

LUCINDA COELHO ESPERANÇA VIEIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE CYP 17 COMO
FATOR RELACIONADO AO DESENVOLVIMENTO
DO LEIOMIOMA UTERINO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

SÃO PAULO

2008

LUCINDA COELHO ESPERANÇA VIEIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE CYP 17 COMO
FATOR RELACIONADO AO DESENVOLVIMENTO
DO LEIOMIOMA UTERINO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

Co-orientadores: Dr. Rodrigo Aquino de Castro

Dr. Mariano Tamura Vieira Gomes

SÃO PAULO

2008

Vieira, Lucinda Coelho Esperança

Análise do polimorfismo do gene CYP 17 como fator relacionado ao desenvolvimento do leiomioma uterino. / Lucinda Coelho Esperança Vieira. -- São Paulo, 2008.

ix, 42f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Analysis of the CYP 17 gene polymorphism as a factor related to uterine leiomyoma development.

1. Leiomioma uterino. 2- Polimorfismo. 3- CYP 17. 4- Fator de risco. 5- Esteróides sexuais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Coordenador do Curso de Pós-graduação:

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	7
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	9
3.1 Casuística.....	10
3.2 Métodos.....	12
3.3 Análise Estatística.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	24
7. ANEXOS.....	26
8. REFERÊNCIAS.....	30
Abstract	
Apêndice	

Dedicatória

*Ao meu pai, Arnaldo,
o grande responsável pela realização deste sonho.*

*A minha mãe, Maria José,
pelo apoio dado nos meus momentos mais difíceis.*

*Aos meus irmãos, Denise, Artur, Marcelo, Regina e Claudia,
pelo privilégio de estarmos juntos e termos um aos outros.*

*Ao Prof. Dr. Manoel João Batista Castelo Girão,
pelo empenho, dedicação e competência.
O grande responsável pelo sucesso desta Disciplina.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, pela grande contribuição na introdução da Biologia Molecular em minha vida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Aquino de Castro, pelo estímulo constante na realização deste trabalho.

Ao Dr. Mariano Tamura Vieira Gomes, sem o qual este trabalho não teria tido êxito, me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis.

À todos os professores do Departamento de Ginecologia, fundamentais na minha formação profissional.

Às biólogas do Laboratório de Ginecologia Molecular, principalmente as pós-graduandas Fabíola Elizabeth Villanova e Naiara Corrêa Nogueira, pela preciosa ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e do Ambulatório de Leiomioma, o meu muito obrigado.

Às voluntárias participantes do estudo, sem as quais não haveria possibilidade da realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a execução desta pesquisa, por meio do processo n° 03/04533-1.

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Característica clínicas da casuística de acordo com os grupos Caso e Controle.....	17
Tabela 2 –	Características clínicas da casuística de acordo com o genótipo do CYP 17.....	18
Tabela 3 –	Genótipo e frequência alélica do gene CYP 17 considerando os grupos Caso e Controle.....	18
Tabela 4 –	Frequência genotípicas no grupo Caso.....	19
Tabela 5 –	Frequência genotípicas no grupo Controle.....	19

Resumo

Objetivo: investigar a associação do polimorfismo do CYP 17 com leiomioma uterino, uma vez que os hormônios esteróides têm papel na patogênese dessa doença e a enzima codificada pelo CYP 17 está envolvida na biossíntese desses hormônios. **Casuística e métodos:** foram comparadas, em estudo caso-controle, 121 mulheres com leiomioma uterino sintomático que se submeteram a tratamento cirúrgico (Caso) e 120 mulheres na peri ou na pós-menopausa, sem diagnóstico prévio ou atual de leiomioma (Controle). Os grupos foram analisados quanto à presença do polimorfismo do gene CYP 17. A genotipagem do CYP 17 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase com polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP) com a enzima de restrição Mspa1. Nas mulheres com a doença, o DNA foi proveniente de material de histerectomia e, nos controles, por meio de sangue coletado em punção venosa periférica. Para a análise estatística, foi realizado o teste do qui-quadrado seguido de regressão logística. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e o intervalo de confiança foi de 95% (95% IC). Finalmente, confirmou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as amostras. **Resultados:** comparando-se mulheres com leiomiomas uterino e controles, notamos ausência de diferença significativa na distribuição do genótipo do CYP 17 ($p = 0,165$) entre os dois grupos. **Conclusões:** não houve associação do polimorfismo do CYP 17 com a ocorrência de leiomioma uterino na população estudada.

1. INTRODUÇÃO

Leiomiomas uterinos são os tumores benignos mais freqüentes do trato genital feminino na menacme e originam-se das células musculares lisas do miométrio (Buttram, Reiter, 1981; Vollenhoven et al., 1990). Ocorrem em cerca de 30% das mulheres acima dos 30 anos, regredindo após a menopausa (Muran et al., 1980; Rein, Nowak, 1992; Brandon et al., 1993; Marshall et al., 1997). Por ser assintomático na grande maioria das vezes, sua real incidência é desconhecida (Cramer et al., 1985), sendo encontrado em até 77% dos úteros quando se faz estudo anatomopatológico sistemático, independentemente da indicação de histerectomia (Cramer, Patel, 1990). A incidência anual de leiomiomas em um estudo prospectivo de coorte nos Estados Unidos, em mulheres com idade entre 25 e 44 anos, foi de 12,8 por 1000 mulheres/ano (Marshall et al., 1997).

Embora de natureza benigna, esses tumores podem causar sintomas em 20% a 50% das pacientes (Buttram, Reiter, 1981). Os principais sintomas são: sangramento excessivo e irregular, dor abdominal, infertilidade e complicações na gestação, tais como abortos recorrentes. A gravidade dos sintomas depende do número, do tamanho e da localização dos nódulos. Segundo levantamento de Lepine et al. (1997), em conjunto com o *Nationwide Inpatient Sample (NIS) Agency for Healthcare Research and Quality* (2001), os leiomiomas são responsáveis por um terço das histerectomias nos Estados Unidos. Dependendo da origem dos dados, as estimativas ficam em torno de 140.000 a 180.000 histerectomias anuais e, pelo menos, 37.000 miomectomias no mesmo período.

São classificados de acordo com sua localização no útero, podendo ser intramurais (localizados na parede muscular uterina), subserosos (originam-se de nódulos intramurais que se expandem para fora do útero) e submucosos (originam-se de nódulos intramurais que crescem para a cavidade uterina). Menos comum é a forma polipóide, que pode crescer na cavidade uterina e, algumas vezes, exteriorizar-se pelo canal cervical, levando o nome de mioma parido (Cotran et al., 1999).

Estudos bioquímicos têm mostrado que os leiomiomas originam-se de um clone único de células musculares lisas (Townsend et al., 1970; Marshal et al., 1994) e anormalidades citogenéticas foram observadas em 36% dos tumores, as quais acredita-se, são secundárias à expansão clonal (Pandis et al., 1991). Não

se encontrou correlação entre alterações citogenéticas e parâmetros clínico-patológicos, como idade da paciente, tamanho e tipo histológico do nódulo e resposta terapêutica (Hayashi et al., 1996). Supõe-se que células miometriais sofram mutações, com conseqüente perda de controle do crescimento, havendo também o envolvimento de complexas interações entre esteróides sexuais e fatores de crescimento locais (Rein et al., 1995). Os esteróides poderiam mediar a expansão tumoral pela ligação aos seus receptores, com subseqüente ativação de proto-oncogenes e fatores de crescimento (Andersen, 1996). No entanto, os mecanismos envolvidos na iniciação e no crescimento dos leiomiomas ainda permanecem pouco conhecidos.

Embora pouco se saiba a respeito do evento específico que leva ao desenvolvimento dos leiomiomas, o que se sabe há décadas é que são neoplasias responsivas aos esteróides sexuais, que aparecem durante os anos reprodutivos e que regredem após a menopausa ou com uso de análogos do GNRH, situações onde há queda acentuada dos hormônios femininos (estrogênio e progesterona). Por isso, pesquisas envolvendo alterações de genes responsáveis pela síntese e pela metabolização de estrogênios, tais como os polimorfismos dos genes citocromo P450 1A1 (CYP 1A1), citocromo P450 1B1 (CYP 1B1), citocromo P450 3A4 (CYP 3A4), citocromo P450 17 (CYP 17), citocromo P450 19 (CYP 19), COMT (Catechol-o-methyltransferase), GST (Glutathione S Transferase M1), têm buscado possíveis relações com a gênese de afecções estrogênio-dependentes (Dirven et al., 1994; Kitawaki et al., 2001; Huber et al., 2002; Kado et al., 2002; Suspitsin et al., 2002; Worda et al., 2003). Estudos recentes, alguns em nosso meio, também têm avaliado polimorfismos dos receptores de estrogênio (Villanova et al., 2006) e de progesterona (Gomes et al., 2007).

O gene do citocromo P450c17 α (CYP 17), localizado no cromossomo 10q24.3, codifica a enzima citocromo P450c17 α , a qual desempenha importantes funções na biossíntese dos hormônios esteroídes nas adrenais e nos ovários (Picado-Leonard et al., 1987; Brentano et al., 1990). Especificamente, essa enzima media a atividade da 17 α hidroxilase, a qual converte pregnenolona em deidroepiandrosterona, e a atividade da 17,20 liase, a qual gera androstenediona a partir da progesterona. Esses androgênios podem, então, ser convertidos em

estrona, testosterona ou estradiol (Utiger, 1996). Teoricamente, o genótipo do CYP 17 poderia afetar diretamente os níveis de androgênios e de estrogênios, devido ao papel enzimático da sua proteína na geração de deidroepiandrosterona e androstenediona, as quais, por sua vez, representam formas de androgênios circulantes e funcionam como precursoras de testosterona, estrona e estradiol (Figura 1).

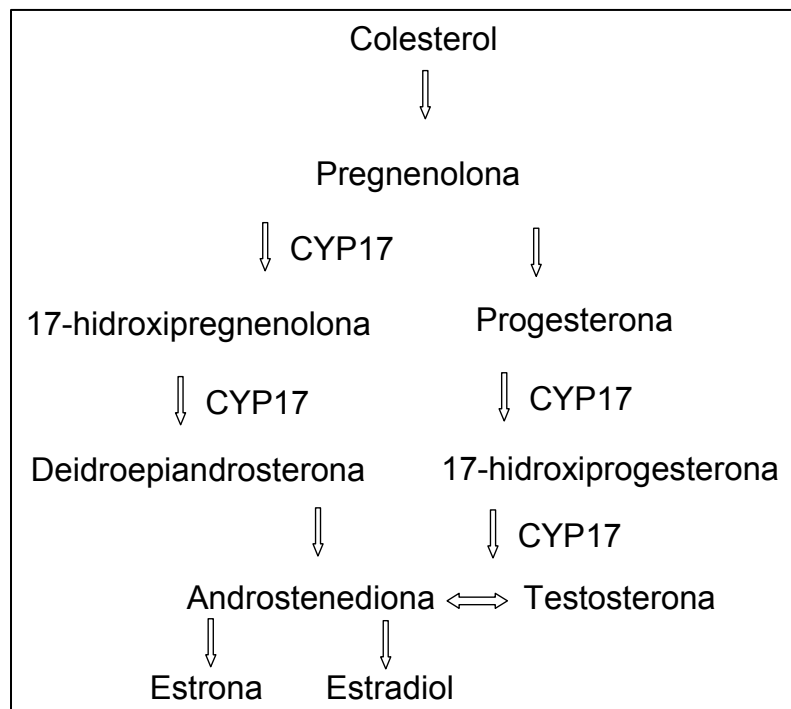


Figura 1 - Via de síntese dos hormônios esteróides, incluindo o papel de citocromo P450c17 α (CYP 17).

O conhecimento de que o gene CYP 17 é polimórfico levou à investigação das suas variantes na etiologia de doenças e condições relacionadas aos estrogênios e/ou androgênios, em especial o câncer de mama, o carcinoma endometrial, a síndrome dos ovários policísticos e o câncer de próstata. Desvendar se o genótipo influencia no metabolismo dos hormônios esteróides e/ou se funciona como um marcador do estado hormonal endógeno pode ajudar no entendimento de condições hormonalmente mediadas.

Há numerosos polimorfismos conhecidos do gene CYP 17 (Yanase, 1995; Frank et al., 1996). Desses, três mais frequentes foram descritos (Carey et al., 1994; Crocito et al., 1997; Miyoshi et al., 2000), mas somente um deles,

envolvendo a região 5' não traduzida (*5'UTR – untranslated region*), tem sido extensivamente investigado. Tal polimorfismo leva à mudança de um único par de base (T→C) na região promotora, que se localiza 34 bases à direita no sentido da iniciação da tradução. Essa variação cria um local de reconhecimento para a enzima de restrição MspA1. O alelo selvagem é conhecido como A1 e o alelo variante, como A2.

Sabe-se que a variante A2 cria um “Sp-1-type” (CCACC Box), ou seja, um sítio promotor adicional. Segundo Kadonaga et al. (1986), o número de elementos promotores pode correlacionar-se com a atividade promotora e, por isso, tem-se postulado que a variação poderia resultar em aumento da transcrição (Carey et al., 1994; Feilgelson et al., 1997). Entretanto, no único estudo molecular da transcrição realizado até o momento, esse polimorfismo não foi analisado (Kristensen et al., 1999).

Miyoshi et al. (2003) estudaram a expressão do RNAm (RNA mensageiro) no tecido tumoral de mulheres com câncer de mama e no tecido normal de mulheres que já haviam tido câncer de mama. Enquanto o nível de RNAm do gene CYP 17 foi maior nos tecidos tumorais, não houve diferença nos níveis de RNAm em pacientes com ou sem o alelo variante (A2) em ambos os grupos. No entanto, os níveis de estradiol intratumoral foram significativamente mais elevados naquelas com o alelo A2. Já Daneshmand et al., em 2002, estudaram células tecais ovarianas obtidas de mulheres na pré-menopausa submetidas à histerectomia e ooforectomia bilateral sem afecções ovarianas, e encontram redução dos níveis de RNAm proporcional à presença de um ou de dois alelos A2.

Variações gênicas do CYP 17 têm sido postuladas como responsáveis por diferenças nos níveis circulantes de hormônios esteróides e isso influenciariam o risco de algumas doenças. A relação entre o polimorfismo MspA1 e a concentração de hormônios sexuais foi investigada em seis estudos com mulheres saudáveis na pré-menopausa (Feilgelson et al., 1998; Diamanti-Kandaraki et al., 1999; Haiman et al., 2001; Jernström et al., 2001; Daneshmand et al., 2002; Garcia-Closas et al., 2002). A medida dos hormônios difere entre os estudos e a interpretação desses achados é inconclusiva devido às dificuldades metodológicas e à variação dos níveis hormonais durante o ciclo menstrual.

O interesse no estudo do gene CYP 17 como fator etiológico de doenças tem aumentado. Alguns estudos são consistentes com a hipótese de que a variante alélica A2 modificaria a função do gene, alterando assim a concentração dos esteróides sexuais (Feigelson et al., 1998; Diamanti-Kandarakis et al., 1999; Haiman et al., 2001; Jernström et al., 2001; Daneshmand et al., 2002; Garcia-Glosas et al., 2002). Os locais dominantes na produção desses esteróides, na pré e na pós-menopausa, são respectivamente os ovários e as supra-renais, e a expressão do CYP 17 pode diferir entre essas glândulas (Haiman et al., 2001).

Acredita-se que os humanos carreguem mais de um milhão de polimorfismos (Li et al., 2001), que são variações presentes em pelo menos um por cento da população (Li et al., 2001; Khoury et al., 2003). Desses, aproximadamente 30.000 exercem efeitos fenotípicos (Shastry et al., 2002), por meio de vários mecanismos, tais como: aumento ou redução da transcrição, alteração pós-transcrição, alteração da atividade pós-tradução e mudança na estrutura terciária do produto do gene (Li et al., 2001; Shastry et al., 2002). A determinação dos polimorfismos de um único nucleotídeo (*SNP - single nucleotide polymorphism*) é um novo recurso para estudar a etiologia de desordens poligênicas, com complexos padrões de herança, tais como hipertensão, diabetes e neoplasias (Evans et al., 2003). Os efeitos fenotípicos dos SNPs são baseados no efeito direto do gene, na interação gene-gene, assim como na interação do gene com o meio (Shastry et al., 2002).

Apesar da sua alta prevalência, a etiologia do leiomioma uterino continua desconhecida. Sabe-se que esses tumores são causados pela proliferação de uma célula muscular lisa (Towsend et al., 1970) e, embora a influência dos esteróides sexuais seja aceita ainda não se encontrou a base molecular para explicar sua patogênese. Considerando que a identificação dos fatores genéticos que predisõem à doença pode levar à melhor compreensão dessa neoplasia benigna, resolvemos estudar a associação do polimorfismo MspA1 do gene CYP 17 com a presença de leiomiomas nas mulheres brasileiras.

2. PROPOSIÇÃO

Propusemo-nos, no presente estudo, a avaliar a possível associação entre o polimorfismo MspA1 do gene CYP 17 e a ocorrência de leiomioma uterino nas mulheres brasileiras.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Todas as etapas deste trabalho seguiram as normas de boas práticas em estudos envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina (UNIFESP / EPM) (Anexo 1).

3.1 Casuística

3.1.1 Grupo Caso

As pacientes elegíveis foram selecionadas no Setor de Leiomioma Uterino da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia da UNIFESP / EPM, entre fevereiro de 2002 e dezembro de 2003. Todas tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo e assinando o mesmo (Anexo 2). Foram incluídas 121 mulheres com diagnóstico pré-operatório de leiomioma uterino e indicação de tratamento cirúrgico, baseada nas queixas clínicas, no exame ginecológico e na ultra-sonografia pélvica endovaginal. As pacientes se submeteram à histerectomia ou à miomectomia e houve confirmação histopatológica em todos os casos.

A indicação de cirurgia não teve qualquer relação com a participação no estudo e foi sempre obtida por critérios clínicos, de acordo com a avaliação da equipe médica e a história da paciente.

Critério de inclusão

- Diagnóstico pré-operatório de leiomioma uterino sintomático, com indicação de tratamento cirúrgico.

Critérios de exclusão

- Não realização do tratamento cirúrgico.
 - Não confirmação diagnóstica no exame anatomopatológico da peça cirúrgica.
-

3.1.2 Grupo Controle

Foram incluídas no Grupo Controle, entre janeiro e maio de 2004, 120 voluntárias na peri ou na pós-menopausa, com 45 anos ou mais, sem diagnóstico de leiomioma uterino. As candidatas foram selecionadas após realização de exame ultra-sonográfico pélvico endovaginal de rotina, e tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo e assinando o mesmo (Anexo 3). Nosso objetivo, ao escolher mulheres com essas características, foi obter um grupo próximo do ideal, ou seja, com chances mínimas de apresentar leiomioma no futuro, por tratar-se de afecção que se desenvolve na menacme.

Critérios de inclusão

- Idade \geq 45 anos.
- História clínica compatível com perimenopausa (sintomas climáticos e irregularidade menstrual atual, com ausência de fluxo há pelo menos três meses por ocasião da sua inclusão no estudo) ou na pós-menopausa (ausência de fluxo menstrual há pelo menos um ano).
- Ausência de diagnóstico atual ou prévio de leiomioma uterino, após avaliação clínica e ultra-sonográfica.

Critérios de não inclusão

- Idade $<$ 45 anos.
 - Presença de fluxo menstrual nos últimos três meses.
 - Diagnóstico prévio ou atual de sangramento uterino anormal e/ou dor pélvica crônica (do tipo algomenorréia ou dor não relacionada ao ciclo menstrual).
 - Antecedente de cirurgia uterina.
 - Indisponibilidade de ultra-sonografia pélvica endovaginal atual, confirmando a ausência de leiomioma do útero.
-

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta de dados clínicos - Grupo Caso e Grupo Controle

Realizamos anamnese, com registro de idade e raça. Em relação aos exames subsidiários, teve importância a ultra-sonografia pélvica endovaginal, para avaliação do útero, com mensuração do seu volume e registro de número, tamanho e localização dos nódulos tumorais, quando presentes.

Apenas quanto às pacientes do Grupo Caso, analisaram-se também as descrições cirúrgicas e os laudos histopatológicos, para confirmação diagnóstica.

3.2.2 Coleta de material biológico e extração de DNA - Grupo Caso

Durante a cirurgia de cada paciente, retirou-se um fragmento de aproximadamente 1 cm³ de tecido tumoral, que foi imediatamente colocado em recipiente com nitrogênio líquido e transportado a um freezer a -80°C, onde foi conservado até a extração do DNA. Esse procedimento foi realizado da seguinte maneira: colocou-se uma porção de leiomioma previamente retirado em 100µl de tampão de digestão contendo proteinase K. Após a incubação desse material a 50°C por 12 horas, a proteinase K foi ativada por quinze minutos a 70°C. A seguir, foram adicionados 500µl de tampão de lise do kit GFX (Amersham Biosciences). O lisado foi então centrifugado a 8.000rpm/4°C (Eppendorf modelo 5804 R) por um minuto em coluna cromatográfica (sílica). Após duas etapas de lavagem e centrifugação (com tampões contendo etanol), o DNA foi diluído em 100µl de água milli-Q autoclavada e pré-aquecida a 70°C. Finalmente, o DNA purificado obtido foi armazenado a -80°C até sua utilização.

3.2.3 Coleta de material biológico e extração de DNA - Grupo Controle

Foram coletados 5 ml de sangue venoso de cada participante, em punção periférica do membro superior, utilizando vacutainer com anticoagulante (EDTA), seguida da imediata extração do DNA desse material. Esse procedimento foi realizado com kit GFX (Amersham Bioscience), da seguinte

forma: adicionou-se 500µl de tampão de lise em 100µl de sangue. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 8.000rpm/4°C (Eppendorf modelo 5804 R) por um minuto em coluna cromatográfica (sílica). Após duas etapas de lavagem e centrifugação (com tampões contendo etanol), o DNA foi diluído em 100µl de água milli-Q autoclavada e pré-aquecida a 70°C. O DNA purificado obtido foi armazenado a -80°C até sua utilização.

3.3 Quantificação de DNA

A quantidade de DNA foi medida por espectrofotometria (260nm) em equipamento da Spectronic, modelo Genesys 5.

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase feitas com os oligonucleotídeos (*primers*) para a β-globulina [senso: 5'-CCA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3', anti-senso: 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'] (Gattas, Soares-Vieira, 2000) foram usadas como controle positivo para verificar a qualidade do DNA e a eficiência da amplificação.

Para a reação em cadeia da polimerase do CYP 17 foram utilizados 200ng do DNA genômico em um volume final de 25µl de reação contendo: 5pmol de cada *primer sense* (5'-CAT TCG CAC TCT GGA GTC-3') e *anti sense* (5'-AGG CTC TTG GGG TAC TTG-3'), 10µl de mix Promega (50UN/ml de *Taq polymerase* com buffer de reação-ph 8.5, 400µM de dATP, 400µM de dCTP, 400µM de dGTP, 400µM de dT e 3mM de MgCl₂) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 12µl de água de *nuclease-free* (Promega). O material foi submetido ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem) por 40 ciclos, onde a primeira etapa foi de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 57°C por 45 segundos e polimerização a 72°C por um minuto. A eletroforese foi em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1µg/ml), e o padrão obtido nessa reação foi de 419 pb (pares de base).

3.3.2 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Polymorphism*)

Para análise do polimorfismo MspA1 do gene do CYP 17, os produtos de PCR foram incubados a 37°C por 4 horas em volume final contendo: 3U de MspA1 I (New England Biolabs, Inc, US), 1µl do NEbuffer4, 0,1µl de BSA (Bovine Serum Albumin) e 8µl do produto do PCR (Feigelson et al., 1999). A enzima de restrição Mspa1 I reconhece o seguinte trecho da seqüência do PCR amplificado do gene CYP 17: 5'...CMG↓CKG...3' / 5'...GKC↑GMC...3' (M=A ou C e K=G ou T).

A eletroforese foi feita em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio e foram observados os padrões descritos na Figura 2.

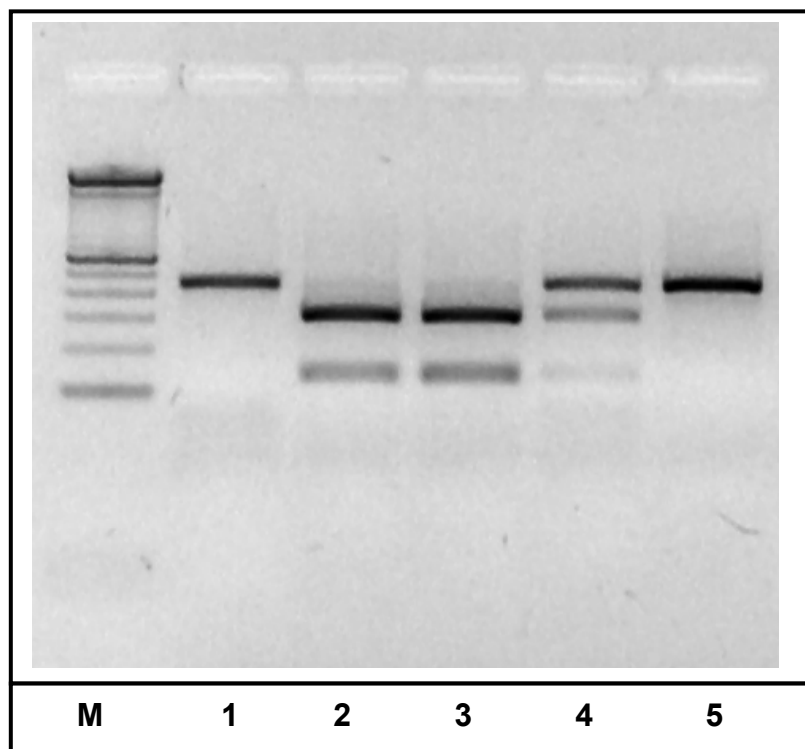


Figura 2 – M= marcador 100 pb; coluna 1= resultado do PCR do CYP 17 (419 pb); colunas 2 e 3= homozigoto mutado para o polimorfismo do CYP 17 (295 pb e 124 pb); coluna 4= heterozigoto para o polimorfismo do CYP 17 (419 pb, 295 pb e 124 pb); coluna 5= amostra homozigoto selvagem para o polimorfismo do CYP 17 (419 pb).

3.3.3 Controles internos dos PCR

Para assegurar a integridade dos reagentes, todas as reações foram processadas contendo um controle interno negativo, com a substituição do volume de DNA por água *nuclease-free* (Promega).

3.4 Análise estatística

Inicialmente, as variáveis foram analisadas descritivamente e, a seguir, calcularam-se suas freqüências absolutas e relativas. Para se testar a homogeneidade dos grupos em relação às proporções foi utilizado o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, e o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

A análise multivariada dos fatores foi realizada pelo modelo de regressão logística, por meio do qual se calculou a *odds ratio* (razão de chances), utilizando o software SPSS, versão 11.0, com intervalo de confiança de 95% (95% IC). Finalmente, a distribuição genotípica foi examinada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o uso do *Goodness of fit test*.

4. RESULTADOS

Características do Grupo Caso

- Idade: variou entre 23 e 68 anos, com média de 47,7 anos.
- Raça: 60 pacientes (49,6%) foram classificadas como brancas e 61 (50,4%) como não-brancas. Essa categoria foi composta por pacientes que haviam sido individualmente registradas como pardas (40 mulheres) ou como negras (21 mulheres) e que, pela possível imprecisão dos dados em um país como o Brasil, onde predomina a miscigenação racial, foram reclassificadas como não-brancas.

Características do Grupo Controle:

- Idade: variou entre 45 e 78 anos, com média de 59,9 anos.
- Raça: 94 mulheres (78,3%) foram classificadas como brancas, enquanto 26 (21,7%) foram consideradas não-brancas (14 pardas e 12 negras).

Comparando-se os grupos estudados, notamos, conforme registrado na tabela 1:

- Idades mais avançadas no Grupo Controle.
- Raça não branca mais freqüente no Grupo Caso.

Tabela 1 – Características clínicas da casuística, de acordo com os grupos Caso e Controle

Variável	Categoria	Grupo				p
		Controle		Caso		
		n	(%)	n	(%)	
Idade (anos)	≤ 49	24	(20,0)	103	(85,1)	<0,001
	> 49	96	(80,0)	18	(14,9)	
Raça	Não-Branca	26	(21,7)	61	(50,4)	<0,001
	Branca	94	(78,3)	60	(49,6)	

De acordo com os dados registrados na tabela 2, não houve associação do polimorfismo MspA1 do gene CYP 17 com a idade, nem com a raça.

Tabela 2 – Características clínicas da casuística, de acordo com o genótipo do CYP 17.

Variável	Categoria	CYP 17			p
		A1/A1 (%)	A1/A2 (%)	A2/A2 (%)	
Idade (anos)	≤ 49	49 (38,6)	57 (44,9)	21 (16,5)	0,293
	> 49	34 (29,8)	62 (54,4)	18 (15,8)	
Raça	Não-Branca	31 (35,2)	43 (48,9)	14 (15,9)	0,966
	Branca	52 (33,8)	76 (49,3)	26 (16,9)	

A tabela 3 não mostra diferenças significativas na distribuição genotípica, assim como na frequência alélica do polimorfismo MspA1 entre os grupos estudados.

Tabela 3 – Genótipo e frequência alélica do gene CYP 17 considerando os grupos Caso e Controle

Genótipo	Controle	Caso	p	OR (95% IC)
	n=120	n=121		
A1/A1	40 (33,3%)	43 (35,6%)	0,17	1
A1/A2	65 (54,2%)	54 (44,6%)		0,77 (0,98 – 4,62)
A2/A2	15 (12,5%)	24 (19,8%)		1.55 (0,72 – 2,36)
Frequência alélica				
A1	145 (60,4%)	140 (57,9%)	0,50	
A2	95 (39,6%)	102 (42,1%)		

As tabelas 4 e 5 confirmam a manutenção do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) na casuística estudada, pois mostram concordância aceitável entre as freqüências genotípicas esperadas e as observadas, tanto no Grupo Caso quanto no Controle.

Tabela 4 – Freqüências genotípicas no Grupo Caso

	Genótipos – Grupo Caso			Total
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Freqüência observada	43 (35,5%)	54 (44,6%)	24 (19,8%)	121 (100%)
Freqüência esperada (HWE)	40 (33,3%)	59 (49,2%)	21 (17,5%)	121 (100%)

p=0,769

Tabela 5 – Freqüências genotípicas no Grupo Controle

	Genótipos – Grupo Controle			Total
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Freqüência observada	40 (33,3%)	65 (54,2%)	15 (12,5%)	120 (100%)
Freqüência esperada (HWE)	43 (36,1%)	57 (47,9%)	19 (16,0%)	120 (100%)

p=0,577

5. DISCUSSÃO

O leiomioma uterino é uma doença complexa, que resulta da interação de vários genes, hormônios, fatores de crescimento e citocinas com o meio ambiente (Pedeutour et al., 1999). Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm buscado possíveis relações de polimorfismos gênicos com leiomiomas (Harrison-Woolrych et al., 1994; Pedeutour et al., 1999) e, dada a importância dos hormônios femininos na gênese desses tumores, propusemos, neste estudo, a analisar um polimorfismo do gene CYP 17, atuante na síntese de esteróides sexuais. A presença do alelo mutante (A2), evidenciada após reação em cadeia da polimerase com adição da enzima de restrição MspA1, parece relacionar-se com aumento na concentração sérica de estradiol e de progesterona nas mulheres na pré-menopausa (Rein et al., 1990). Porém, dados recentes mostram fraca associação desse polimorfismo com a biossíntese dos estrogênios na pós-menopausa (Andersen et al., 1996).

Alguns autores sugerem que o alelo A1 do gene CYP 17 exerceria ação androgênica nos homens, aumentando o risco de hiperplasia prostática benigna e de câncer de próstata (Mangrulkar et al., 1995). Em contraste, o alelo A2 exerceria efeito estrogênico na mulher, elevaria os níveis de estradiol sérico (Rein et al., 1990) e aumentaria o risco de câncer de mama avançado (Vollenhoven et al., 1990) e de Síndrome dos Ovários Policísticos (Kurachi et al., 2001). Quanto aos leiomiomas, vale ressaltar que tal polimorfismo já foi previamente estudado por outros autores (Kado et al., 2002; Amant et al., 2004; Tsujino et al., 2006), em populações etnicamente distintas da nossa, e seus resultados serão discutidos a seguir.

Kado et al., (2002) não encontraram relação do polimorfismo MspA1 do CYP 17 com leiomioma uterino em mulheres japonesas. No entanto, temos que ressaltar o número pequeno da amostra (67 casos) e a análise indiferenciada de mulheres com leiomioma ou com adeniose. Tsujino et al., (2006), por sua vez, também não observaram relação desse polimorfismo com leiomiomas, novamente na população japonesa. Vale destacar que esses resultados devem ser analisados no contexto da população relativamente homogênea do Japão e que, por isso, não podem ser simplesmente extrapolados para outros grupos étnicos.

Amante et al., (2004) reportaram uma significativa associação nas mulheres negras sul-africanas.

Os polimorfismos são variações genéticas herdadas, presentes em todas as células e com prevalência variável em diferentes populações. Dessa maneira, qualquer linhagem celular amplificada representa o organismo. No entanto, alterações genéticas sabidamente podem ocorrer nas células somáticas, em especial nos tumores. Embora o material biológico escolhido no presente estudo, para análise genética, tenha sido um fragmento tumoral no Grupo Caso, destacamos que o produto de PCR obtido não representa apenas o DNA das células neoplásicas, pois durante a reação há amplificação irrestrita de outros DNAs presentes na amostra, quais sejam leucócitos, fibroblastos e células miometriais adjacentes, entre outros.

Ainda assim, com o intuito de garantir que os resultados não fossem artificialmente desviados, confirmamos o equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os grupos, certificando que as distribuições genotípica e alélica estivessem de acordo com aquela esperada para uma população adequadamente amostrada. Caso alguma mutação somática, presente no material estudado, apagasse o local de ação da enzima MspA1 no gene do CYP 17, teríamos não amplificação de alguns alelos, concentração anômala de genótipos homocigotos e conseqüente desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, quando os dois alelos fossem apagados, não teríamos o surgimento de bandas de leitura no gel de agarose, o que não ocorreu com o DNA de nenhuma participante.

Os dados deste estudo não estabeleceram associação entre a presença de leiomiomas uterinos e o polimorfismo MspA1 do gene CYP 17 nas mulheres brasileiras, concordando com os dados previamente apresentados por Kitawaki et al. (2001) e por Tsujino et al. (2006) e em desacordo com o estudo de Amant et al. (2004), que reportaram uma significativa associação nas mulheres negras sul-africanas. Mesmo considerando-se apenas as não-brancas brasileiras, não houve associação, o que pode ser devido à intensa miscigenação característica da nossa população.

Uma vez não demonstrada qualquer relação do polimorfismo MspA1 do CYP 17 com leiomiomas uterinos em uma população representativa da mulher brasileira, parece-nos improvável que haja elevação dos riscos para esse grupo, de acordo com os diferentes genótipos possíveis. No entanto, o estudo de grupos étnicos distintos é necessário para que se chegue a conclusões definitivas, assim como permanece fundamental o estudo das vias de metabolização dos esteróides sexuais, contribuindo para o melhor entendimento da patogênese dessa doença.

6. CONCLUSÃO

Não houve associação do polimorfismo MspA1 do gene CYP 17 com a ocorrência de leiomioma uterino.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de agosto de 2005.
CEP 0109/05
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LUCINDA COELHO ESPERANÇA VIEIRA
Disciplina/Departamento: Ginecologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Estudo do polimorfismo do gene CIP17 em pacientes com leiomioma uterino".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU Emenda 1 (versão de 28/Jun/2005 - inclusão de gene) e respectivo termo de consentimento livre e esclarecido** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Anexo 2 – Termo de consentimento Livre e Esclarecido-GRUPO 1

Objetivo: Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar dados clínicos e genéticos de mulheres com leiomioma uterino.

Procedimento: Os dados clínicos são obtidos na entrevista e o material para o estudo genético é retirado de fragmento de leiomioma uterino obtido durante a cirurgia (histerectomia ou miomectomia).

Riscos: Não há alteração significativa do risco, do desconforto ou dos resultados terapêuticos, uma vez que a técnica cirúrgica não sofre modificações.

Benefícios para a participante: Não há benefícios diretos para a participante, uma vez que os resultados obtidos não afetarão a avaliação e tratamento de sua doença.

Informações: Em qualquer momento você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Terá também direito de saber dos resultados quando os mesmos forem de conhecimento dos pesquisadores. A principal pesquisadora é a Dra Lucinda Coelho Esperança Vieira, que poderá ser encontrada no Hospital São Paulo, Rua Napoleão de Barros, 715, São Paulo-SP, 7º andar ou no ambulatório de Ginecologia, na Rua dos Otoni nº 619, Vila Clementino, São Paulo. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Rua Botucatu, nº 572, cj 14, São Paulo-SP, Tel: 55711062. Fax: 55397162.

Liberdade: Você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar, sem qualquer prejuízo a continuidade do tratamento na instituição.

Direito de Confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com informações de outras pacientes, não sendo divulgadas a identificação de nenhuma participante.

Tratamento: Em caso de dano pessoal, causada diretamente pelo procedimento realizado neste estudo, a participante tem direito a tratamento na instituição bem como indenizações legalmente estabelecidas por lei.

Custos: Não há despesas pessoais para a participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensações financeiras relacionadas a sua participação.

Resultados: A pesquisadora se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo do meu atendimento médico.

----- data.../.../....

Assinatura da voluntária/representante legal

Declaro que me foi concedido, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido desta voluntária para a participação neste estudo.

----- data.../.../...../

Assinatura do pesquisador principal

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – GRUPO 2

Objetivo: Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que visa comparar dados clínicos e genéticos de mulheres com leiomioma uterino e mulheres sem a presença desse tumor.

Procedimentos: Realiza-se entrevista, com registro de dados clínicos. Em seguida, por meio de punção venosa periférica, retira-se 5 ml de sangue para análise genética.

Riscos: Os principais riscos são relacionados com o local da punção (dor, desconforto ou hematoma no local) e tontura ou desmaio (reflexo vagal) durante o procedimento.

Benefícios para a participante: Não há benefício direto para a participante, uma vez que os resultados obtidos não afetarão a avaliação e conduta do seu caso em particular.

Informações: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora principal é a Dra Lucinda Coelho Esperança Vieira, que pode ser encontrada no Hospital São Paulo, na rua Napoleão de Barros, 715,7º andar, secretaria de Ginecologia, São Paulo/ SP, telefone 55764100. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, na rua Botucatu,572, 1º andar, conjunto 14, São Paulo/SP, telefone 55711062.

Liberdade: É garantida a liberdade para a retirada do seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto e a identificação das pacientes não será divulgada.

Tratamento: Em caso de dano pessoal, ligado aos procedimentos realizados neste estudo, com nexos causal comprovado, a participante terá direito a tratamento médico na Instituição, como às indenizações legalmente estabelecidas.

Custos: Não despesas pessoais para a participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Resultados: Você terá direito de saber os resultados tão logo sejam de conhecimento dos pesquisadores.

Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo do meu atendimento médico.

----- data..../.../....

Assinatura da voluntária/representante legal

-----data..../.../....

Assinatura da testemunha

Declaro que me foi concebido, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido desta voluntária para a participação neste estudo.

----- data\..../.../....

Assinatura do pesquisador principal

8. REFERÊNCIAS

Amant F, Dorling CM, Brabanter J, Vergote I, Lindeque BG, Rensburg J van. A possible role of the cytochrome P450c 17 α gene (CYP17) polymorphism of uterine leiomyomas from black South African women; a pilot study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:234-9.

Andersen J. Growth factors and cytokines in uterine leiomyomas. *Semin Reprod Endocrinol* 1996; 14:269-82.

Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:78-85.

Brentano ST, Picado-Leonard J, Mellon SH. Tissue specific, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced, and phorbol ester-repressed transcription from the human P450c17 promoter in mouse cells. *Mol Endocrinol* 1990; 4:1972-9.

Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Ferti Steril* 1981; 36:433-45-6.

Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S and Williamson R. Polycystic ovaries and premature male pattern are associated with one allele of steroid metabolism gene CYP17. *Human Mol Genet* 1994;3: 1873

Cotran RS, Kumar V, and Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Edition 1999; W.B.Saunders Company, Philadelphia, pp. 1064-5.

Cramer SF, Robertson AL, Ziats NP, Pearson OH. Growth potential of human uterine leiomyomas: some in vitro observations and their implications. *Obstet Gynecol* 1985;66:36-41.

Cramer DW. Epidemiology of myomas. *Semin; Reprod Endocrinol* 1992; 10:320-24.

Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:435-8.

Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1999; 94:435-8.

Crocitto LE, Feigelson HS, Yu MC. Short report on DNA marker at candidate locus: a polymorphism in intron 6 of the CYP17 gene. *Clin Genet* 1997;52:68-9.

Daneshmand S, Weitsman SR, Navab A. Overexpression of theca-cell messenger RNA in polycystic ovary syndrome does not correlate with polymorphisms in the cholesterol sidechain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20-lyase promoters. *Fertil Steril* 2002; 77:274-80.

Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED. Polymorphism T \rightarrow C (34bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999; 71:431-5.

Dirven HA, Van Ommen B, Van Bloderen PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res* 1994; 54:6215-20.

Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N England J Med* 2003; 348(6):538-49.

Feigelson HS, Coetzee GA, Kolonel LN. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer *Cancer Res* 1997;57:1063-5.

Feigelson HS, Shames LS; Pike MC; Coetzee GA; Stanczyk FZ; Henderson BE. Cytochrome P450c17 α Gene (CYP17) Polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res*1998; 58: 585-7.

Frank S, White D, Gilling-Smith C. Hypersecretion of androgens by polycystic ovaries: the role of genetic factors in the regulation of cytochrome P450c17 alpha. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996;10:193-203.

Garcia-Glosas M, Herbstman J, Schiffman M. Relationship between serum hormone concentrations, reproductive history, alcohol consumption and genetic polymorphism in premenopausal women. *Int J Cancer* 2002;102:172-8

Gomes MTV, Castro RA, Villanova FE, Silva IDCG, Baracat EC, Lima GR, Girão MJBC. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril* 2007; 87(5):116-21.

Haiman CA, Hankison SE, Colditz GA. A polymorphism in CYP17 and endometrial cancer risk. *Cancer Res* 2001;61:3955-60.

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; 78:1179-84.

Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Smith SK. Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human myometrium and leiomyoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(6):1853-8.

Hayashi S, Miharu N, Okamoto E, Samura O, Hara T, Ohama K. Detection of chromosomal abnormalities in uterine leiomyoma using conventional cytogenetic method and interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenetic* 1996; 89:98-104.

Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modeling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorder. *Maturitas* 2002; 42:1-12.

Jernström H, Vesorini D, Brdadlow HL. Re: CYP17 promoter polymorphism and breast cancer in Australian women under forty years. (Letter). *J Natl Cancer Inst* 2001;93:554-5.

-
- Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yohikawa T and Honjo H. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphism with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002; 17(4):897-902.
- Kadonaga JT, Jones KA, Tijian R. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by SP1. *Trends Biochem Sci* 1986;11:20-3.
- Khoury MJ. Genetics and genomics in practice: the continuum from genetic disease to genetic information in health and disease. *Genet Med* 2003; 5(4):261-8.
- Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshihara H, Kusuki J, Kado N, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Honjo H. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod* 2001; 16(1):51-5.
- Kristensen VN, Haraldsen EK, Anderson KB. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. *Cancer Res* 1999;59:2825-8.
- Kurachi O, Matsuo H, Maruo T. Tumor necrosis factor-alpha expression in 31 human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):2275-80.
- Lepine LA, Hillis SD, Marchbanks PA, Koonin LM, Morrow B, Kieke BA, et al. Hysterectomy surveillance- United States. 1980-1993. *MMWR* 1997; 46:1-15.
- Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A. Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):847-9.
- Mangrulkar RS, Ono M, Ishikawa M, Takashima S, Klagsbrun M, Nowak RA. Isolation and characterization of heparin-binding growth factors in human leiomyomas and normal myometrium. *Biol Reprod* 1995; 53:636-46.
- Marshall LM, Spigelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Golditz GA, Willet WC, Hunter DJ, ..Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997; 90:967-73.
- Miyoshi Y, Ando A, Ooka M. Association of CYP17 polymorphism with intratumoral estradiol concentrations but not CYP17 messenger RNA levels in breast cancer tissue. *Cancer Lett* 2003;195:81-6.
- Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N. Genetic polymorphism in CYP17 and breast cancer risk in Japanese women. *Eur J Cancer* 2000;36:2375-9.
- Muran D, Gilleson M, Walters JH. Myomas of the uterus in pregnancy: ultrasonographic follow up. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:16-9.
-

Nationwide Inpatient Sample (NIS) (electronic database release 6) Available at: <http://www.ntis.gov/fcpc/cpn8834.htm>. Rockville. MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2001.

Pandis N, Heim S, Bardi G. Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;55:11-8. |

Pedeutour F, Ligon AH, Morton CC. Génétique des léiomyomes utérins. *Bull Câncer* 1999; 86(11):920-8.

Picado-Leonard J, Miller WL. Cloning and sequence of human gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/ 17,20 lyase): similar with the gene for P450c21. *DNA* 1987; 6:439-48.

Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:14-8.

Rein MS, Friedman AJ, Stuart JM, MacLaughlin DT. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate. *Fertil Steril* 1990; 53:1018-23.

Rein MS, Nowak RA. Biology of uterine myomas and myometrium in vitro. In Barbieri RL, ed. *Seminars in Reproductive Endocrinology*. New York: Thieme, 1992;310-9.

Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genetic* 2002; 47(11):561-6.

Suspitsin EN, Grigoriev MY, Togo AV, Kuligina ES, Belogubova EV, Pozharisski KM, Chagunava OL, Sokolov EP, Theillet C, Berstein LM, Hanson KP, Imyanitov EN. Distinct prevalence of the CYP19 Delta3 (TTTA) (7) allele in premenopausal versus postmenopausal breast cancer patients, but not in control individuals. *Eur J Cancer* 2002; 38(14):1911-6.

Townsend DE, Sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 107:1168.

Tsujino T, Ohara N, Yoshida S, Kennedy S, Takemura N, Deguchi M, Maruo T. The CYP17 MspA1 polymorphism is not associated with an increased risk of uterine leiomyomas in Japanese population. *Gynecol Endol* 2006; 22(2): 87-91.

Utiger RD. Insulin and the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1996; 335:657-8.

Villanova FE, Andrade PM, Otsuka AY, Gomes MTV, Leal ES, Castro RA, Girão MJBC, Nishimura E, Baracat MD, Silva IDCG. Estrogen receptor alpha polymorphisms and susceptibility to uterine leiomyoma. *Steroids* 2006; 71(11-12):960-5.

Vollenhoven BJ, Lawrence AS, Healy DL. Uterine fibroids. Br J Obstet Gynecol 1990; 97:285-298.

Worda C, Sator MO, Schneeberger C, Jantschev T, Ferlitsch K, Huber JC. Influence of the catechol-O-methyltransferase (COMT) codon 158 polymorphism on estrogen levels in women. Human Reprod 2003; 18(2):262-6.

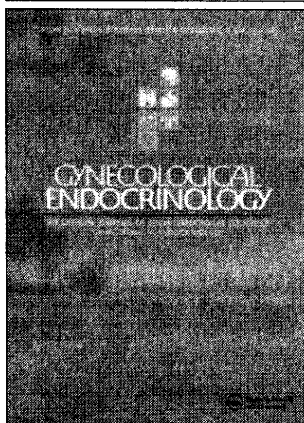
Yanase T. 17 alpha-Hydroxylase/17,20-lyase defects. J Steroid Biochem Mol Biol 1995;53:153-7.

Abstract

Objective: Uterine leiomyoma is the most common pelvic tumor in women of reproductive age. It has been well established that endogenous sex hormones are involved in the pathogenesis of the disease, and polymorphisms in genes encoding for enzymes that act in the steroid hormones metabolism, as the CYP17, may therefore play a role in the genesis of fibroids. Variations in this gene have been thought to be candidates influencing the susceptibility to hormone-related diseases. A single nucleotide polymorphism (T→C) [rs1042386] in the promoter region of CYP17 is speculated to alter its transcription. The present study was conducted to investigate the association between this polymorphism and the presence of uterine leiomyoma in Brazilian women. **Methods:** Genotyping of the CYP17 was performed in 121 uterine fibroid patients and 120 unaffected women using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Results:** No significant difference in the CYP17 genotype distribution was noted between cases and controls ($p=0.165$) **Conclusion:** These findings suggest that the CYP17 gene polymorphism studied is unlikely to be associated with risk for uterine leiomyoma in Brazilian women.

Apêndice

This article was downloaded by:[Vieira, Lucinda Coelho Esperança]
On: 22 July 2008
Access Details: [subscription number 795162658]
Publisher: Informa Healthcare
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Gynecological Endocrinology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713395232>

Association of the **CYP17** gene polymorphism with risk for uterine leiomyoma in Brazilian women

Lucinda Coelho Esperança Vieira ^a; Mariano Tamara Vieira Gomes ^a; Rodrigo de Aquino Castro ^a; Naiara Correia Nogueira de Souza ^a; Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva ^a; Edmund Chada Baracat ^a; Manoel João Batista Castello Girão ^a

^a Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Online Publication Date: 01 January 2008

To cite this Article: Vieira, Lucinda Coelho Esperança, Gomes, Mariano Tamara Vieira, Castro, Rodrigo de Aquino, de Souza, Naiara Correia Nogueira, da Silva, Ismael Dale Cotrim Guerreiro, Baracat, Edmund Chada and Girão, Manoel João Batista Castello (2008) 'Association of the **CYP17** gene polymorphism with risk for

uterine leiomyoma in Brazilian women', *Gynecological Endocrinology*, 24:7, 373 — 377

To link to this article: DOI: 10.1080/09513590802131830

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/09513590802131830>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article maybe used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

UTERUS

Association of the *CYP17* gene polymorphism with risk for uterine leiomyoma in Brazilian women

LUCINDA COELHO ESPERANÇA VIEIRA, MARIANO TAMURA VIEIRA GOMES, RODRIGO DE AQUINO CASTRO, NAIARA CORREIA NOGUEIRA DE SOUZA, ISMAEL DALE COTRIM GUERREIRO DA SILVA, EDMUND CHADA BARACAT, & MANOEL JOÃO BATISTA CASTELLO GIRÃO

Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

(Received 10 January 2008; revised 11 April 2008; accepted 15 April 2008)

Abstract

Background. Uterine leiomyoma is the most common pelvic tumor in women of reproductive age. It is well established that endogenous sex hormones are involved in disease pathogenesis, and polymorphisms in genes encoding enzymes which act in the metabolism of steroid hormones, such as that for cytochrome P450c17 α enzyme (*CYP17*), may therefore play a role in fibroid genesis. Variations in this gene have been thought to influence the susceptibility to hormone-related diseases. A single nucleotide polymorphism (T→C) [rs1042386] in promoter region of *CYP17* may alter its transcription. The present study was conducted to investigate the association between this polymorphism and the presence of uterine leiomyoma in Brazilian women.

Methods. Genotyping of *CYP17* was performed in 121 uterine fibroid patients and 120 unaffected women, using polymerase chain reaction and restriction fragment-length polymorphism analysis.

Results. No significant difference in the *CYP17* genotype distribution was noted between cases and controls ($p = 0.165$).

Conclusion. These findings suggest that the *CYP17* gene polymorphism studied is unlikely to be associated with risk for uterine leiomyoma in Brazilian women.

Keywords: *Uterine leiomyoma, uterine fibroids, hormone metabolism, CYP17, polymorphism, single nucleotide polymorphism*

Introduction

Uterine leiomyoma is the most common benign pelvic tumor in women of reproductive age, affecting 20% to 50% of the premenopausal population [1]. Its prevalence is higher in black women [2], and the clinical findings vary from totally asymptomatic to symptomatic, with serious consequences on quality of life. Uterine leiomyoma is responsible for irregular and excessive uterine bleeding, lower abdomen pressure, pain during intercourse, pelvic pain, recurrent pregnancy loss, infertility and compression of adjacent organs [3,4]. More than 200 000 hysterectomies are performed every year in the United States due to fibroids [5]. Given their prevalence and associated morbidity, there is a significant interest in studying their etiology.

Although little is known about specific events leading to the development of leiomyomas, it has been known for several decades that they are hormonally responsive tumors. Neoplastic transformation possibly involves somatic mutations in genes responsible for proliferation or apoptosis in the normal myometrium, as well as complex interactions among sex steroid hormones and growth factors. The exact role of steroids and growth factors in the initiation of these tumors is, however, not completely understood [6].

Several studies have evaluated polymorphisms in genes encoding enzymes involved in sex steroid metabolism as genetic biomarkers of hormone-dependent diseases [7,8]. The cytochrome P450c17 α (*CYP17*) gene, on the long arm of chromosome 10 (10q24.3), encodes the cytochrome P450c17 α enzyme, which acts at key branch points in steroid

hormone biosynthesis in the adrenal glands and ovaries [9]. Specifically, *CYP17* mediates the steroid 17 α -hydroxylase activity, which converts pregnenolone to dehydroepiandrosterone and the 17,20-lyase activity, which generates androstenedione from progesterone. These androgens may then be converted to estrone, testosterone and estradiol. The discovery that *CYP17* is polymorphic prompted investigation of the role of *CYP17* gene variants in the etiology of diseases and conditions in which estrogens or androgens play an important function.

The 5'-untranslated region of *CYP17* contains a single nucleotide polymorphism (SNP) 34 bp upstream from the initiation of translation and 27 bp downstream from the transcription start site. This SNP (T→C) creates a recognition site for the restriction enzyme *MspA1*, resulting in the production of a variant allele named A2 (while the wild allele is called A1). This allele creates an additional SP-1 type (CCACCC-BOX) promoter site [10] that has been postulated to increase estrogen and androgen production. Nevertheless, a gel mobility shift assay revealed no binding of SP-1 to the polymorphic site of *CYP17* [11].

Some authors have demonstrated an association between the presence of the A2 allele (polymorphic) and elevation in both estradiol and progesterone serum levels in premenopausal women [12,13]. Based on the role of the A2 allele in the carcinogenesis of some hormone-related neoplasms [14], in the present study we investigated the association between *CYP17* gene polymorphism, detected by reaction with the *MspA1* restriction enzyme, and the susceptibility to uterine leiomyoma in Brazilian women.

Materials and methods

Patients

We carried out a case-control study previously approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Sao Paulo/Escola Paulista de Medicina [Medical School]. Participants signed an informed consent form. The presence of *CYP17* gene polymorphism (*MspA1*) was compared among 241 eligible women. Participants were categorized as follows: 121 premenopausal symptomatic women with surgical and histological confirmation of leiomyoma, treated at a teaching hospital in the city of Sao Paulo, Brazil; and 120 postmenopausal women without clinical or ultrasonographic evidence of fibroids as control group. All subjects were classified as white or non-white (a group comprising blacks and mulattos). The term 'non-white' refers to the African inheritance present in the composition of the Brazilian population and the intense racial miscegenation characteristic of our country, which hinders a precise differentiation among ethnic groups based on their physical features [15].

Methods

In the case group, a 1 cm³ fragment of uterine tissue was removed during surgery and preserved at -80°C until DNA extraction. To this end, pieces weighing 50 mg were incubated overnight at 50°C in 500 μ l of digestion buffer containing proteinase K (Tris-HCl 10 mM, pH 8; ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA) 0.25 mM, pH 8; sodium dodecyl sulfate 0.25%; NaCl 100 mM, proteinase K 200 μ g). After incubation, the enzyme was heat-inactivated at 70°C for 15 min. Then, the lysate was deposited into a column (GFXTM Genomic Blood Purification Kit; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). All reactions were performed according to the manufacturer's specifications.

For the control group, whole blood samples were collected into tubes containing EDTA and frozen at -20°C before extraction. Genomic DNA was isolated using the GFXTM Genomic Blood Purification Kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions.

The amount of DNA was measured by purified DNA aliquot spectrophotometry at 260 nm (Spectronic model Genesys 5; Thermo Spectroni, USA). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using oligonucleotides (primers) for β -globin, which was considered as positive control to verify quality of DNA and efficacy of amplification [16].

Genotyping of the *CYP17* gene for the *MspA1* polymorphism in the 5'-untranslated region was performed by PCR and restriction fragment-length polymorphism analysis as previously described [17], with slight modifications. Briefly, a 419-bp fragment containing the polymorphic site was obtained by PCR using the primers 5'-CAT TCG CAC TCT GGA GTC-3' and 5'-AGG CTC TTG GGG TAC TTG-3'. The 25 μ l volume reaction was composed of 200 ng of genomic DNA, 5 pmol of each primer, 10 μ l of PCR mix (comprising *Taq* polymerase reaction buffer 50 U/ml (pH 8.5), 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dT and 3 mM MgCl₂; Promega Corporation, Madison, WI, USA) and 12 μ l of nuclease-free H₂O (Promega Corporation). After 40 cycles in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) at 94°C for 30 s, 57°C for 45 s and 72°C for 1 min, the PCR products were digested for 4 h at 37°C by the *MspA1* restriction enzyme, and then submitted to electrophoresis in agarose gel, stained with ethidium bromide, in a horizontal cube containing 1 \times TBE buffer. Finally, detection of the present alleles (A1/A2) was made by PCR products visualization in agarose gel under ultraviolet illumination.

The allele frequency and genotypic distribution were compared between the case and control groups and between the white and non-white subjects. The

χ^2 frequency test was applied with a significance level set at 5% ($p < 0.05$) and disease risk was estimated by odds ratio with the confidence interval established as 95%, using the software SPSS version 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Finally, based on observed allele frequency, we compared the real genotypic distribution with expected rates in the groups (Hardy-Weinberg equilibrium). The purpose of the calculation was to certify that results obtained do not carry any sample or specimen bias, since a representative population, studied by the appropriate means, usually respects the equilibrium [17].

Results

Results of the *MspA1* digestion profile for the *CYP17* gene are summarized in Figure 1. Homozygous women with A1/A1 alleles presented fragments of 419 bp; heterozygous women with A1/A2 alleles presented fragments of 419 bp, 295 bp and 124 bp; and homozygous women with A2/A2 alleles presented fragments of 295 bp and 124 bp.

Subjects' characteristics are described in Table I. Mean age was higher in the control group than in the cases. Regarding race, the control group presented a higher number of white than non-white women while in the case group the percentage of white and non-white women was similar. Observed genotypes and allele frequency did not show any associations with ethnicity (Table II) and the genotypic distribution remained in Hardy-Weinberg equilibrium throughout the series in case and control groups (data not

shown). We found no significant differences between cases and controls with respect to genotype and allele frequencies (Table III), and odds ratios did not indicate increased risk of fibroids related to the studied *CYP17* genotypes (Table III).

Discussion

Uterine leiomyoma is a complex entity which results from interactions among multiple genes, hormones, growth factors, cytokines and the environment [18]. However, there are a limited number of reports on associations between gene polymorphisms and uterine fibroids, including genes encoding estrogen receptor [18,19], progesterone receptor [20,21], androgen receptor [22] and insulin-like growth factor-II [23]. Given the important role of sex steroid hormones in the pathogenesis of leiomyomas, the *CYP17* gene polymorphism could be thought to be involved in the susceptibility to the disease. *CYP17* *MspA1* polymorphism creates a variant allele (A2),

Table I. Descriptive characteristic of leiomyoma and control groups.

Variable/ category	Group		<i>p</i> Value
	Control	Case	
Age (years)	59.9 ± 7.4	43.7 ± 7.0	< 0.001
Race			
Non-white	26 (21.7)	61 (50.4)	< 0.001
White	94 (78.3)	60 (49.6)	

Data are presented as mean ± standard deviation or *n* (%).

Table II. Ethnicity distribution according to *CYP17* genotype.

<i>CYP17</i> genotype	Ethnicity		<i>p</i> Value
	White	Non-white	
A1/A1	52 (33.7)	31 (35.2)	0.966
A1/A2	76 (49.4)	43 (48.9)	
A2/A2	26 (16.9)	14 (15.9)	

Data are presented as *n* (%).

Table III. Genotypes and allele frequencies for the *CYP17* gene in the case and control groups.

<i>CYP17</i> genotype	Controls (<i>n</i> = 120)	Cases (<i>n</i> = 121)	χ^2	<i>p</i> Value	OR (95% CI)
Genotype frequency, <i>n</i> (%)					
A1/A1	40 (33.3)	43 (35.6)	2	0.165	1.00 0.77 (0.98–4.62)
A1/A2	65 (54.2)	54 (44.6)			
A2/A2	15 (12.5)	24 (19.8)			1.55 (0.72–2.36)
Allele frequency, <i>n</i> (%)					
A1	145 (60.4)	140 (57.9)	1	0.4971	
A2	95 (39.6)	102 (42.1)			

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

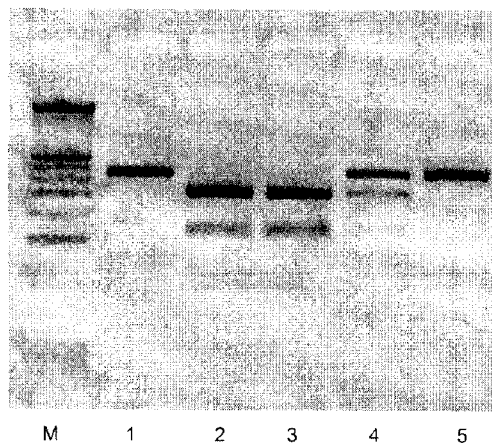


Figure 1. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism profile for the *CYP17* gene digested with *MspA1*: lane M, molecular-weight markers (100 bp scale); lanes 1 and 5, wild-type homozygous genotype (A1/A1) with 419-bp fragment; lanes 2 and 3, mutant homozygous genotype (A2/A2) with 295 and 124-bp fragments; lane 4, heterozygous genotype (A1/A2) with 419, 295 and 124-bp fragments.

which is associated to higher serum estrogen and progesterone levels in premenopausal women [12]. *CYP17* polymorphism has shown associations with sex steroid hormone-dependent diseases, including breast cancer [14] and prostate cancer [24]. Some investigators have demonstrated that the A1 allele elevates the effect of androgens in men, and therefore the A1 allele is associated with higher risk of prostate cancer and prostate benign hyperplasia; whereas the A2 allele stimulates the effect of estrogens in women, being associated with increased risk to breast cancer [14], polycystic ovary syndrome [25] and higher serum estrogen levels [26].

Polymorphisms are inherited genetic variations present in all cells (germinative or somatic, healthy or impaired) and their prevalence varies in different populations. Thus, any amplified cell lineage would be representative for studying the body. On the other hand, chromosome alterations and genetic mutations may occur in somatic cells, particularly in tumors. This fact does not interfere in our choice of uterine tissue as biological material in the case group, since when present these alterations do not affect all cells of a certain nodule [27]. If there were any somatic alterations involving the *CYP17* gene locus (10q24.3), a deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium testing would be expected in genotypic distribution, with a reduction of heterozygous genotypes when eliminating one the alleles (which was not found in any group) or no visualization of the bands after agarose gel electrophoresis when eliminating two alleles (which did not occur in any subject). Moreover, it is worth mentioning that the product of PCR amplification in the cases represents the DNA of all cells present, such as leukocytes, fibroblasts and normal myometrium, besides some neoplastic cells. Previous comparisons of the presence of other polymorphisms in blood, myometrium and leiomyoma were conducted by several authors [28–30], who did not find differences in these tissues, thus corroborating the idea that the DNA obtained provides reliable results that represent the body cells.

Having postmenopausal and asymptomatic women with negative ultrasound screening as controls provides better approximation of a group truly not affected by uterine fibroids and with no risk for development of the condition in the future. However, as the clinical and ultrasonographic examinations could not completely rule out the existence of neoplasm because there might be microscopic lesions, it should be noted that the accidental presence of women with undetected fibroids in the control group would reduce the likelihood of finding an association between the polymorphism and the disease.

Although previous research suggested that *CYP17 MspA1* polymorphism may increase the odds of developing leiomyomas in black South African

women [31], this association was not confirmed by other studies. Kado and colleagues [32] first reported no association between *CYP17 MspA1* polymorphism and adenomyosis and/or leiomyoma in the Japanese population. Limitations of their results were the small number of cases ($n=67$) and the fact of mixing subjects with adenomyosis and leiomyomas in the same group. Another study among Japanese women was carried out by Tsujino and associates [33], and they too did not find any association between the *CYP17 MspA1* polymorphism and uterine fibroids, despite the higher frequency of the A2 allele in leiomyoma cases. Denschlag and co-workers [34] also failed to establish an association between uterine leiomyoma and the *CYP17 T→C* SNP in a Caucasian population.

The distribution of the A2/A2 genotype has been shown to vary among different ethnic populations. Miyoshi and collaborators [35] reported that frequency of the A2/A2 genotype was significantly ($p < 0.001$) lower in Caucasian (13–14%) and African-American (13%) women than in Japanese (21%) and Taiwanese (28%) women. Our study showed frequency of A2/A2 genotypes similar to others (white = 16.8% and non-white = 15.9%) and revealed that the *CYP17* genotype did not vary significantly between leiomyoma and control groups. These findings suggest that the *CYP17* gene polymorphism is unlikely to be associated with an increased risk for uterine leiomyoma in Brazilian women.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Fertil Steril* 1981;36: 433–445.
2. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90:967–973.
3. Wallach EE, Vlahos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Obstet Gynecol* 2004;104:393–406.
4. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. Non-surgical management of leiomyoma: impact on fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:239–243.
5. Gambone JC, Reiter RC. Hysterectomy: improving the patient's decision-making process. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:868–877.
6. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, Wang Y, Spitz IM, Johansson E. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000;65:585–592.
7. Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modeling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorder. *Maturitas* 2002;42:1–12.

8. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yohikawa T, et al. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphism with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002;17:897-902.
9. Picado-Lenard J, Miller W. Cloning and sequencing of the human gene for P450c17. *DNA* 1987;6:439-448.
10. Carey A, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S, Williamson R. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 1994;3:1873-1876.
11. Kristensen VN, Haraldsen EK, Anderson KB, Lonning PE, Erikstein B, Karesen R, Gabrielsen OS, Borresen-Dale AL. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. *Cancer Res* 1999;59:2825-2828.
12. Feigelson H, Shames L, Pike M, Coetzee G, Stanczyk F, Henderson B. Cytochrome P450c17 α gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res* 1998;58:585-587.
13. Haiman C, Hankinson S, Spiegelman D, Colditz G, Willett W, Speizer F, Kelsey KT, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:1015-1020.
14. Feigelson HS, Coetzee GA, Kolonel LN, Ross RK, Henderson BE. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. *Cancer Res* 1997;57:1063-1065.
15. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-182.
16. Gattas GJF, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S transferase polymorphism among Caucasians mulattoes from Brazil. *Occup Med* 2000;50:508-511.
17. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson and Thompson: Genetics in medicine. 6th rev. ed. Philadelphia (PA): WB Saunders; 2001. pp 83-95.
18. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Tsai HD, Yeh LS, Lin CC, Tsai CH. Estrogen receptor thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism is associated with susceptibility to leiomyoma. *Fertil Steril* 2003;79:96-99.
19. Villanova FE, Andrade PM, Otsuka AY, Gomes MTV, Leal ES, Castro RA, Girão MJB, Nishimura E, Baracat EC, Silva IDCG. Estrogen receptor α polymorphism and susceptibility to uterine leiomyomas. *Steroids* 2006;11-12:950-955.
20. Massart F, Becherini L, Marini F, Noci I, Piciocchi L, Del Monte F, Masi L, Falchetti A, Tanini A, Scarselli G, et al. Analysis of estrogen receptor (ER α and ER β) and progesterone receptor (PR) polymorphisms in uterine leiomyomas. *Med Sci Monit* 2003;9:BR25-BR30.
21. Gomes MTV, Castro RA, Villanova FE, Silva IDCG, Baracat EC, Lima GR, Girão MJB. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril* 2007;87:1116-1121.
22. Fujimoto I, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of size-polymorphic androgen receptor gene in uterine leiomyoma according to the number of cytosine, adenine, and guanine repeats in androgen receptor alleles. *Tumour Biol* 2000;21:33-37.
23. Hashimoto K, Azuma C, Kamiura S, Koyama M, Nobunaga T, Tokugawa Y, Kimura T, Kubota Y, Sawai K, Saji F. Maintenance of imprinting of the insulin-like growth factor II gene (IGF2) and the small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N gene (SNRPN) in the human uterus and leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:50-54.
24. Habuchi T, Liging Z, Suzuki T, Sasaki R, Tsuchiya N, Tachiki H, Shimoda N, Satoh S, Sato K, Kakehi Y, et al. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with a gene dosage effect. *Cancer Res* 2000;60:5710-5713.
25. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED, Spina GG, Filandra FA, Tsianateli TC, Bergiele AT, Kouli CR. Polymorphism T-C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999;71:431-435.
26. Haiman CA, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, DeVivo J. A polymorphism in CYP17 and endometrial cancer risk. *Int J Cancer* 2000;86:436-439.
27. Marshal RD, Fejzo MLS, Friedman AJ, Mitchner N, Nowak RA, Rein MS, Morton CC, Sktar J. Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origin of uterine leiomyoma and secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata. *Gen Chrom Cancer* 1994;11:1-6.
28. Gloudemans T, Pospiech I, Van Der Ven LTM, Lips CJM, Den Otter W, Sussenbach JS. An AvaII restriction fragment length polymorphism in the insulin-like growth factor II gene and the occurrence of smooth muscle tumors. *Cancer Res* 1993;53:5754-5758.
29. Patrikis MI, Bryan EJ, Thomas NA, Rice GE, Quinn MA, Baker MS, Campbell IG. Mutation analysis of the CDP, TP53, and KRAS in uterine leiomyomas. *Mol Carcinog* 2003;37:61-64.
30. Al-Hendy A, Salama AS. Catechol-O-methyltransferase polymorphism is associated with increased uterine leiomyoma risk in different ethnic groups. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:136-144.
31. Amant F, Dorling CM, Brabanter J, Vergote I, Lindeque BG, Rensburg J van. A possible role of the cytochrome P450c17 α gene (CYP17) polymorphism of uterine leiomyomas from black South African women; a pilot study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:234-239.
32. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yohikawa T, et al. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphism with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002;17:897-902.
33. Tsujino T, Ohara N, Yoshida S, Kennedy S, Takemura N, Deguchi M, Maruo T. The CYP17 MspA1 polymorphism is not associated with an increased risk of uterine leiomyomas in a Japanese population. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:87-91.
34. Denschlag D, Bentz E-K, Hefter L, Pietrowski D, Zeillinger R, Tempfer C, Tong D. Genotype distribution of estrogen receptor- α , catechol-O-methyltransferase, and cytochrome P45017 gene polymorphisms in Caucasian women with uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 2006;85:462-467.
35. Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. Genetic polymorphism in CYP17 and breast cancer risk in Japanese women. *Eur J Cancer* 2000;36:2375-2379.