

# **DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs EM CARCINOMAS ENDOMETRIÓIDES DO ENDOMÉTRIO**

**BRUNO RAMOS PELLEGRINI**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de  
Souza Begnami**

**Co-Orientadora: Dra. Claudia Malheiros  
Coutinho Camillo**

**São Paulo**

**2015**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Pellegrini, Bruno Ramos

**Determinação do perfil de expressão de miRNAs em carcinomas endometrióides do endométrio** / Bruno Ramos Pellegrini – São Paulo, 2015.

50p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. MicroRNAs. 2. NEOPLASIAS DO ENDOMÉTRIO. 3. CARCINOMA ENDOMETRIOIDE. 4. GENES p53.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à todos que me ajudaram direta e indiretamente.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus Pais, queridos, pelo exemplo, apoio e força durante todo esse caminho.

Ao Rafael, filho, agradeço por me fazer querer sempre melhor.

À Bianca, pelo apoio e companheirismo durante toda a caminhada.

Agradeço às Orientadoras, pelo suporte, paciência e por todos os ensinamentos.

Agradeço à toda equipe do A.C. Camargo Cancer Center, aos Departamentos de Ginecologia, Anatomia Patológica, CIPE, Equipe da Biblioteca.

Agradeço toda a Equipe da Pós-Graduação pelo suporte e carinho durante toda essa empreitada.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2011/03107-5) e ao Prêmio Brentani pelo apoio financeiro, parte fundamental, para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Pellegrini BR. **Determinação do perfil de expressão de miRNAs em carcinomas endometrióides do endométrio**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de corpo uterino é uma das principais doenças ginecológicas, sendo o sexto tumor mais frequente nas mulheres nos países desenvolvidos; no Brasil é o oitavo tumor mais incidente com 4414 casos em 2008 com 2026 mortes. A principal patologia do corpo uterino é o carcinoma do endométrio que corresponde a 90% do total dos tumores que acometem o corpo do útero. Estes se apresentam em dois subtipos histológicos principais (o endometrióide e o seroso) com características histopatológicas e clínicas distintas. As principais alterações moleculares associadas aos carcinomas de endométrio estão relacionadas a alterações da via do gene PTEN e do gene p53. Recentemente, alterações nas expressões de micro RNAs (miRNA) tem sido demonstradas em diversas neoplasias, inclusive nos carcinomas de endométrio. Porém, ainda não foram estabelecidos perfis de expressão de miRNAs associados aos carcinomas de endométrio em amostras da população brasileira. Diante disso, o este trabalho teve como objetivo determinar o perfil de expressão de miRNAs em 33 amostras de carcinomas de endométrio diagnosticados e tratados em nossa Instituição através da comparação com as expressões de miRNAs em 14 amostras de endométrio não neoplásico (8 amostras de endométrio normal e 6 amostras de pólipos endometriais). Após as análises, observamos um aumento da expressão do miR-590-5p nas amostras tumorais quando comparados ao grupo controle, observamos ainda alteração de expressão em 47 miRNAs quando comparados os grupos tumor e normal. Obtivemos, também, uma “assinatura” de 12 miRNAs diferencialmente expressos em pelo menos 60% das amostras normais. Concluímos que em nossas amostras 48 miRNAs foram diferencialmente expressas que permitem dividir as nossas amostras em endométrio neoplásico e endométrio não neoplásico, contudo mais estudos devem ser realizados para confirmar os nossos achados de forma que estabelecemos a base para uma linha de pesquisa em nossa instituição.

## SUMMARY

Pellegrini BR. **[Determination of mirna expression profile in endometrial endometrioid adenocarcinomas]**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The uterine body cancer is one of the main gynecological diseases, being the sixth most common tumor in women in developed countries; in Brazil is the eighth most frequent tumor with 4414 cases in 2008 with 2026 deaths. The major pathology is the endometrial carcinoma which corresponds to 90% of all tumors that involve the body of the uterus. They are classified in two major histological subtypes (endometrioid and serous) with different histological and clinical characteristics. The principal molecular changes associated with endometrial carcinomas are related to alterations in the PTEN and p53 gene pathways. Recently, changes in the expression of microRNAs (miRNA) have been demonstrated in many neoplasms, including endometrial carcinomas. However, they have not yet been established miRNA expression profiles associated with endometrial carcinomas in the Brazilian population samples. This study aimed to determine the profile of miRNA expression in 33 samples of endometrial carcinomas diagnosed and treated in our institution by comparison with the expression of miRNAs in 14 endometrial samples non-neoplastic (8 normal endometrial samples and 6 samples of endometrial polyps). After analysis, we observed an increased expression of miR-590-5p in tumor samples when compared to the control group, We also observed changes in expression of 47 miRNAs compared the tumor and the normal groups. We also observed a "signature" of 12 miRNAs differentially expressed in at least 60% of the normal samples. We conclude that 48 miRNAs were differentially expressed in tumor and normal endometrial samples. However, more studies are needed to confirm our findings.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                          |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Síntese do miRNA.....                                                                                                                    | 8  |
| <b>Figura 2</b> | Fluxograma para seleção das amostras de AEE.....                                                                                         | 15 |
| <b>Figura 3</b> | Fluxograma para seleção das amostras não tumorais do endométrio.....                                                                     | 16 |
| <b>Figura 4</b> | Representação da placa Taqman Human MicroRNA Array.....                                                                                  | 20 |
| <b>Figura 5</b> | Determinação do miRNA mais estável. O miRNA-191 apresentou a menor variância.....                                                        | 22 |
| <b>Figura 6</b> | Heatmap da análise supervisionada da expressão diferencial de miRNAs entre o Grupo de AEEs versus o grupo de endométrio não tumoral..... | 29 |
| <b>Figura 7</b> | Heatmap das análises de expressão diferenciais dos miRNAs dos tumores com menos ou mais de 50% de infiltração do miométrio.....          | 35 |
| <b>Figura 8</b> | Heatmap das análises de expressões diferenciais dos miRNAs nos AEEs de acordo com o estágio FIGO.....                                    | 35 |

## LISTA DE QUADROS

|                 |                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> | Principais diferenças entre os subtipos de Adenocarcinomas do Endométrio.....                                                                                                   | 2  |
| <b>Quadro 2</b> | Estadiamento dos CEs de acordo com as classificações FIGO e AJCC.....                                                                                                           | 3  |
| <b>Quadro 3</b> | Alterações Moleculares mais frequentes nos Adenocarcinomas de Endométrio do tipo endometrióide.....                                                                             | 6  |
| <b>Quadro 4</b> | 48 miRNAs diferencialmente expressos nas comparações feitas entre as amostras do grupo de AEEs versus amostras do grupo de endométrio não tumoral.....                          | 28 |
| <b>Quadro 5</b> | Análises comparativas das expressões dos miRNAs entre as amostras do grupo AEEs versus amostras de endométrio normal.....                                                       | 30 |
| <b>Quadro 6</b> | Análises comparativas dos miRNAs diferencialmente expressos nas comparações feitas entre as amostras do Grupo Tumor versus amostras de Grupo Controle (pólipo endometrial)..... | 32 |
| <b>Quadro 7</b> | miRNAs diferencialmente expressos nos tumores com níveis de infiltração do miométrio maiores ou menores que 50%.....                                                            | 34 |
| <b>Quadro 8</b> | - miRNAs diferencialmente expressos nos tumores de acordo com estágio FIGO.....                                                                                                 |    |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                         |                                                           |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>BCL2</b>             | Proteína Linfoma de Células B 2                           |
| <b>Cauda poliA</b>      | Cauda de Poliadenilato                                    |
| <b>dATP</b>             | Trifosfato de Deoxiadenosina                              |
| <b>dCTP</b>             | Trifosfato de Deoxicitosina                               |
| <b>DGCR8</b>            | Di George Syndrome Critical Region 8                      |
| <b>dGTP</b>             | Trifosfato de Deoxiguanina                                |
| <b>DNA</b>              | Ácido Desoxirribonucleico                                 |
| <b>dUTP</b>             | Trifosfato de Deoxiuridina                                |
| <b>et al</b>            | E outros                                                  |
| <b>GIST</b>             | Tumor Estromal Gastrointestinal                           |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Cloreto de Magnésio                                       |
| <b>ml</b>               | Mililitro                                                 |
| <b>MLH1</b>             | Proteína MutL Homóloga 1                                  |
| <b>MMP-2</b>            | Metaloproteinase do Tipo 2                                |
| <b>MMP-9</b>            | Metaloproteinase do Tipo 9                                |
| <b>mRNA</b>             | RNA Mensageiro                                            |
| <b>ng</b>               | Nanograma                                                 |
| <b>°C</b>               | Graus Celsius                                             |
| <b>PCR</b>              | Reação em Cadeia da Polimerase                            |
| <b>PI3KCA</b>           | Fosfatidilinositol 3-quinases                             |
| <b>pri-miRNA</b>        | Transcrito Primário do miRNA                              |
| <b>PTEN</b>             | Fosfatase Homóloga à Tensina                              |
| <b>RCF</b>              | Força Centrifuga Relativa                                 |
| <b>RIN</b>              | Número de Integridade de RNA                              |
| <b>RNAse</b>            | Enzima Lítica de RNA                                      |
| <b>RPM</b>              | Rotações Por Minuto                                       |
| <b>Seg</b>              | Segundos                                                  |
| <b>TARBP2</b>           | Proteína ligadora de RNA de Fita Dupla Tipo 2             |
| <b>TGF-beta RII</b>     | Receptor do tipo II do Fator de Crescimento Transformador |

|               |                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>TIAM-1</b> | Fator de Indução de Invasão e Metástase em Linfomas de Células T |
| <b>TRBP</b>   | Proteína ligadora de RNA de Fita Dupla                           |
| <b>ul</b>     | Microlitros                                                      |
| <b>UTR</b>    | Extremidade não Traduzida                                        |

# ÍNDICE

|          |                                                                                            |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                    | <b>1</b>  |
| 1.1      | Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas de endométrio .....             | 1         |
| 1.2      | Alterações moleculares associadas aos carcinomas de endométrio do tipo endometrióide ..... | 4         |
| 1.3      | miRNA e carcinomas do endométrio .....                                                     | 6         |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                  | <b>12</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVO .....</b>                                                                      | <b>13</b> |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                           | <b>14</b> |
| 4.1      | Seleção das amostras .....                                                                 | 14        |
| 4.2      | Revisão dos diagnósticos anatomopatológicos.....                                           | 16        |
| 4.3      | Registro dos dados anatomopatológicos.....                                                 | 16        |
| 4.4      | Registro dos dados clínicos.....                                                           | 17        |
| 4.5      | Determinação do perfil de expressão de miRNA.....                                          | 18        |
| 4.5.1    | Extração do miRNA .....                                                                    | 18        |
| 4.5.2    | Síntese do cDNA .....                                                                      | 19        |
| 4.5.3    | Amplificação do cDNA e análise da expressão gênica .....                                   | 20        |
| 4.5.4    | Análises estatísticas .....                                                                | 23        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                     | <b>24</b> |
| 5.1      | Características clínicas das pacientes.....                                                | 24        |
| 5.2      | Características anatomopatológicas dos endométrios não tumorais ....                       | 25        |
| 5.3      | Características anatomopatológicas dos AEEs.....                                           | 26        |
| 5.4      | Dados da amplificação do cDNA e da análise do perfil de expressão dos miRNAs .....         | 27        |

|     |                                                                                                                 |           |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.5 | Correlações entre os perfis de expressão de miRNAs e características clínicas e histopatológicas dos AEEs ..... | 33        |
| 6   | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                          | <b>36</b> |
| 7   | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                          | <b>41</b> |
| 8   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>                                                                         | <b>42</b> |

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Registros de Dados Anatomopatológicos
- Anexo 3** Quadro que sumariza as amostras usadas no estudo

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS CARCINOMAS DE ENDOMÉTRIO**

O carcinoma de endométrio (CE) é o tumor que tem origem nas células que revestem a cavidade uterina e corresponde de 70 a 90% dos tumores do corpo uterino (LURIAN 2008; KURMAN et al. 2014). Apresenta maior incidência em países da América do Norte, da Europa Oriental e do Norte da Ásia (FERLAY et al. 2013).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o tumor de corpo uterino é o sétimo tumor mais incidente, sendo que a maioria dos casos ocorre nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e do Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde 2014).

Frequentemente estes tumores ocorrem em mulheres acima de 50 anos sendo a mediana de idade de acometimento os 61 anos (A.C.Camargo Cancer Center. 2014).

Observa-se que ao diagnóstico, 70% dos casos são tumores restritos ao útero; 20% mostram metástases em linfonodos regionais e em 10% dos casos há metástases à distância (National Cancer Institute-NCI 2015).

Os CEs são representados por dois principais subtipos (Tipo I e Tipo II) que mostram diferenças importantes em relação à incidência, características clínicas, histopatológicas, moleculares e de resposta aos

estímulos estrogênicos (BOKHMAN 1983; AMANT et al. 2005; SHERMAN 2013; A.C.Camargo Cancer Center 2014; KURMAN et al. 2014). O Quadro 1 mostra as principais diferenças entre os subtipos.

**Quadro 1** - Principais diferenças entre os subtipos de Adenocarcinomas do Endométrio.

|                              | Tipo I<br>Endometrióide                                                                        | Tipo II<br>Seroso / Células Claras                                                                |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Relação com Estrógeno        | Dependente                                                                                     | Independente                                                                                      |
| Frequência                   | 80%                                                                                            | 10%                                                                                               |
| Características Clínicas     | Pré-menopausa, climatério, obesa, nulípara                                                     | Pós-menopausa; magra                                                                              |
| Características histológicas | Células cilíndricas com núcleos de orientação basal com pouca ou nenhuma mucina citoplasmática | Tumores com pedículos fibrovasculares revestidos por células atípicas com estratificação em tufos |
| Prognóstico                  | Bom                                                                                            | Pior                                                                                              |
| Grau histológico             | Baixo                                                                                          | Alto                                                                                              |
| Alteração Genética Principal | Mutação de PTEN                                                                                | Mutação P53                                                                                       |

O estadiamento clínico das pacientes com CE é feito de acordo com a classificação *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) e *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (PECORELLI 2009; SOBIN et al. 2012). (Quadro 2).

**Quadro 2** - Estadiamento dos CEs de acordo com as classificações *FIGO* e *AJCC*.

| <b>Tumor Primário (T) (Achados Cirúrgicos e Histopatológicos)</b>                |                      |                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Categorias TNM</b>                                                            | <b>Estádios FIGO</b> | <b>Definição</b>                                                                   |
| TX                                                                               |                      | Tumor Primário não pode ser avaliado                                               |
| T0                                                                               |                      | Sem evidências de Tumor Primário                                                   |
| Tis                                                                              |                      | Carcinoma <i>in situ</i>                                                           |
| T1                                                                               | I                    | Tumor Restrito ao corpo Uterino                                                    |
| T1a                                                                              | IaA (G1, G2, G3)     | Tumor limitado ao endométrio ou invade menos de 50% do Miométrio                   |
| T1b                                                                              | IbB (G1, G2, G3)     | Tumor Invade Mais que a metade do Miométrio                                        |
| T2                                                                               | II (G1, G2, G3)      | Tumor invade estroma cervical, mas sem extensão além do Útero                      |
| T3                                                                               | III                  | Tumor com extensão local ou regional                                               |
| T3a                                                                              | IIIa (G1, G2, G3)    | Tumor invade Serosa e/ou Anexos                                                    |
| T3b                                                                              | IIIb (G1, G2, G3)    | Tumor invade Vagina e/ou Paramétrio                                                |
| T4                                                                               | IV                   | Tumor Invade Bexiga e/ou mucosa Intestinal e/ou Metástases à distância             |
| T4                                                                               | IVa (G1, G2, G3)     | Tumor invade Bexiga e/ou Mucosa Intestinal                                         |
| <b>Linfonodos Regionais (N)</b>                                                  |                      |                                                                                    |
| <b>Categorias TNM</b>                                                            | <b>Estádios FIGO</b> | <b>Definição</b>                                                                   |
| NX                                                                               |                      | Linfonodos não podem ser avaliados                                                 |
| N0                                                                               |                      | Sem evidências de comprometimento linfonodal                                       |
| N1                                                                               | IIIc1 (G1, G2, G3)   | Metástases para linfonodos pélvicos                                                |
| N2                                                                               | IIIc2 (G1, G2, G3)   | Metástases para linfonodos para-aórticos com ou sem linfonodos pélvicos            |
| <b>Metástases à Distância (M)</b>                                                |                      |                                                                                    |
| <b>Categorias TNM</b>                                                            | <b>Estádios FIGO</b> | <b>Definição</b>                                                                   |
| M0                                                                               |                      | Sem de metástases à distância                                                      |
| M1                                                                               | IVb (G1, G2, G3)     | Metástases à distância (inclui metástases intra-abdominais) e Linfonodos Inguinais |
| <b>Grau Arquitetural</b>                                                         |                      |                                                                                    |
| Grau 1: Presença de menos de 5% de componente sólido, não escamoso, na neoplasia |                      |                                                                                    |
| Grau 2: Presença de 6 a 50% de componente sólido, não escamoso, na neoplasia     |                      |                                                                                    |
| Grau 3: Presença de mais de 50% de componente sólido, não escamoso, na neoplasia |                      |                                                                                    |
| Observação: A atipia nuclear intensa altera a graduação para 1 grupo acima       |                      |                                                                                    |

O tratamento de escolha para as pacientes com CE é cirúrgico, constituído por histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral e linfadenectomias. A linfadenectomia pélvica é recomendada para as pacientes com CEs graus 1 e 2, com invasão do miométrio menor que 50% e/ou tumores maiores que 2 centímetros. A linfadenectomia retroperitoneal deve ser feita nos CEs com comprometimento tumoral maior que 50% do miométrio. Nos tumores Grau 3 e com mais de 50% de invasão miometrial deve-se realizar de imediato a linfadenectomia pélvica e retroperitoneal (A.C.Camargo Cancer Center. 2014).

A radioterapia é indicada no tratamento adjuvante das pacientes com risco de recorrência. Pode ser feita por braquiterapia ou radioterapia pélvica. A hormonioterapia não apresenta um papel importante na terapia adjuvante em pacientes estádios I e II. Pacientes com CEs estágio III e IV podem se beneficiar com quimioterapia, sendo os principais agentes utilizados a Cisplatina, Carboplatina, Doxorrubicina e Paclitaxel (A.C.Camargo Cancer Center. 2014).

## **1.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS AOS CARCINOMAS DE ENDOMÉTRIO DO TIPO ENDOMETRIÓIDE.**

Os adenocarcinomas do endométrio do tipo endometrióide (AEE) ou tipo I são os tumores mais frequentes da cavidade uterina, sendo portanto o tipo histológico escolhido para este estudo. Os adenocarcinomas do endométrio do tipo II são infrequentes e foram excluídos desta casuística.

Os AEE estão associados às hiperplasias endometriais e às alterações das expressões dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona). Os AEE estão geralmente associados às condições de hiperestrogenismo, sendo que diminuições das expressões hormonais podem ser observadas em tumores com estádios mais avançados ou nos carcinomas do tipo seroso ou tipo II (KOUNELIS et al. 2000; TAVASSOLI e DEVILEE 2003).

Mutações ou alterações no gene supressor de tumor *PTEN* tem sido detectadas em lesões pré-neoplásicas e nos AEEs. MUTTER et al. (2000) e MUTTER (2001) detectaram a mutação de *PTEN* em 55% das hiperplasias endometriais atípicas e em 85% dos AEEs.

Alterações moleculares nos genes da família *Ras* tem sido encontradas em 13 a 26% dos AEEs e mutações do gene *Kras* já foram observadas em hiperplasias endometriais atípicas (ENOMOTO et al. 1991; BERCHUCK e BOYD 1995; TAVASSOLI e DEVILEE 2003).

A presença de instabilidade de microssatélites tem sido detectada em 20% dos AEEs e também nas lesões pré-neoplásicas do endométrio. Estas alterações moleculares estão geralmente associadas a inativação dos genes responsáveis pelo mecanismo de reparo da molécula de DNA (MLH-1, MSH2) (ESTELLER et al. 1998; PELTOMAKI 2003). O Quadro 3 sumariza as principais alterações moleculares presentes nos AEEs.

**Quadro 3** - Alterações Moleculares mais frequentes nos Adenocarcinomas de Endométrio do tipo endometrióide

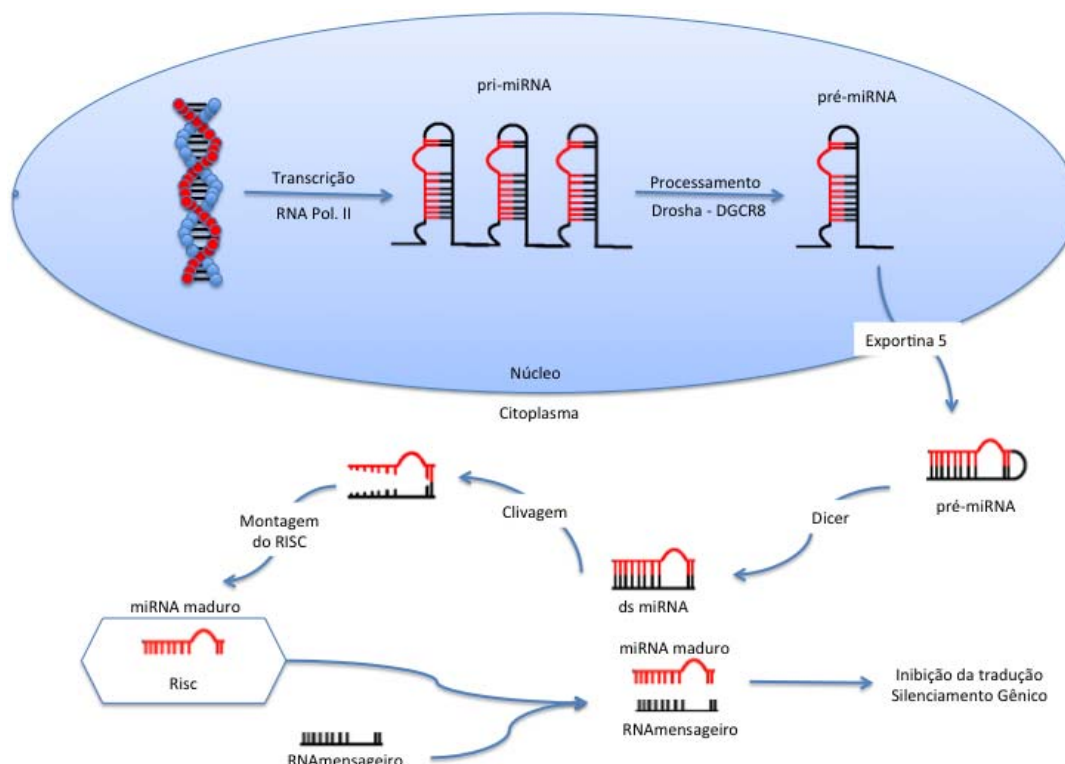
| Alteração Molecular                                              | Alteração               | Frequência das alterações | Ref.                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Alteração na Expressão de Receptores de Estrógeno e Progesterona | Aumento de Expressão    | 70 a 73%                  | (Kounelis et al. 2000; Tavassoli e Devilee 2003)                      |
| Mutação de <i>PTEN</i>                                           | Diminuição da Expressão | Até 85%                   | (Mutter et al. 2000; Mutter 2001)                                     |
| Alteração de <i>K-RAS</i>                                        | Aumento da Expressão    | 13-26%                    | (Enomoto et al. 1991; Berchuck e Boyd 1995; Tavassoli e Devilee 2003) |
| Instabilidade de Microssatélites                                 | Aumento                 | 20%                       | Esteller et al. 1998; Peltomaki 2003                                  |

### 1.3 MIRNA E CARCINOMAS DO ENDOMÉTRIO

Os miRNAs são RNAs de cadeia curta, não codificantes, que contém de 20 a 25 nucleotídeos (LEE et al. 1993). Estes pequenos RNAs foram descritos em 1993 em estudos do desenvolvimento de nematódeos. São moduladores de uma complexa rede que controla a expressão de diversos genes com funções tanto nos mecanismos fisiológicos, quanto, nos mecanismos patológicos (KLOOSTERMAN e PLASTERK 2006; BOREN et al. 2008; PAULEY e CHAN 2008; SINGH et al. 2008; HUANG et al. 2010; LEITE-MOREIRA et al. 2013; LIU 2013; KOLSHUS et al. 2014; JANSEN et al. 2015).

Os genes que contém os miRNAs são transcritos nos núcleos das células, na maioria das vezes, pela enzima RNA polimerase II (POL II), gerando o miRNA primário (pri-miRNA). À esta primeira estrutura é acrescida uma cauda de poliadenosinas na porção 3' e um "cap" de

7'metilguanosinas na porção 5' formando regiões com nucleotídeos pareados e não pareados. As regiões dos miRNAs com pareamento dos nucleotídeos são fragmentadas pelas enzimas Rnases III-tipo Drosh, liberando estruturas similares a grampos de cabelo denominadas miRNA precursores (pré-miRNA) . O pré-miRNA é transportado para o citoplasma das células pelas proteínas de transporte nuclear como a exportina-5 e a Ran-GTP. Em seguida, a região do miRNA sem pareamento, que tem a forma de alça, é removida pela enzima DICER, formando uma fita dupla de miRNA com 22 pares de nucleotídeos que se ligarão à proteína Argonaute (Ago). A seguir, o complexo proteico denominado RISC (Complexo de Indução do Silenciamento do RNA) separa as fitas, permanecendo o miRNA maduro associado à Ago e a outra metade é degradada. Acredita-se que a instabilidade termodinâmica da região 5 é a responsável por definir qual das fitas será o miRNA maduro (STAREGA-ROSLAN et al. 2011). Figura 1.



**Figura 1** - Síntese do miRNA. O miRNA é produzido no núcleo, transportado para o citoplasma e inibe a produção proteica por meio de ligação com o RNA mensageiro.

Já foram descritos vários mecanismos nos quais os miRNAs silenciam o RNA mensageiro (RNAm). Alguns estudos mostram que o complexo miRNA, Ago-2 e RISC transporta o RNAm para o citoplasma da célula, onde ele será armazenamento e degradado. Outros estudos, todavia, mostram que o miRNA e suas proteínas associadas podem atuar no controle da tradução do RNAm, impedindo a ligação dos ribossomos ao RNAm, interrompendo a sua tradução, ou decompondo o “cap” de 7-metilguanosina na porção 5’ (BARTEL 2004).

Mais de 700 miRNAs já foram identificados nas células e tecidos humanos e, embora suas funções não estejam totalmente compreendidas, acredita-se que 30 a 60% dos genes codificadores de proteínas sejam

regulados pelos miRNAs. Desta forma, a hipo ou hiperexpressão de um miRNA pode culminar em grandes disfunções celulares, consequentemente teciduais e sistêmicas. Vários estudos prévios tem demonstrado a atuação dos miRNAs no desenvolvimento do tecido neural, cardíaco, vascular e sanguíneo. Doenças cardíacas como arritmias, fibrose e desordens metabólicas tem sido associadas às atividades dos miRNAs. Os miRNA-126, miRNA-218, miRNA-143 e miRNA-145 tem sido associados ao controle da modulação vascular e desenvolvimento das células do sangue (VAN ROOIJ e OLSON 2007).

Alterações nas expressões dos miRNAs têm sido relacionadas ao desenvolvimento de diversas neoplasias. Um dos primeiros estudos nesta área, mostrou que os miR15 e miR16 estão deletados ou hipoexpressos nas Leucemias Linfocíticas Crônicas (CALIN et al. 2002). A partir deste estudo, outros pesquisadores observaram que tanto o aumento como a diminuição das expressões dos miRNAs estão associadas ao desenvolvimento de diversos tumores como gástricos, prostáticos, mamários, uroteliais e ovarianos (FARAZI et al. 2011; JARDIM e FIGEAC et al. 2013).

Portanto, os microRNAs podem exercer funções semelhantes aos oncogenes, estimulando o desenvolvimento tumoral ou como genes supressores de tumor, inibindo a tumorigênese. Alguns miRNAs vem sendo utilizados como marcadores de diagnóstico precoce ou como fatores prognósticos e/ou preditivos em diversas neoplasias (IORIO e CROCE et al. 2012).

Estudos prévios tem demonstrado alterações em vários miRNAs associados aos adenocarcinomas de endométrio. Contudo, os resultados ainda são controversos, uma vez que estes estudos apresentam diferenças nas metodologias utilizadas para a extração e amplificação, nas análises estatísticas e de validação, bem como nas escolhas dos miRNAs utilizados como controles endógenos (PIESTRZENIEWICZ-ULANSKA et al. 2002; PIESTRZENIEWICZ-ULANSKA et al. 2004; BOREN et al. 2008; CHUNG et al. 2009; COHN et al. 2010; DEVOR et al. 2011; WOO e PARK 2013).

BOREN et al. (2008) demonstraram alterações nas expressões de 13 miRNAs em carcinomas de endométrio quando comparados ao tecido endometrial normal ou hiperplásico. Destes 13 miRNAs, 5 (miR-let 7i, miR-193, miR-152, miR-30c) apresentavam diminuição das expressões e 8 (miR-185, miR-106a, miR-181a, miR-210, miR-423, miR-103, miR-107, miR-let 7c) apresentaram aumento das expressões (BOREN et al. 2008). Após analisar as expressões e as interações destes miRNAs com os seus respectivos RNA mensageiros, mRNAs alvos, eles observaram que estes miRNAs estavam associados ao controle de várias funções celulares importantes como adesão celular, mecanismo de reparo do DNA e apoptose (BOREN et al. 2008; COHN et al. 2010). LEE et al. (2013) constataram o aumento das expressões de 8 miRNAs (miR-200a, miR-205, miR-141, miR200b, miR-141, miR-200b, miR-200<sup>a</sup>, miR-182) nos adenocarcinomas de endométrio sendo os miR-200a, miR-205, miR-141, miR200b, miR-141, miR-200b, miR-182, 5 vezes mais expressos nos tumores em comparação aos endométrios

normais. Este estudo também mostrou que o bloqueio do miR-200b proporciona uma maior sensibilidade das células tumorais à cisplatina.

Recentemente, SIANOU et al. (2015) fizeram uma extensa revisão sobre o assunto e mostraram que 20 miRNAs tem sido descritos como promotores dos adenocarcinomas de endométrio enquanto que 42 miRNAs tem sido relacionados à inibição ou supressão do desenvolvimento destes tumores.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Estudos prévios já mostraram aumentos ou diminuições nas expressões de microRNAs (miRNAs) nas células dos adenocarcinomas em comparação às células endometriais não neoplásicas correspondentes. Contudo, ainda não foi demonstrado um perfil de expressão de miRNAs em AEEs de pacientes brasileiras. Este perfil poderá auxiliar na identificação das vias moleculares alteradas na carcinogênese endometrial bem como na seleção de alvos terapêuticos mais eficazes para o tratamento.

### **3 OBJETIVO**

Este estudo tem como objetivo:

- 1 Caracterizar o perfil de expressão dos miRNAs em adenocarcinomas do endométrio do tipo endometrióides operados no A.C.Camargo Cancer Center.
- 2 Verificar possíveis associações entre o perfil de expressão de miRNAs com os principais dados clínicos e histopatológicos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS**

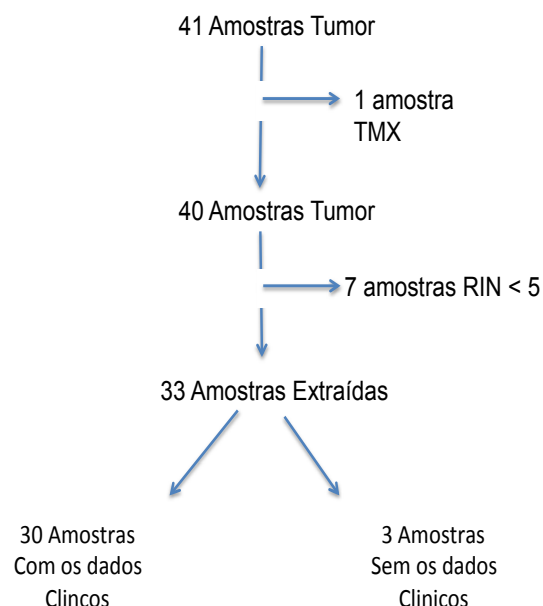
Trata-se de um estudo retrospectivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center nº 1539/11 (Anexo 1). Foram utilizadas as amostras com o diagnóstico anatomo-patológico confirmado de adenocarcinoma de endométrio do tipo endometrióide e amostras de endométrio não neoplásico congeladas e armazenadas no Banco de Tumores do A.C. Camargo Cancer Center. Na busca das amostras do Banco de Tumores, foram identificadas 40 casos de AEEs e 82 amostras de endométrio não tumoral. As amostras de endométrio não tumoral foram coletadas de pacientes submetidas à histerectomias por lesões miometriais benignas (leiomiomas). A casuística foi constituída por um total de 112 pacientes que foram estratificados em 2 subgrupos: Grupo Tumor (40 indivíduos) e Grupo Controle (82 indivíduos). Os critérios de inclusão para este estudo foram:

- A** Pacientes que concordarem a participar do estudo e assinarem o termo de consentimento pós informado;
- B** Diagnóstico de Adenocarcinoma de endométrio do tipo endometrióide e de endométrio não neoplásico confirmado por exame anatomopatológico;

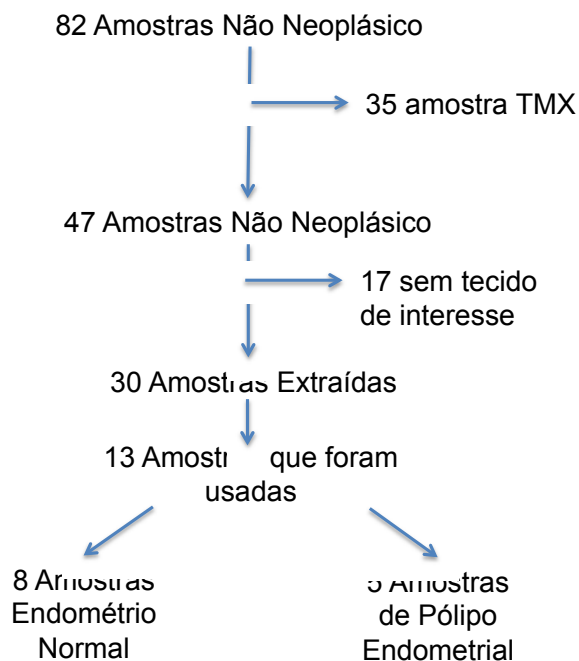
**C** Amostra tecidual à fresco em quantidade suficiente para a realização das análises.

Foram excluídas da pesquisa as pacientes que receberam quimio ou radioterapias prévias, diagnóstico de outras neoplasias malignas concomitantes ou Síndromes genéticas, ou por falta de informações clínicas nos prontuários. Foram também excluídas as pacientes que fizeram uso de Tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enilfenoxi]-N,N-dimetil-etanamina), uma vez que o uso desta droga está relacionado ao desenvolvimento de tumores endometriais.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a casuística foi composta por 33 amostras de tecido tumoral e 30 amostras de endométrio não neoplásico. Destas amostras foram utilizadas somente 13 (8 amostras de endométrio normal e 5 amostras de Pólipos endometriais sem atipias). (Figuras 2 e 3).



**Figura 2** - Fluxograma para seleção das amostras de AEE



**Figura 3** - Fluxograma para seleção das amostras não tumorais do endométrio

## 4.2 REVISÃO DOS DIAGNÓSTICOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Todos os casos foram examinados em microscópio óptico comum por patologista experiente. Novos cortes histológicos foram realizados e os tumores foram reclassificados de acordo com a Classificação dos tumores de endométrio da Organização Mundial da Saúde (KURMAN et al. 2014).

## 4.3 REGISTRO DOS DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Os dados anatomopatológicos de cada amostra foram anotados em protocolo elaborado especificamente para este projeto (Anexo 2).

As seguintes características histopatológicas foram identificadas: tipo histológico, grau nuclear, grau arquitetural, tamanho da lesão (cm), presença ou ausência de invasão perineural, vascular e linfática; invasão de estruturas vizinhas, presença de metástases linfonodais e à distância, estadiamento patológico e espessura da invasão da parede miometrial.

A medida da espessura da invasão da parede miometrial foi feita utilizando-se o scanner da Scanscope (Aperio Pathology Solutions, TX, EUA). As lâminas coradas por HE, contendo representatividade da maior área de infiltração tumoral na parede miometrial foram previamente selecionadas e escaneadas no aparelho Scanscope. As imagens digitalizadas foram analisadas por um patologista experiente para a medição da área de maior profundidade de invasão da parede do miométrio seguindo as recomendações (College of American Pathologist - CAP 2013).

#### **4.4 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS**

Os dados clínicos de cada paciente foram anotados em protocolo elaborado especificamente para este projeto (Anexo 3). Estes dados foram obtidos após conferência dos prontuários clínicos das pacientes, sendo eles: idade da paciente ao diagnóstico, idade da menarca e da menopausa, uso de contraceptivos orais e/ou reposição hormonal, tipo de tratamento tumoral realizado, presença de recidiva tumoral e o período de sobrevida global após o diagnóstico e tratamento.

## **4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNA**

### **4.5.1 Extração do miRNA**

O RNA foi extraído das amostras de AEE e dos endométrios não tumorais (endométrios normais e pólipos endometriais sem atipias) com o kit miRNeasy (Qiagen), conforme o protocolo a seguir:

1. Colocar o tecido no tubo com 700 µl Qiazol e homogeneizar a amostra por 10 segundos na velocidade máxima (6.500rpm);
2. Transferir o homogenizado para um novo tubo eppendorf de 1,5 ml e incubar à temperatura ambiente (22°C – bancada) por 5 minutos;
3. Adicionar 140 µl de clorofórmio e homogeneizar por 15 segundos;
4. Incubar em temperatura ambiente (22°C – bancada) por 3 minutos, centrifugar por 15 min à 12.000rcf na temperatura de 4°C;
5. Pipetar o sobrenadante (400ul) para um novo tubo (sample tube RB – com tampa);
6. Adicionar 600 ul de etanol à 100% e homogeneizar a mistura;
7. Transferir 700 ul da mistura para RNeasy Mini spin column em um tubo de microcentrifuga (2ml);
8. Centrifugar em  $\geq 8000g$  ( $\geq 10,000$  rpm) por 15seg em temperatura ambiente, descartar o material que ficou no tubo;
9. Adicionar 700 µl do Buffer RWT à coluna the RNeasy Mini spin column, centrifugar a  $\geq 8000g$  ( $\geq 10,000$  rpm) por 15seg em temperatura ambiente, descartar o material que ficou no tubo;

10. Adicionar 500 µl Buffer RPE à coluna the RNeasy Mini spin column centrifugar a  $\geq 8000g$  ( $\geq 10,000$  rpm) por 15seg em temperatura ambiente, descartar o material que ficou no tubo;
11. Repetir o passo 10;
12. Transferir a RNeasy Mini spin column para um novo tubo de microcentrífuga (1,5ml);
13. Adicionar 30 µl de água RNase free, centrifugar por 1 minuto em  $\geq 8000g$  ( $\geq 10,000$  rpm);
14. Desprezar a coluna, o material que ficou no tubo contém os miRNAs.

A quantidade do RNA foi aferida no Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade do material foi avaliado no Agilent 2100 Bioanalyzer.

No nosso estudo, usamos somente as amostras que apresentaram quantidade suficiente de material e o RNA Integrity Number (RIN) maior que 5.

#### **4.5.2 Síntese do cDNA**

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), conforme descrição a seguir: A reação foi feita em um volume final de 7,5µl contendo 600 ng de RNA total, 0,8µl de RT Buffer, 0,2µl de dNTP Mix (100 mM), 0,8µl de Megaplex RT Primers (*stem-loop* primers, específico para miRNAs maduros), 1,5µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,1µl de inibidor de RNase e

0,9µl de MgCl<sub>2</sub>. A síntese foi realizada no equipamento Veriti (Applied Biosystems) em 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50 °C por 1 segundo seguido por incubação a 85°C por 5 minutos.

#### 4.5.3 Amplificação do cDNA e análise da expressão gênica

A pesquisa de expressão dos microRNAs foi realizada utilizando-se o *Taqman Human microRNA Array A* (Figura 4). Cada array contém 377 miRNAs (funcionalmente definidos e amplamente expressos) e os miRNAs controles. Os miRNAs avaliados estão indexados no Sanger miRBase v14.

##### TaqMan® Human MicroRNA Array A

|   |                 |                 |                |                  |                  |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                  |                |                |                 |                 |                 |                 |             |
|---|-----------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| A | hsa-let-7a      | hsa-let-7c      | hsa-let-7d     | hsa-let-7e       | hsa-let-7f       | hsa-let-7g      | hsa-miR-1       | hsa-miR-9       | hsa-miR-10a     | hsa-miR-10b     | Mamm U6         | Mamm U6         | hsa-miR-15a     | hsa-miR-15b     | hsa-miR-16     | hsa-miR-17      | hsa-miR-18a     | hsa-miR-18b      | hsa-miR-19a    | hsa-miR-19b    | hsa-miR-20a     | hsa-miR-20b     | hsa-miR-21      | hsa-miR-22      |             |
| B | hsa-miR-23a     | hsa-miR-23b     | hsa-miR-24     | hsa-miR-25       | hsa-miR-26a      | hsa-miR-26b     | hsa-miR-27a     | hsa-miR-27b     | hsa-miR-28-3p   | hsa-miR-28-5p   | Mamm U6         | Mamm U6         | hsa-miR-29a     | hsa-miR-29b     | hsa-miR-29c    | hsa-miR-30b     | hsa-miR-30c     | hsa-miR-31       | hsa-miR-32     | hsa-miR-33b    | hsa-miR-34a     | hsa-miR-34c-5p  | hsa-miR-92a     | hsa-miR-93      |             |
| C | hsa-miR-95      | hsa-miR-96      | hsa-miR-98     | hsa-miR-99a      | hsa-miR-99b      | hsa-miR-100     | hsa-miR-101     | hsa-miR-103     | hsa-miR-105     | hsa-miR-106a    | RNU44           | hsa-miR-106b    | hsa-miR-107     | hsa-miR-122     | hsa-miR-124    | hsa-miR-125a-3p | hsa-miR-125a-5p | hsa-miR-125b     | hsa-miR-126    | hsa-miR-127-3p | hsa-miR-127-5p  | hsa-miR-128     | hsa-miR-129-3p  | hsa-miR-129-5p  |             |
| D | hsa-miR-130a    | hsa-miR-130b    | hsa-miR-132    | hsa-miR-133a     | hsa-miR-133b     | hsa-miR-134     | hsa-miR-135a    | hsa-miR-135b    | hsa-miR-136     | hsa-miR-137     | hsa-miR-138     | hsa-miR-139-3p  | hsa-miR-139-5p  | hsa-miR-140-3p  | hsa-miR-140-5p | hsa-miR-141     | hsa-miR-142-3p  | hsa-miR-142-5p   | hsa-miR-143    | hsa-miR-145    | hsa-miR-146a    | hsa-miR-146b-3p | hsa-miR-146b-5p | hsa-miR-147b    |             |
| E | hsa-miR-148a    | hsa-miR-148b    | hsa-miR-149    | hsa-miR-150      | hsa-miR-152      | hsa-miR-153     | hsa-miR-154     | hsa-miR-181a    | hsa-miR-181c    | hsa-miR-182     | RNU48           | hsa-miR-183     | hsa-miR-184     | hsa-miR-185     | hsa-miR-186    | hsa-miR-187     | hsa-miR-188-3p  | hsa-miR-188-5p   | hsa-miR-190    | hsa-miR-191    | hsa-miR-192     | hsa-miR-193a-3p | hsa-miR-193a-5p | hsa-miR-193b    | hsa-miR-194 |
| F | hsa-miR-195     | hsa-miR-196b    | hsa-miR-197    | hsa-miR-198      | hsa-miR-199a-5p  | hsa-miR-199a-3p | hsa-miR-199b-5p | hsa-miR-200a    | hsa-miR-200b    | hsa-miR-200c    | hsa-miR-202     | hsa-miR-203     | hsa-miR-204     | hsa-miR-205     | hsa-miR-208b   | hsa-miR-210     | hsa-miR-214     | hsa-miR-215      | hsa-miR-216a   | hsa-miR-216b   | hsa-miR-217     | hsa-miR-218     | hsa-miR-219-5p  | hsa-miR-221     |             |
| G | hsa-miR-222     | hsa-miR-223     | hsa-miR-224    | hsa-miR-296-3p   | hsa-miR-296-5p   | hsa-miR-299-3p  | hsa-miR-299-5p  | hsa-miR-301a    | hsa-miR-301b    | hsa-miR-302a    | hsa-miR-159a    | hsa-miR-302b    | hsa-miR-302c    | hsa-miR-320     | hsa-miR-323-3p | hsa-miR-324-3p  | hsa-miR-324-5p  | hsa-miR-326      | hsa-miR-328    | hsa-miR-329    | hsa-miR-330-3p  | hsa-miR-330-5p  | hsa-miR-331-3p  | hsa-miR-331-5p  |             |
| H | hsa-miR-335     | hsa-miR-337-5p  | hsa-miR-338-3p | hsa-miR-338-5p   | hsa-miR-339-3p   | hsa-miR-340     | hsa-miR-342-3p  | hsa-miR-342-5p  | hsa-miR-345     | hsa-miR-345     | hsa-miR-361-5p  | hsa-miR-362-3p  | hsa-miR-362-5p  | hsa-miR-363     | hsa-miR-365    | hsa-miR-367     | hsa-miR-369-3p  | hsa-miR-369-5p   | hsa-miR-370    | hsa-miR-371-3p | hsa-miR-371-5p  | hsa-miR-372     | hsa-miR-373     | hsa-miR-374a    |             |
| I | hsa-miR-374b    | hsa-miR-375     | hsa-miR-376a   | hsa-miR-376b     | hsa-miR-377      | hsa-miR-379     | hsa-miR-380     | hsa-miR-381     | hsa-miR-382     | hsa-miR-383     | hsa-miR-409-5p  | hsa-miR-410     | hsa-miR-411     | hsa-miR-422a    | hsa-miR-423-5p | hsa-miR-424     | hsa-miR-425     | hsa-miR-429      | hsa-miR-431    | hsa-miR-433    | hsa-miR-449a    | hsa-miR-449b    | hsa-miR-450a    | hsa-miR-450b-3p |             |
| J | hsa-miR-450b-5p | hsa-miR-451     | hsa-miR-452    | hsa-miR-453      | hsa-miR-454      | hsa-miR-455-3p  | hsa-miR-455-5p  | hsa-miR-483-5p  | hsa-miR-484     | hsa-miR-485-3p  | hsa-miR-485-5p  | hsa-miR-486-3p  | hsa-miR-486-5p  | hsa-miR-487a    | hsa-miR-487b   | hsa-miR-488     | hsa-miR-489     | hsa-miR-490-3p   | hsa-miR-491-3p | hsa-miR-491-5p | hsa-miR-493     | hsa-miR-494     | hsa-miR-495     | hsa-miR-496     |             |
| K | hsa-miR-498-3p  | hsa-miR-498-5p  | hsa-miR-500    | hsa-miR-501-3p   | hsa-miR-501-5p   | hsa-miR-502-3p  | hsa-miR-502-5p  | hsa-miR-503     | hsa-miR-504     | hsa-miR-505     | hsa-miR-507     | hsa-miR-508-3p  | hsa-miR-508-5p  | hsa-miR-509-5p  | hsa-miR-510    | hsa-miR-512-3p  | hsa-miR-512-5p  | hsa-miR-513-5p   | hsa-miR-515-3p | hsa-miR-515-5p | hsa-miR-516a-5p | hsa-miR-516b    | hsa-miR-517a    | hsa-miR-517c    |             |
| L | hsa-miR-518a-3p | hsa-miR-518a-5p | hsa-miR-518b   | hsa-miR-518c     | hsa-miR-518d-3p  | hsa-miR-518d-5p | hsa-miR-518e    | hsa-miR-518f    | hsa-miR-519a    | hsa-miR-519b    | hsa-miR-519a    | hsa-miR-520a-3p | hsa-miR-520a-5p | hsa-miR-520b-5p | hsa-miR-520g   | hsa-miR-521     | hsa-miR-522     | hsa-miR-523      | hsa-miR-524-5p | hsa-miR-525-3p | hsa-miR-525-5p  | hsa-miR-526b    | hsa-miR-532-3p  | hsa-miR-532-5p  |             |
| M | hsa-miR-539     | hsa-miR-541     | hsa-miR-542-3p | hsa-miR-542-5p   | hsa-miR-544      | hsa-miR-545     | hsa-miR-548a-3p | hsa-miR-548a-5p | hsa-miR-548b-3p | hsa-miR-548b-5p | hsa-miR-548c-3p | hsa-miR-548c-5p | hsa-miR-548d-3p | hsa-miR-548d-5p | hsa-miR-551b   | hsa-miR-556-3p  | hsa-miR-556-5p  | hsa-miR-561      | hsa-miR-570    | hsa-miR-574-3p | hsa-miR-576-3p  | hsa-miR-576-5p  | hsa-miR-579     | hsa-miR-582-3p  |             |
| N | hsa-miR-582-5p  | hsa-miR-589     | hsa-miR-589-5p | hsa-miR-589      | hsa-miR-589      | hsa-miR-615-3p  | hsa-miR-615-5p  | hsa-miR-616     | hsa-miR-618     | hsa-miR-624     | hsa-miR-625     | hsa-miR-627     | hsa-miR-628-5p  | hsa-miR-629     | hsa-miR-636    | hsa-miR-642     | hsa-miR-651     | hsa-miR-652      | hsa-miR-653    | hsa-miR-654-3p | hsa-miR-654-5p  | hsa-miR-655     | hsa-miR-680     | hsa-miR-671-3p  |             |
| O | hsa-miR-672     | hsa-miR-674     | hsa-miR-708    | hsa-miR-744      | hsa-miR-759      | hsa-miR-871     | hsa-miR-872     | hsa-miR-873     | hsa-miR-874     | hsa-miR-875-3p  | hsa-miR-875-5p  | hsa-miR-885-3p  | hsa-miR-885-5p  | hsa-miR-885-5p  | hsa-miR-886-3p | hsa-miR-886-5p  | hsa-miR-887     | hsa-miR-888      | hsa-miR-889    | hsa-miR-890    | hsa-miR-891a    | hsa-miR-891b    | hsa-miR-892a    | hsa-miR-147     |             |
| P | hsa-miR-208     | hsa-miR-211     | hsa-miR-212    | hsa-miR-219-1-3p | hsa-miR-219-2-3p | hsa-miR-220     | hsa-miR-220b    | hsa-miR-220c    | hsa-miR-298     | hsa-miR-325     | hsa-miR-346     | hsa-miR-375c    | hsa-miR-384     | hsa-miR-412     | hsa-miR-448    | hsa-miR-492     | hsa-miR-506     | hsa-miR-509-3-5p | hsa-miR-511    | hsa-miR-517b   | hsa-miR-519c-3p | hsa-miR-520b    | hsa-miR-520e    | hsa-miR-520f    |             |
|   | 1               | 2               | 3              | 4                | 5                | 6               | 7               | 8               | 9               | 10              | 11              | 12              | 13              | 14              | 15             | 16              | 17              | 18               | 19             | 20             | 21              | 22              | 23              | 24              |             |

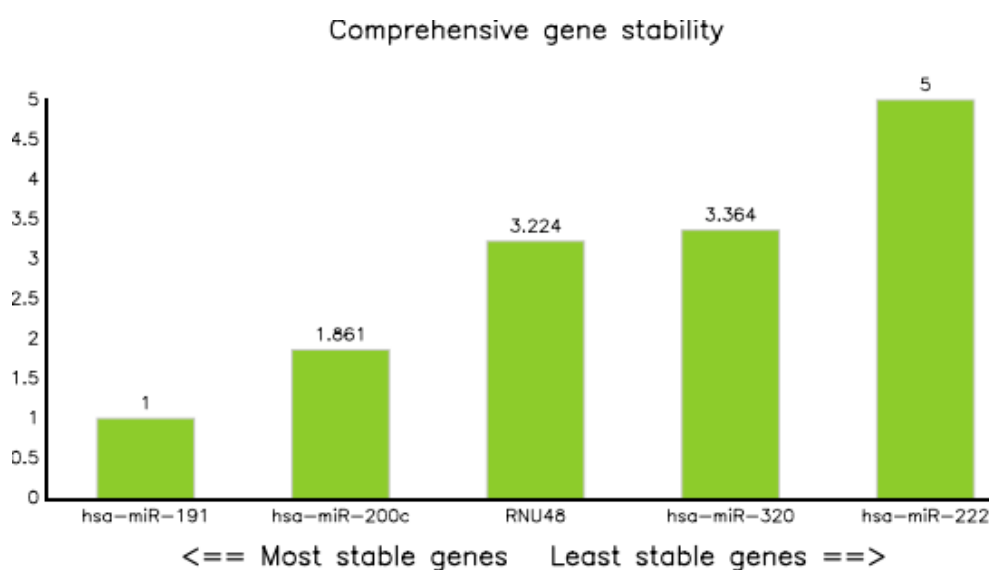
Fonte: <http://www.mirbase.org>

**Figura 4** - Representação da placa Taqman Human MicroRNA Array.

A amplificação do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” Megaplex Pools for microRNA Expression Analysis, conforme descrição a seguir:

- A reação foi realizada em um volume final de 900,0 µl contendo 6,0µl de cDNA, 450,0µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaQGold)) e 444,0µl de água livre de DNase/RNase.
- A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por um período de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos. A amplificação foi feita no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
- A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado. Os resultados foram analisados utilizando-se o software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems). O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão observada no tecido não neoplásico e também normalizado de acordo com o miRNA endógeno, ou seja, um microRNA cuja expressão apresenta menor variação entre todas as amostras. Para determinar o miRNA endógeno foi usado o aplicativo *Evaluating Reference Genes Expression* disponível em: <http://www.leonxie.com/referencegene.php? type=reference>.

Os miRNAs foram pareados em grupos de 10 miRNAs e analisados pelos seguintes métodos: BestKeeper, NormFinder, Genorm, The comparative delta-Ct method. Dentre todos os miRNAs estudados o mais estável (menor valor de *Gene stability*) foi o **miR-191** sendo este escolhido como miRNA endógeno para esse estudo (Figura 5).



**Figura 5** - Determinação do miRNA mais estável. O miRNA-191 apresentou a menor variância.

Uma vez determinado o miRNA endógeno as análises das expressões dos miRNA foram determinadas como resultado final ( $n_{\text{miRNA}}$ ) sendo representadas como aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:  $n_{\text{miRNA}} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$ , onde  $\Delta\text{Ct}$  da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do miRNA estudado do valor médio de Ct do miRNA usado como endógeno (PFAFFL 2001).

#### 4.5.4 Análises estatísticas

Os dados de expressão dos miRNAs dos grupos foram analisados com o auxílio do departamento de Bioinformática do A.C.Camargo Cancer Center. Para realização dos heatmaps foi utilizado o programa R version 2.15.2 (2012-10-26) com o pacote gplots. Para as análises de expressões diferenciais de miRNAs entre os grupos foi usado o teste não paramétrico Kruskal–Wallis one-way com P-value de corte: 0.01, FDR: 0.01 e Fold: > 2 x.

Para as análises de expressões diferenciais de miRNAs entre as amostras do grupo tumor de acordo com o nível de infiltração do miométrio foi usado o teste não paramétrico Wicoxon-Mann-Whitney com *P-value* de corte: 0,05. Para as análises de expressões diferenciais de miRNAs entre as amostras do grupo tumor de acordo com a classificação FIGO, foi usado o teste não paramétrico Kruskal–Wallis one-way com P-value de corte: 0.01, FDR: 0.01 e Fold: > 2 x.

## **5 RESULTADOS**

Após as etapas de extração e análise do material genético, a casuística foi composta por 47 amostras, sendo 33 AEEs e 14 endométrios não tumorais (8 amostras de endométrio normal e 6 amostras de pólipos endometriais sem atipias).

### **5.1 CARACTERISTICAS CLINICAS DAS PACIENTES**

O grupo de AEEs foi composto por pacientes com idade de 55 a 64 anos com a mediana de 63 anos. O grupo de endométrio não tumoral foi constituído por pacientes de 45 a 54 anos com a mediana de 52 anos.

Em relação ao estímulo estrogênico, não observamos diferenças nas médias de idade na menarca das pacientes dos 2 grupos. No grupo de AEEs, a média de idade foi de 12 anos e no grupo de endométrio não tumoral esta média foi de 13 anos. A maioria das pacientes do grupo de AEEs ainda apresentava ciclo menstrual e a média de idade da menopausa das pacientes dos 2 grupos foi de 50 anos. A média do número de filhos das mulheres do grupo de AEEs foi de 3 e das mulheres do grupo de endométrio não tumoral foi 2. O uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal foi observado em poucas pacientes de ambos os grupos.

Todas as pacientes do grupo de AEEs foram tratadas com histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral e linfadenectomia pélvica

e retroperitoneal. O período médio entre o diagnóstico e o início do tratamento foi de 1,10 meses. A maioria das pacientes foi submetida a Radioterapia adjuvante (Tabela 1).

**Tabela 1** - Tratamento realizado nas pacientes com Adenocarcinomas do endométrio do tipo endometrióide

|                                                            | FREQUENCIA | %    |
|------------------------------------------------------------|------------|------|
| CIRURGIA + QUIMIOTERAPIA +<br>RADIOTERAPIA + BRAQUITERAPIA | 8          | 26,7 |
| CIRURGIA + RADIOTERAPIA                                    | 3          | 10,0 |
| CIRURGIA + RADIOTERAPIA<br>ASSOCIADA A BRAQUITERAPIA       | 12         | 40,0 |
| CIRURGIA + BRAQUITERAPIA                                   | 4          | 13,3 |
| SOMENTE CIRURGIA                                           | 3          | 10,0 |

## 5.2 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS ENDOMÉTRIOS NÃO TUMORAIS

Os RNAs foram extraídos de 14 amostras de endométrio não tumoral, sendo 8 amostras de endométrio normal (todos do tipo proliferativo) e 6 amostras representadas por pólipos endometriais sem atipias.

### 5.3 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLOGICAS DOS AEEs

Os RNAs foram extraídos com sucesso de 33 amostras de AEEs. Os AEEs apresentavam áreas de metaplasia escamosa em 6 casos, necrose foi observada em 2 casos e áreas de padrão mucinoso foram encontradas somente em 1 caso. Os tumores tinham grau nuclear 3 em 50% dos casos, grau nuclear 2 em 43,33% dos casos e somente 6,67% eram grau nuclear 1. 40% dos casos tinham grau arquitetural I, 36,67% eram grau arquitetural II e 23,33% eram grau arquitetural III. De acordo com o estágio FIGO, 20 casos (67%) eram estádios Ia e Ib (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características histopatológicas dos adenocarcinomas endometrioides do endométrio

| <b>Tipo Histológico:</b>            |       | <b>33</b>         |          |
|-------------------------------------|-------|-------------------|----------|
| <b>Adenocarcinoma Endometrióide</b> |       | <b>Frequência</b> | <b>%</b> |
| <b>Grau Nuclear</b>                 | I     | 2                 | 6,67     |
|                                     | II    | 13                | 43,33    |
|                                     | III   | 15                | 50       |
| <b>Grau Arquitetural</b>            | I     | 12                | 40       |
|                                     | II    | 11                | 36,67    |
|                                     | III   | 7                 | 23,33    |
| <b>FIGO</b>                         |       | <b>Frequência</b> | <b>%</b> |
|                                     | Ia    | 8                 | 26,67    |
|                                     | Ib    | 12                | 40,00    |
|                                     | II    | 4                 | 13,33    |
|                                     | IIIa  | 0                 | 0,00     |
|                                     | IIIb  | 2                 | 6,67     |
|                                     | IIIC1 | 2                 | 6,67     |
|                                     | IIIC2 | 2                 | 6,67     |
|                                     | IVa   | 0                 | 0,00     |
|                                     | IVb   | 0                 | 0,00     |

De acordo com os resultados das análises morfométricas realizadas no aparelho Scanscope para a medição da infiltração tumoral na parede do miométrio, observamos que 65% dos tumores invadiam mais que 50% da espessura da parede do miométrio. Não foram observadas invasões tumorais em vasos sanguíneos ou perineurais, entretanto foi observado invasão tumoral em vasos linfáticos em duas amostras. Duas amostras apresentavam comprometimento tumoral do paramétrio.

Metástases em linfonodos foram detectadas em 4 casos, sendo comprometidas a cadeia linfonodal para-aortica, a cadeia ilíaca externa direita, cadeia pré-sacral e cadeia da fossa obturatória esquerda alta. Não foram observadas metástases à distância ou presença de células tumorais nos lavados peritoneais.

#### **5.4 DADOS DA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA E DA ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS miRNAs**

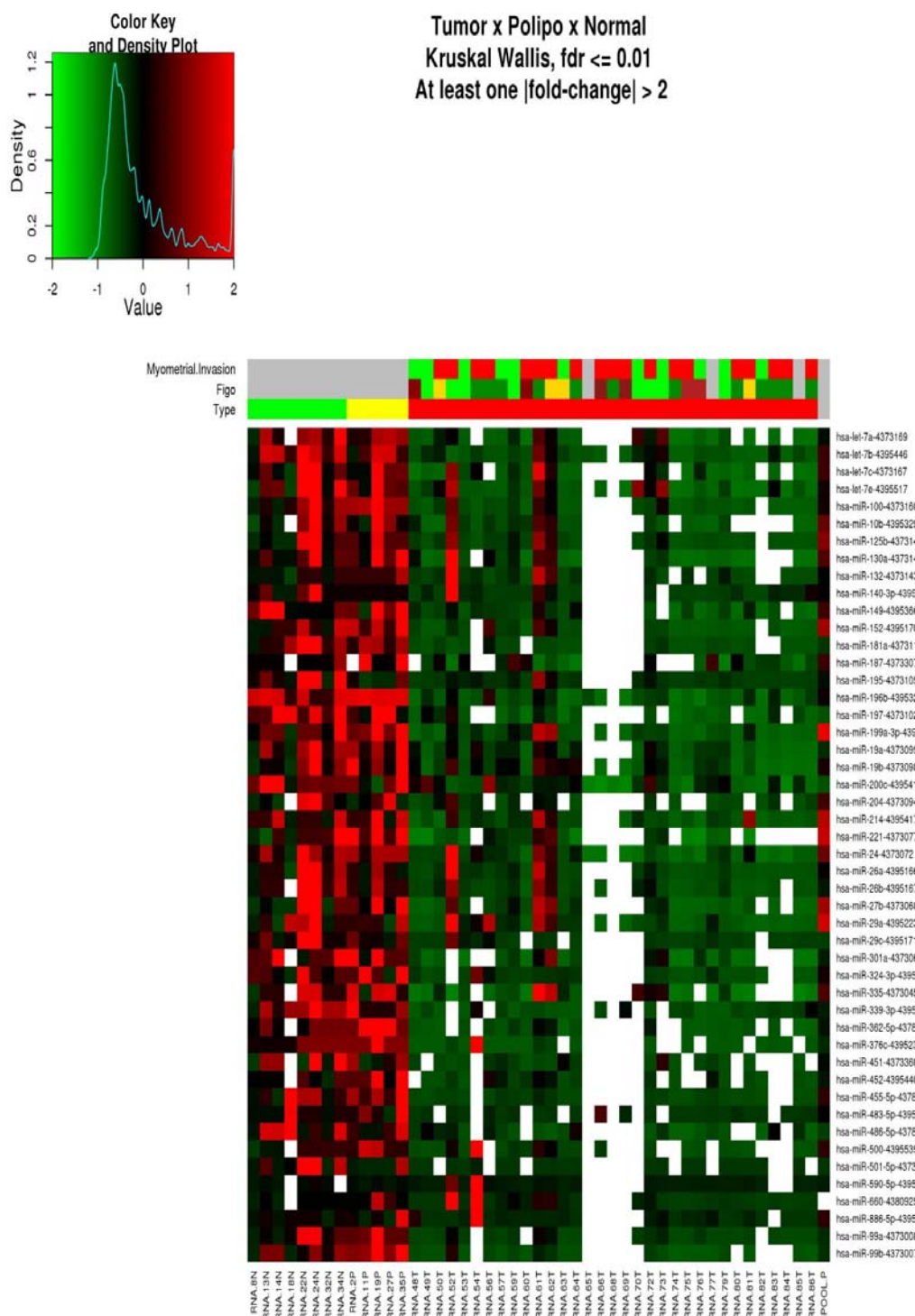
Todas as amostras incluídas no estudo foram amplificadas com sucesso e permitiram avaliar e estabelecer um perfil de expressão de miRNAs.

Os dados de amplificação do cDNA obtidos foram analisados utilizando-se o Software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems), que fornece os valores de Ct, utilizados para os cálculos do valor de expressão de cada miRNA.

As análises comparativas das expressões dos miRNAs de todas as amostras estudadas, mostraram que 164 miRNAs não foram expressos em nenhuma das amostras, 3 miRNAs (miR-200c, miR-222, miR-320) foram expressos em todas as amostras bem como os miRNAs controles (MammU6, RNU48). 48 miRNAs foram diferencialmente expressos nos grupos estudados (Quadro 4, Figura 6).

**Quadro 4** - 48 miRNAs diferencialmente expressos nas comparações feitas entre as amostras do grupo de AEEs versus amostras do grupo de endométrio não tumoral

|            |             |            |            |
|------------|-------------|------------|------------|
| let-7a     | let-7b      | let-7c     | let-7e     |
| miR-100    | miR-10b     | miR-125b   | miR-130a   |
| miR-132    | miR-140-3p  | miR-149    | miR-152    |
| miR-181a   | miR-187     | miR-195    | miR-196b   |
| miR-197    | miR-199a-3p | miR-19a    | miR-19b    |
| miR-200c   | miR-204     | miR-214    | miR-221    |
| miR-24     | miR-26a     | miR-26b    | miR-27b    |
| miR-29a    | miR-29c     | miR-301a   | miR-324-3p |
| miR-335    | miR-339-3p  | miR-362-5p | miR-376c   |
| miR-451    | miR-452     | miR-455-5p | miR-483-5p |
| miR-486-5p | miR-500     | miR-501-5p | miR-590-5p |
| miR-660    | miR-886-5p  | miR-99a    | miR-99b    |



**Figura 6** - Heatmap da análise supervisionada da expressão diferencial de miRNAs entre o Grupo de AEEs versus o grupo de endométrio não tumoral. As linhas representam os miRNAs e as colunas representam as amostras. O verde significa que o miRNA está hipoexpresso e o vermelho significa que o miRNA está hiperexpresso.

As análises supervisionadas dos 48 miRNAs diferencialmente expressos mostraram que 16 miRNAs eram hipoexpressos no grupo de AEEs quando comparados com as expressões dos miRNAs das amostras de endométrio normal. Nesta mesma análise comparativa, observamos que somente o miR590-5p estava hiperpexpresso nas amostras de AEEs em comparação às amostras de endométrio não neoplásico (Quadro 5).

**Quadro 5** - Análises comparativas das expressões dos miRNAs entre as amostras do grupo AEEs versus amostras de endométrio normal.

| miRNA          | Fold Change | Comparison* |
|----------------|-------------|-------------|
| hsa-let-7a     | -4.71       | T vs N      |
| hsa-let-7b     | -7.27       | T vs N      |
| hsa-miR-140-3p | -2.50       | T vs N      |
| hsa-miR-181a   | -19.78      | T vs N      |
| hsa-miR-195    | -9.84       | T vs N      |
| hsa-miR-197    | -6.80       | T vs N      |
| hsa-miR-200c   | -3.10       | T vs N      |
| hsa-miR-204    | -6.44       | T vs N      |
| hsa-miR-26a    | -4.66       | T vs N      |
| hsa-miR-26b    | -6.40       | T vs N      |
| hsa-miR-29a    | -3.33       | T vs N      |
| hsa-miR-29c    | -10.72      | T vs N      |
| hsa-miR-339-3p | -8.47       | T vs N      |
| hsa-miR-451    | -8.76       | T vs N      |
| hsa-miR-486-5p | -6.37       | T vs N      |
| hsa-miR-501-5p | -71.27      | T vs N      |
| has-miR-590-5p | 1,70        | T vs N      |

Quando a comparação foi feita restritamente entre as amostras tumorais e as amostras de pólipos endometriais sem atipias observamos que 31 miRNAs estavam também hipoexpressos nas amostras dos AEEs. Os dados estão presentes no Quadro 6. Neste mesmo grupo de comparação, observamos que o miR590-5p estava hiperpexpresso em 2,09x nos AEEs em relação as amostras dos pólipos endometriais.

**Quadro 6** - Análises comparativas dos miRNAs diferencialmente expressos nas comparações feitas entre as amostras do Grupo Tumor versus amostras de Grupo Controle (pólipo endometrial).

| miRNA           | Fold Change | Comparison* |
|-----------------|-------------|-------------|
| hsa-let-7c      | -3.58       | T vs P      |
| hsa-let-7e      | -3.53       | T vs P      |
| hsa-miR-100     | -9.65       | T vs P      |
| hsa-miR-10b     | -4.19       | T vs P      |
| hsa-miR-125b    | -5.01       | T vs P      |
| hsa-miR-130a    | -4.61       | T vs P      |
| hsa-miR-132     | -2.33       | T vs P      |
| hsa-miR-149     | -5.96       | T vs P      |
| hsa-miR-152     | -8.09       | T vs P      |
| hsa-miR-187     | -4.40       | T vs P      |
| hsa-miR-196b    | -7.84       | T vs P      |
| hsa-miR-199a-3p | -6.94       | T vs P      |
| hsa-miR-19a     | -5.42       | T vs P      |
| hsa-miR-19b     | -4.90       | T vs P      |
| hsa-miR-214     | -5.01       | T vs P      |
| hsa-miR-221     | -5.12       | T vs P      |
| hsa-miR-24      | -3.95       | T vs P      |
| hsa-miR-27b     | -4.75       | T vs P      |
| hsa-miR-301a    | -5.13       | T vs P      |
| hsa-miR-324-3p  | -8.93       | T vs P      |
| hsa-miR-335     | -3.14       | T vs P      |
| hsa-miR-362-5p  | -12.31      | T vs P      |
| hsa-miR-376c    | -9.12       | T vs P      |
| hsa-miR-452     | -9.34       | T vs P      |
| hsa-miR-455-5p  | -22.37      | T vs P      |
| hsa-miR-483-5p  | -12.77      | T vs P      |
| hsa-miR-500     | -3.31       | T vs P      |
| hsa-miR-660     | -2.11       | N vs P      |
| hsa-miR-886-5p  | -2.04       | T vs P      |
| hsa-miR-99a     | -16.38      | T vs P      |
| hsa-miR-99b     | -16.09      | T vs P      |
| hsa-miR-590-5p  | 2,09        | T vs P      |

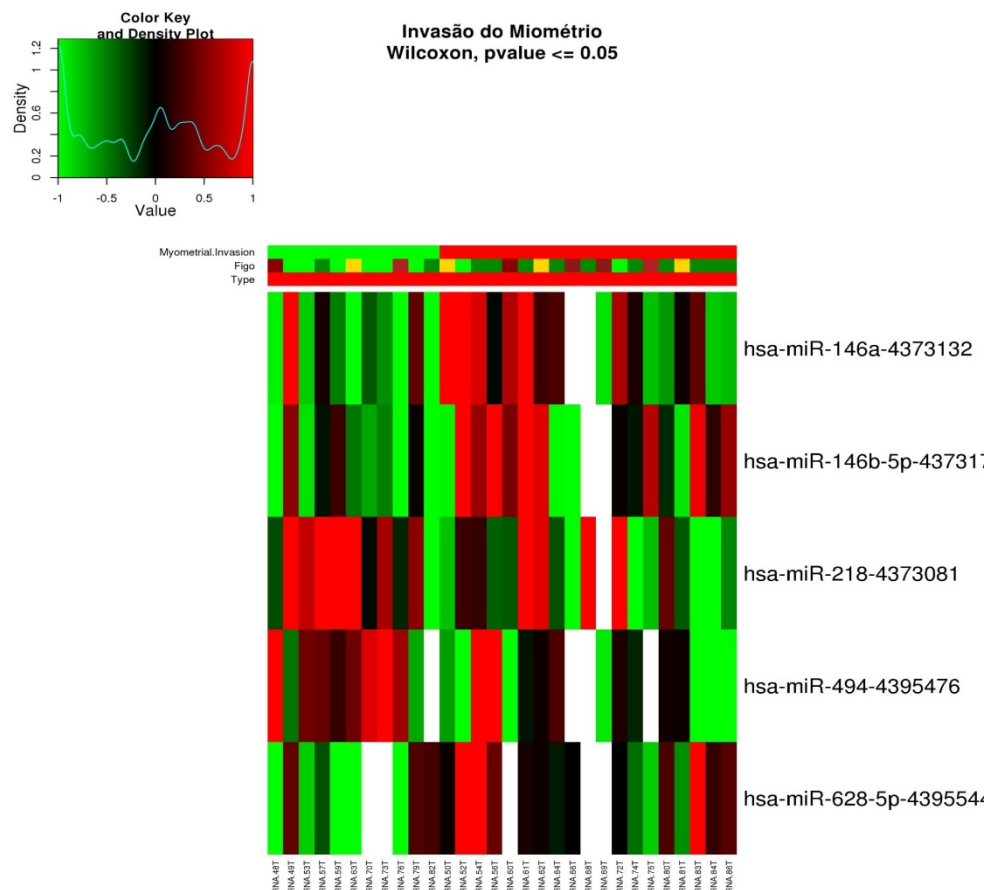
## **5.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE miRNAs E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS AEEs**

As análises comparativas das expressões dos miRNAs e as características clínicas e anátomo-patológicas não foram realizadas devido ao pequeno número de amostras representadas em cada grupo.

Foram realizadas somente as análises comparativas entre os perfis de expressão de miRNAs e o nível de invasão tumoral da parede do miométrio. Os tumores foram estratificados em 2 grupos: AEEs com menos de 50% de invasão da parede do miométrio (11 amostras) e AEEs com mais de 50% de invasão tumoral da parede miometrial (19 amostras). Nestas análises observamos que 188 miRNAs não foram expressos em nenhuma amostra e 5 miRNAs foram expressos em todas as amostras. Foram identificaram 5 miRNAs diferencialmente expressos. Destes, observamos que o miR-218 estava hiperexpresso nas amostras dos AEEs com menos de 50% de invasão da parede do miométrio enquanto que os miR-146a, miR-146b-5p, miR-494, miR-628-5p estavam hiperexpressos nas amostras de AEEs com mais de 50% de invasão da parede miometrial (Quadro 7, Figura 7).

**Quadro 7** - miRNAs diferencialmente expressos nos tumores com níveis de infiltração do miométrio maiores ou menores que 50%.

|          |             |         |
|----------|-------------|---------|
| miR-146a | miR-146b-5p | miR-218 |
| miR-494  | miR-628-5p  |         |



**Figura 7** - Heatmap das análises de expressão diferenciais dos miRNAs dos tumores com menos ou mais de 50% de infiltração do miométrio. O verde significa que o miRNA está hipoexpresso e o vermelho significa hiperexpresso. As linhas no heatmap representam os miRNAs e as colunas representam as amostras estudadas.

As análises de expressão dos miRNAs nos AEEs de acordo com o estadio FIGO, mostrou que 2 miRNAs estão hiperexpressos nos tumores estágio FIGO 1A em comparação aos tumores estágio FIGO IIIc1(Quadro 8 e Figura 8).



## 6 DISCUSSÃO

O carcinoma de endométrio ainda é um dos tumores ginecológicos mais comuns. Acomete principalmente mulheres menopausadas, com idade acima de 60 anos. A nossa casuística reflete estes achados, uma vez que a faixa etária de 70 a 80 anos foi a mais frequente e a média de idade das pacientes de nosso estudo de 63 anos. É sabido que os principais fatores de risco do câncer de endométrio estão associados a obesidade e condições que favorecem o aumento dos níveis de estrogênio como uso de terapia de reposição hormonal, idade precoce da menarca e menopausa tardia entre outras. No nosso estudo algumas destas características foram encontradas nas pacientes, principalmente a presença de sobrepeso e obesidade (AMANT et al. 2005).

Embora o diagnóstico da maioria dos tumores é feito na fase tardia ou avançada da doença, as nossas amostras tumorais são de pacientes com estádios IA e IB. Este achado está relacionado principalmente a presença de sintomas como o sangramento uterino anormal, facilmente percebido pelas pacientes e que permitiu o diagnóstico precoce destas pacientes (BORONOW et al. 1984; AMANT et al. 2005).

Recentemente, alterações moleculares, como mutações em PTEN, Kras, PI3KCA e beta catenina, têm sido demonstradas nos carcinomas endometrióides do endométrio, porém estes achados não são unânimes e

não estão presentes em todos os tumores, apontando que outras mutações ou alterações epigenéticas possam estar presentes (LLOBET et al. 2009).

A partir da primeira descrição feita por LEE et al. (2013) os miRNAs passaram a ser alvo de vários estudos, que demonstraram o papel importante destas moléculas em várias via celulares envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos.

Vários miRNAs tem sido apontados como candidatos a oncogenes ou genes supressores de tumor devido a hiperexpressão ou hipoexpressão destes miRNAs encontradas em alguns tipos de tumores. Nos últimos anos, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de caracterizar os perfis de expressão de miRNAs associados a carcinogênese de vários tipos tumorais, como por exemplo: tumores de mama, renais, ovarianos, de próstata, estômago e vários outros (RATNER et al. 2010; JIANG et al. 2012; YANG et al. 2012; CHEN et al. 2013; SCHUBERT et al. 2013).

Vários estudos já foram realizados com miRNAs e carcinomas de endométrio, porém poucos tiveram como objetivo determinar um perfil de expressão de miRNA específico dos adenocarcinomas de endométrio do tipo endometrióide.

No nosso estudo, usamos amostras de AEEs e de endométrios não neoplásicos para determinar o perfil de miRNA específico deste tipo tumoral. Encontramos que o miRNA 590-5p é o único miRNA hiperexpresso nos tumores em comparação com as amostras de endométrio não neoplásico e pólipos endometriais. A sequência codificadora do miRNA-590-5p está localizada no braço longo do cromossomo 7, apresenta 5434 alvos e tem

como único alvo validado o Receptor tipo II do TGF-beta (TGF-beta RII) (BETEL et al. 2008; SCHWARZENBACHER et al. 2013).

Semelhante aos nossos achados, JIANG et al. (2012) em um estudo com linhagens celulares de hepatocarcinoma e hepatócitos normais também encontraram hiperexpressão de miRNA-590-5p nas células do hepatocarcinoma em comparação com os hepatócitos normais. Porém, estes autores demonstraram que há uma correlação inversa entre a expressão do miRNA-590-5p e a expressão de TGF-beta RII, mostrando que o aumento da expressão deste miRNA está associado com a baixa expressão de TGF-beta RII, promovendo a proliferação e invasão das células tumorais (JIANG et al. 2012; JIN et al. 2013). Estes dados ainda não foram observados em outros tumores incluindo os carcinomas de endométrio.

Quando comparamos o perfil de expressão de miRNAs nas amostras de tumor que invadiram menos de 50% do miométrio (grupo 1) com o perfil das amostras que invadiram mais de 50% da parede miometrial (grupo 2) observamos hiperexpressão do miR-218 nas amostras do grupo 1 em relação ao grupo 2. Já os miRNAs 146a, 146b-5p, 494 e miR-628-5p estavam hiperpexpressos nos tumores do grupo 2.

Estudos prévios demonstraram que o miR-218 atua como supressor de tumor, atuando na inibição da progressão celular, promoção de apoptose, aumento da adesão celular, diminuição da invasão celular em vários tumores como osteossarcomas, tumores pancreáticos, tumores gástricos, tumores de mama e tumores gliais. Os potenciais genes alvos já descritos

deste miRNA são o TIAM-1, MMP-2 e MMP-9. Não há na literatura dados sobre a hiperexpressão do miRNA-218 em carcinomas de endométrio, mas a hiperexpressão deste miRNA nos AEEs menos invasivos e portanto menos agressivos corroboram os dados da literatura que o apontam como gene supressor tumoral (WU et al. 2009; HUANG et al. 2010; KIM et al. 2011; HE et al. 2012; KINOSHITA et al. 2012; LI BS et al. 2012; LI J et al. 2012; YAMANAKA et al. 2012; HE et al. 2013).

Por outro lado, observamos que os AEEs mais invasivos e, portanto mais agressivos, apresentaram hiperexpressão dos miRNA146a e miRNA146b-5p diferente do que já foi descrito em outros tumores sólidos que os apontam como supressores tumorais. Há dados na literatura que mostram que a baixa regulação do miRNA146a favorece o desenvolvimento e/ou manutenção tumoral, porém seu mecanismo ainda não está esclarecido (LACEY et al. 2008; LABBAYE e TESTA. 2012). No nosso estudo, o miRNA 494 também esteve com sua expressão aumentada nos AEEs mais invasivos. Dados de estudos prévios com linhagens celulares de colangiocarcinoma, carcinomas da mama e de tumor estromal gastrointestinal (GIST) apontaram sua ação no controle do ciclo e proliferação celulares, sendo um potencial alvo terapêutico no tratamento destes tumores (XIAO et al. 2009; KIM et al. 2011; LIU et al. 2012). Pouco se sabe a respeito do miRNA-628-5p. Em nosso estudo, observamos hiperexpressão deste miRNA. Em estudo com modelo de linhagens de células progenitoras de leucemia mielóide aguda foi observado baixa

expressão de miRNA-628-5p sendo este considerado um fator de mau prognóstico (FAVREAU e SATHYANARAYANA 2012).

Estudos anteriores com miRNAs e carcinomas de endométrio podem ser encontrados na literatura, porém os resultados geralmente são controversos devido a grande heterogeneidade das amostras estudadas (material congelado, material fixado e embocado em parafina, modelo celular, cultura de células, etc), diferentes metodologias aplicadas, bem como o uso de testes estatísticos e de validação aplicados (TAVASSOLI e DEVILEE 2003; KLOOSTERMAN e PLASTERK 2006; BOREN et al. 2008; CHUNG et al. 2009; COHN et al. 2010; DEVOR et al. 2011).

As análises comparativas entre os perfis de expressão dos miRNAs e os estadiamentos dos AEEs foram prejudicadas devido a grande variabilidade entre as amostras dentro do mesmo estadiamento contudo, os miRNAs let-7e e let-7g se mostraram alterados nas comparações feitas entre os AEEs estádios FIGO IA e IIC1. Porém, novas análises devem ser realizadas para confirmação e validação destes achados.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que 48 miRNAs estão diferencialmente expressos nos AEEs em comparação aos endométrios não tumorais.

Os adenocarcinomas endométrioides do endométrio hiperexpressam o miRNA 590-5p em comparação aos endométrios não tumorais.

O miR-218, miR146a, miR-146b-5p, miR-494 e miR-628-5p estão diferencialmente expressos nos tumores que invadem mais ou menos de 50% da parede do miométrio.

Adenocarcinomas endométrioides do endométrio estágio FIGO Ia hiperexpressam os miRNAs Let 7e e Let 7g em comparação aos tumores estadio FIGO IIc1.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.C.Camargo Cancer Center. Departamento de Ginecologia. **Ginecologia oncológica: manual de condutas**. São Paulo: FAP; 2014. Carcinoma de endométrio; p.25-32.

Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. **Lancet** 2005; 366:491-505.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** 2004; 116:281-97.

Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:D149-53.

Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 1983, 15:10-7.

Boren T, XiongY, Hakan A, et al. MicroRNAs an their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. **Gynecol Oncol** 2008; 110:206-15.

Boronow RC, Morrow CP, Cresman WT, et al. Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study. **Obstet Gynecol** 1984; 63:825-32.

Berchuck A, Boyd J. Molecular basis of endometrial cancer. **Cancer** 1995; 76(10 Suppl):2034-40.

[CAP] College of American Pathologist. **Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the endometrium**. 2013. Available from: <URL:[http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/2013/Endometrium\\_13protocol\\_3201.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/Endometrium_13protocol_3201.pdf)> [2015 abr 12]

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci** 2002; 99:15524-9.

Chen J, Zhang D, Zhang W, et al. Clear cell renal cell carcinoma associated microRNA expression signatures identified by an integrated bioinformatics analysis. **J Transl Med** 2013; 11:169.

Chung TK, Cheung TH, Huen NY, et al. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. **Int J Cancer** 2009; 124:1358-65.

Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, et al. Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol** 2010; 202:e1-e8.

Devor EJ, Hovey AM, Goodheart MJ, Ramachandran, S, Leslie KK. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. **Oncol Rep** 2011; 26:995-1002.

Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, et al. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. **Cancer Res** 1991; 51:5308-14.

Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. **Oncogene** 1998; 17:2413-17.

Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. **J Pathol** 2011; 223:102-15.

Favreau AJ, Sathyanarayana P. miR-590-5p, miR-219-5p, miR-15b and miR-628-5p are commonly regulated by IL-3, GM-CSF and G-CSF in acute myeloid leukemia. **Leuk Res** 2012; 36:334-41.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase n° 11**. 2013. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2015 out 15]

He H, Di Y, Liang M, et al. The microRNA-218 and ROBO-1 signaling axis correlates with the lymphatic metastasis of pancreatic cancer. **Oncol Rep** 2013; 30:651-8.

He X, Dong Y, Wu CW, et al. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by down regulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. **Mol Med** 2012; 18:1491-8.

Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Zhao QL. Biological functions of microRNAs. **Bioorg Khim** 2010; 36:747-52.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics: a comprehensive review. **EMBO Mol Med** 2012; 4:143-59.

Jansen F, Yang X, Nickenig G, Werner N, Vasa-Nicotera M. Role, function and therapeutic potential of MicroRNAs in vascular aging. **Curr Vasc Pharmacol** 2015; 13:324-30.

Jardim F, Figeac M. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:480-6.

Jiang X, Xiang G, Wang Y, et al. MicroRNA-590-5p regulates proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma cells by targeting TGF- $\beta$  RII. **Mol Cells** 2012; 33:545-51.

Jin J, Cai L, Liu ZM, Zhou XS. miRNA-218 Inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating of TIAM1, MMP2 and MMP9. **Asian Pac J Cancer Prev** 2013; 14:3681-4.

Kim WK, Park M, Kim YK, et al. MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. **Clin Cancer Res** 2011; 17:7584-94.

Kinoshita T, Hanazawa T, Nohata N, et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2012; 3:1386-400.

Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. **Dev Cell** 2006; 11:441-50.

Kolshus E, Dalton VS, Ryan KM, McLoughlin DM. When less is more - microRNAs and psychiatric disorders. **Acta Psychiatr Scand** 2014; 129:241-56.

Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. **Mod Pathol** 2000; 13:379-88.

Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. **WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: IARC; 2014. (WHO Classification of Tumours, v.6, IARC WHO Classification of Tumours, nº 6).

Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. **J Hematol Oncol** 2012; 5:13.

Lacey JV, Mutter GL, Nucci MR, et al. Risk of subsequent endometrial carcinoma associated with endometrial intraepithelial neoplasia classification of endometrial biopsies. **Cancer** 2008; 113: 2073-81.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 1993; 75:843-54.

Lee TS, Jeon HW, Kim YB, Kim YA, Kim MA, Kang SB. Aberrant microRNA expression in endometrial carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. **PLoS One** 2013; 8:e81421.

Leite-Moreira AM, Lourenço AP, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Pivotal role of microRNAs in cardiac physiology and heart failure. **Drug Discov Today** 2013; 18:1243-9.

Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. **PLoS One** 2012; 7:e41629.

Li J, Ping Z, Ning H. MiR-218 impairs tumor growth and increases chemosensitivity to cisplatin in cervical cancer. **Int J Mol Sci** 2012; 13:16053-64.

Liu C. The role of microRNAs in tumors. **Arch Pharm Res** 2013; 36:1169-77.

Liu Y, Lai L, Chen Q, et al. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN. **J Immunol** 2012; 188:5500-10.

Llobet D, Pallares J, Yeramian A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. **J Clin Pathol** 2009; 62:777-85.

Lurian JR. Câncer uterino In: Barek JS, editor. **Barek & Novak: tratado de ginecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.130-70.

Ministério da Saude. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:924-30.

Mutter GL. PTEN, a protean tumor suppressor. **Am J Pathol** 2001; 158:1895-8.

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **SEER Stat Fact Sheets: Endometrial Cancer**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>> [2015 set 12]

Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. **Ann N Y Acad Sci** 2008; 1143:226-39.

Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 105:103-4.

Peltomaki P. Role of DNA Mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:1174-9.

Pfaffl PM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Piestrzeniewicz-Ulanska D, Brys M, Semczuk A, Jakowicki JA, Krajewska WM. Expression of TGF-beta type I and II receptors in normal and cancerous human endometrium. **Cancer Lett** 2002; 186:231-9.

Piestrzeniewicz-Ulanska D, Brys M, Semczuk A, Rechberger T, Jakowicki JA, Krajewska WM. TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas. **Gynecol Oncol** 2004; 95:173-80.

Ratner ES, Tuck D, Richter C, et al. MicroRNA signatures differentiate uterine cancer tumor subtypes. **Gynecol Oncol** 2010; 118:251-7.

Schubert M, Spahn M, Kneitz S, et al. Distinct microRNA expression profile in prostate cancer patients with early clinical failure and the impact of let-7 as prognostic marker in high-risk prostate cancer. **PLoS One** 2013; 8:e65064.

Schwarzenbacher D, Balic M, Pichler M. The role of MicroRNAs in breast cancer stem cells. **Int J Mol Sci** 2013; 14:14712-23.

Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. **Mod Pathol** 2010; 13:295-308.

Sianou A, Galyfos G, Moragianni D, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of endometrial cancer: a systematic review. **Arch Gynecol Obstet** 2015; 292:271-82.

Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. **FEBS J** 2008; 275:4929-44.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Útero: endométrio; p.220-4.

Starega-Roslan J, Koscianska E, Kozlowski P, Krzyzosiak WJ. The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:2859-71.

Tavassoli FA, Devilee P. **Pathology and genetics of tumours of breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press; 2003. Tumours of the corpus; p.218-57. (World Health Organization classification of tumours, 5).

van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **J Clin Invest** 2007; 117:2369-76.

Woo YM, Park JH. microRNA biomarkers in cystic diseases. **BMB Rep** 2013; 46:338-45.

Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. **Eur J Cancer Prev** 2009; 18:50-5.

Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res** 2009; 37(Database issue):D105-10.

Yamanaka S, Campbell NR, An F, et al. Coordinated effects of microRNA-494 induce G(2)/M arrest in human cholangiocarcinoma. **Cell Cycle** 2012; 11:2729-38.

Yang L, Li Q, Wang Q, Jiang Z, Zhang L. Silencing of miRNA-218 promotes migration and invasion of breast cancer via Slit2-Robo1 pathway. **Biomed Pharmacoth** 2012; 66:535-40.

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 14 de Abril de 2011.

À  
Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1539/11  
“Determinação do perfil de expressão de miRNA em carcinomas de endométrio:  
correlação com dados clínicos e histopatológicos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 12/04/2011, aprovaram a realização do estudo em referência, datado de 20 de março de 2011 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo BIOBANCO do hospital AC Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do BIOBANCO do Hospital AC Camargo

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

  
**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

## **Anexo 2 - Registros de Dados Anatomopatológicos**

RGH: .....

Nome: ..... Abreviação:

Idade: .....

Diagnóstico Anatomopatológico:

Tipo Histológico:

Grau Nuclear:

Grau Arquitetural:

Tamanho da Lesão:

Nível de invasão miometrial (mm):

Invasão Perineural ( ), Vascular ( ), Linfática ( ) Obs:

Invasão de Estruturas Vizinhas:

Presença de Metástases à distância:

Observações:

### **REGISTROS DE DADOS CLÍNICOS**

Nome:

Abreviação:

Período do diagnóstico:

Idade:

Idade da Menarca:

Idade da Menopausa:

Fez uso de contraceptivos orais ( ) Sim, ( ) Não Obs:

Tratamento de reposição hormonal ( ) Sim, ( ) Não Obs:

Antecedentes Patológicos Pessoais:

Antecedentes Patológicos Familiares:

Tipo de tratamento realizado no serviço de Ginecologia do Hospital A.C. Camargo:

Fez uso de Tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina).

( ) Sim, ( ) Não Obs:

Presença de recidiva da doença: ( ) Sim, ( ) Não Obs:

Período de sobrevida após o diagnóstico e o tratamento:

Observações:

### Anexo 3 - Quadro que sumariza as amostras usadas no estudo

| Grupo controle                                        |          |                             |                |                |                       |                    |
|-------------------------------------------------------|----------|-----------------------------|----------------|----------------|-----------------------|--------------------|
| Subgrupo formado por amostras de endométrio normal    |          |                             |                |                |                       |                    |
| RNA<br>(ID tubo)                                      | RGH      | Anatomopatológico           | R 260<br>/ 280 | R 260 /<br>230 | Integridade<br>do RNA | RIN<br>Bioanalyzer |
| U 8N-2                                                | 4047893  | Endométrio Secretor         | 2,11           | 2,12           | Ótimo (2:1)           | 5,50               |
| U 13N                                                 | 5030560  | Endométrio<br>Proliferativo | 2,11           | 2,11           | Ótimo (2:1)           | 8,30               |
| U 18N                                                 | 5049016  | Endométrio<br>Proliferativo | 2,13           | 1,80           | Ótimo (2:1)           | 5,50               |
| U 22N                                                 | 6002226  | Endométrio<br>Proliferativo | 2,07           | 1,85           | Bom (1:1)             | 5,00               |
| U 24N                                                 | 6008658  | Endométrio<br>Proliferativo | 2,14           | 2,00           | Ótimo (2:1)           | 7,60               |
| U 34N-2                                               | 95023437 | Endométrio<br>Proliferativo | 2,04           | 0,81           | Ótimo (2:1)           | 7,00               |
| U 14N                                                 | 5033020  | Endométrio                  | 2,07           | 1,46           | Ótimo (2:1)           | 7,60               |
| U 32N                                                 | 86013009 | Endométrio Atrófico         | 2,13           | 1,80           | Ótimo (2:1)           | 8,10               |
| Subgrupo formado por amostras de Pólipos Endometriais |          |                             |                |                |                       |                    |
| U 2N                                                  | 2025604  | Pólipos Endometrial         | 2,14           | 2,21           | Ótimo (2:1)           | 8,50               |
| U 11N                                                 | 5016266  | Pólipos Endometrial         | 2,11           | 2,11           | Ótimo (2:1)           | 7,70               |
| U 19N                                                 | 5050170  | Pólipos Endometrial         | 2,11           | 2,02           | Ótimo (2:1)           | 8,10               |
| U 27N                                                 | 6025382  | Pólipos Endometrial         | 2,13           | 2,08           | Ótimo (2:1)           | 8,80               |
| U 35N                                                 | 95023453 | Pólipos Endometrial         | 2,14           | 2,11           | Ótimo (2:1)           | 9,00               |
| Amostra formada pelo Pool dos pólipos                 |          |                             |                |                |                       |                    |
| Grupo Tumor                                           |          |                             |                |                |                       |                    |
| RNA<br>(ID tubo)                                      | RGH      | Status tumoral              | R 260<br>/ 280 | R 260 /<br>230 | Integridade<br>do RNA | RIN<br>Bioanalyzer |
| U 48T                                                 | 5028019  | Tumor primário              | 2,12           | 1,88           | Ótimo (2:1)           | 8,80               |
| U 49T                                                 | 7138990  | Tumor primário              | 2,13           | 2,11           | Ótimo (2:1)           | 7,60               |
| U 50T                                                 | 8021280  | Tumor primário              | 2,15           | 1,79           | Ótimo (2:1)           | 8,20               |
| U 52T                                                 | 8040960  | Tumor primário              | 2,13           | 2,07           | Ótimo (2:1)           | 7,90               |
| U 53T                                                 | 8043020  | Tumor primário              | 2,15           | 1,41           | Ótimo (2:1)           | 8,20               |
| U 54T                                                 | 8113210  | Tumor primário              | 2,13           | 2,12           | Ótimo (2:1)           | 8,90               |
| U 56T                                                 | 8219280  | Tumor primário              | 2,13           | 2,13           | Ótimo (2:1)           | 7,70               |
| U 57T                                                 | 8240060  | Tumor primário              | 2,21           | 1,93           | Ótimo (2:1)           | 8,10               |
| U 59T                                                 | 8336960  | Tumor primário              | 2,17           | 2,07           | Ótimo (2:1)           | 8,60               |
| U 60T                                                 | 8345070  | Tumor primário              | 2,15           | 2,09           | Ótimo (2:1)           | 8,30               |
| U 61T                                                 | 9050280  | Tumor primário              | 2,15           | 2,14           | Ótimo (2:1)           | 8,10               |
| U 62T-A                                               | 9067750  | Tumor primário              | 2,15           | 2,01           | Ótimo (2:1)           | 8,50               |

|                |          |                |      |      |                    |             |
|----------------|----------|----------------|------|------|--------------------|-------------|
| <b>U 63T-A</b> | 9115710  | Tumor primário | 2,13 | 2,17 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>7,10</b> |
| <b>U 64T</b>   | 9121950  | Tumor primário | 2,15 | 2,14 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,90</b> |
| <b>U 66T-A</b> | 9128060  | Tumor primário | 2,16 | 2,15 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>9,20</b> |
| <b>U 68T</b>   | 9338370  | Tumor primário | 2,14 | 1,94 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>7,20</b> |
| <b>U 69T</b>   | 9350030  | Tumor primário | 2,14 | 2,15 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,70</b> |
| <b>U 70T</b>   | 9362760  | Tumor primário | 2,16 | 2,08 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>7,60</b> |
| <b>U 72T</b>   | 9371000  | Tumor primário | 2,15 | 2,13 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>7,90</b> |
| <b>U 73T</b>   | 10015520 | Tumor primário | 2,13 | 2,09 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,10</b> |
| <b>U 74T</b>   | 10089890 | Tumor primário | 2,15 | 2,03 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,70</b> |
| <b>U 75T</b>   | 10118480 | Tumor primário | 2,11 | 2,14 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>9,40</b> |
| <b>U 76T</b>   | 10134190 | Tumor primário | 2,09 | 2,11 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,60</b> |
| <b>U 79T</b>   | 10203080 | Tumor primário | 2,11 | 2,17 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,30</b> |
| <b>U 80T</b>   | 10205530 | Tumor primário | 2,12 | 2,17 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,20</b> |
| <b>U 81T</b>   | 10236580 | Tumor primário | 2,12 | 1,95 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,70</b> |
| <b>U 82T</b>   | 10312630 | Tumor primário | 2,11 | 2,14 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>9,00</b> |
| <b>U 83T</b>   | 92015468 | Tumor primário | 2,12 | 2,06 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,70</b> |
| <b>U 84T</b>   | 99048787 | Tumor primário | 2,12 | 1,95 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>8,50</b> |
| <b>U 86T</b>   | 94052654 | Tumor primário | 2,11 | 2,09 | <b>Ótimo (2:1)</b> | <b>7,60</b> |