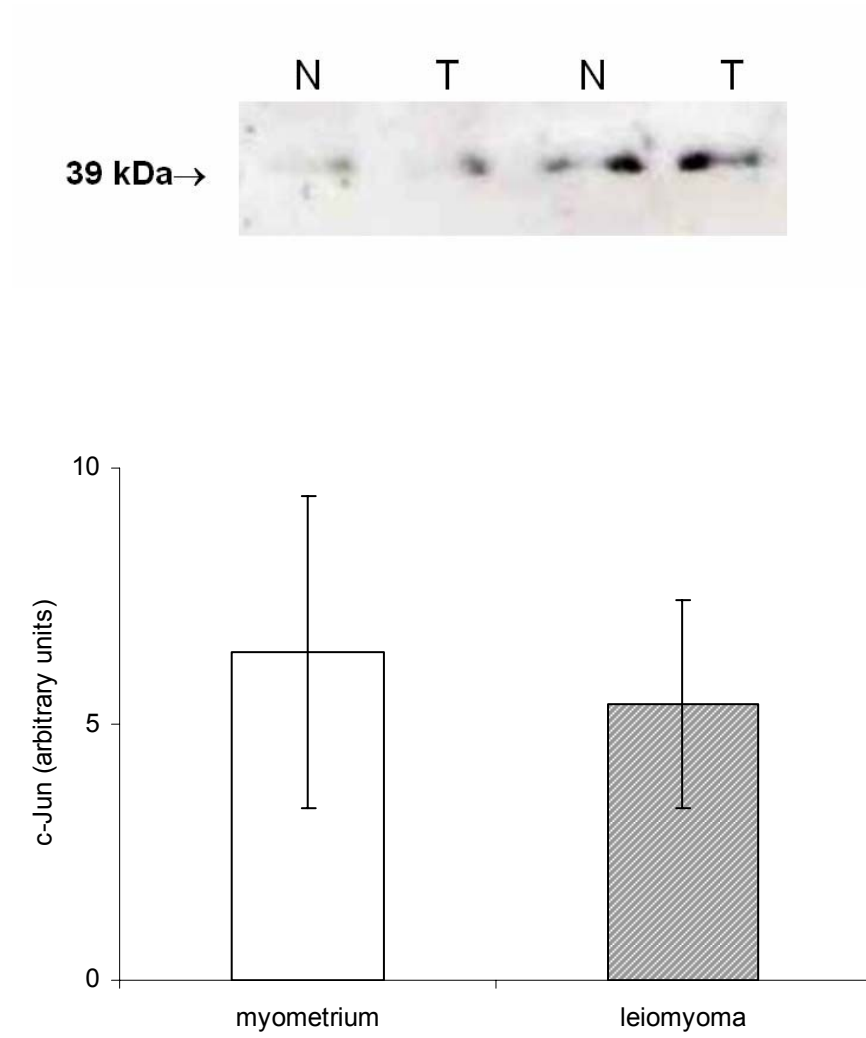


Figure 6



## Legends

Figure 1 – Agarose gel and densitometry of bands representative of a total of 12 RT-PCR products. Fragment 218 bp corresponding to protooncogene c-myc and fragment 623 bp corresponding to  $\beta_2$ -microglobulin. Myometrium (N) and leiomyoma (T).

Figure 2 – Agarose gel and densitometry of bands representative of a total of 12 RT-PCR products. Fragment 442 bp corresponding to protooncogene c-fos and fragment 623 bp corresponding to  $\beta_2$ -microglobulin. Myometrium (N) and leiomyoma (T).

Figure 3 – Agarose gel and densitometry of bands representative of a total of 12 RT-PCR products. Fragment 315 bp corresponding to protooncogene c-jun and fragment 623 bp corresponding to  $\beta_2$ -microglobulin. Myometrium (N) and leiomyoma (T).

Figure 4 – Western blot and densitometry of bands representative of a total of 12 samples using specific antibody to c-Myc. Similar quantities of proteins were used (50  $\mu$ g) from each sample. Myometrium (N) and leiomyoma (T).

Figure 5 – Western blot and densitometry of bands representative of a total of 8 samples using specific antibody to c-Fos. Similar quantities of proteins were used (50  $\mu$ g) from each sample. Myometrium (N) and leiomyoma (T).

Figure 6 – Western blot and densitometry of bands representative of a total of 4 samples using specific antibody to c-Jun. Similar quantities of proteins were used (50  $\mu$ g) from each sample. Myometrium (N) and leiomyoma (T).