

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS
ASSOCIADOS A VARIAÇÕES GENÉTICAS EM
LEIOMIOSSARCOMAS UTERINOS**

BEATRIZ NUNES SCHIAVON

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientador: Dra. Isabela Werneck da Cunha
Co-Orientador: Dra. Kátia Cândido Carvalho**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Schiavon, Beatriz Nunes

Caracterização de microRNAs associados a variações genéticas em leiomiossarcomas uterinos / Beatriz Nunes Schiavon – São Paulo, 2017.
82p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. Leiomiossarcoma/Leiomyosarcoma. 2. Leiomioma/Leiomyoma. 3. MicroRNAs/MicroRNAs. 4. Neoplasias uterinas/Uterine Neoplasms.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo.
Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e
fazendo novas coisas, porque somos curiosos... E a curiosidade
continua nos conduzindo por novos caminhos.” – Walt Disney

DEDICATÓRIA

À minha orientadora, Dra. Isabela Werneck da Cunha, que eu admiro e que eu tive a oportunidade de conviver. Agradeço por ter me proporcionado seguir no caminho do conhecimento. Agradeço pela confiança e pela oportunidade de realizar este estudo, por ter acreditado na minha capacidade de finalizá-lo, por ter contribuído juntamente para o meu crescimento profissional e pessoal, sempre com ética profissional, incentivo e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Isabela Werneck da Cunha, pela oportunidade em desenvolver este projeto e por apostar em minha competência profissional.

À minha co-orientadora, Kátia Cândido Carvalho, pela colaboração nesse projeto.

Aos amigos do LIM-58 da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da USP, onde parte deste projeto foi desenvolvido, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) pelo suporte, companheirismo e por todos os momentos que passamos juntos ao longo desses anos.

À Dra. Claudia Malheiros do CIPE pelo suporte técnico e científico e por toda colaboração.

À Kátia Klung do CIPE pelo auxílio na parte técnica.

À Eloisa Ribeiro do Laboratório de Biologia Molecular pelo auxílio técnico e pela positividade.

Ao Israel Tojal e ao Rodrigo Drummond do Departamento de Bioestatística do CIPE pelo suporte estatístico.

Ao Ivan Neves pela amizade e carinho e por todo o suporte emocional e profissional que sempre me deu.

À Liliane Cilento por todos os momentos de conversa e descontração ao longo desses anos.

À minha família por estarem sempre presentes e apostando em meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos que me acompanham na jornada da vida pela amizade incondicional.

À Pós-graduação, em especial à Luciana Pitombeira, à biblioteca em nome da Suely Francisco, e ao Laboratório de Patologia Investigativa do A.C.Camargo Cancer Center em nome do Carlinhos e do Severino pelo suporte e colaboração ao longo desse trabalho.

Aos membros do Departamento de Patologia Clínica por sempre me receberem com tanto carinho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

RESUMO

Schiavon BN. **Caracterização de microRNAs associados a variações genéticas em leiomiossarcomas uterinos**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: Os leiomiossarcomas correspondem a apenas 1 a 2% das neoplasias uterinas. O tratamento primário permanece cirúrgico e a quimioterapia e a radioterapia são limitadas, sem efeito sobre a sobrevivência global. Sua sarcogênese não está compreendida, assim como não está claro qual é a célula progenitora. Os leiomiomas uterinos são mais comuns, porém suas variantes são raras e representam 10% dos casos. As variantes dos leiomiomas são neoplasias benignas que morfologicamente se assemelham ao leiomiossarcoma, dificultando um diagnóstico precoce e preciso. Estudos recentes demonstram a importância de microRNAs na diferenciação de células de músculo liso, sugerindo que leiomiossarcomas são mais semelhantes às células mesenquimais humanas derivadas da medula óssea. **Objetivo:** Estabelecer um perfil de microRNA que caracterize a assinatura específica para diferenciar o leiomiossarcoma uterino do leiomioma e dos leiomioma variantes e estabelecer um perfil de microRNA que correlacione os leiomiossarcomas uterinos com os parâmetros clínico-patológicos. **Material e métodos:** As informações clínicas de pacientes com leiomiossarcoma uterino foram previamente resgatadas de prontuários médicos do A.C.Camargo Cancer Center no período de 1982 a 2010 e de 2000 a 2010 da Disciplina de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A casuística compreende um total de 37 casos de leiomiossarcoma, 8 leiomiomas variantes 3 leiomiomas e 2 miométrios. A técnica de PCR em tempo real foi realizada nas amostras e a análise dos microRNAs foi realizada por métodos de bioinformática. **Conclusão:** Um painel composto por microRNAs diferencialmente expressos encontrados nesse trabalho, miR-144-3p, -34a-

5p, let-7a-5p e -206, pode caracterizar o LMS uterino, distinguindo-o de tumores benignos e do tecido normal. Além disso, a assinatura desses 4 miRNAs identificados pode contribuir para uma melhor compreensão do mecanismo de tumorigênese e desenvolvimento do LMS uterino e também auxiliar no diagnóstico e manejo da doença.

SUMMARY

Schiavon BN. **[Characterization of microRNAs associated with genetic variations in uterine leiomyosarcomas]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introduction: Leiomyosarcomas account for only 1 to 2% of uterine neoplasms. Primary treatment remains surgical and chemotherapy and radiotherapy are limited, with no effect on overall survival. Its sarcogenesis is not understood, just as it is not clear which is the progenitor cell. Uterine leiomyomas are the most common uterine tumors; however, their variants are rare and represent 10% of the cases. Variants of leiomyomas are benign neoplasms that resemble morphologically leiomyosarcoma, making early and precise diagnosis difficult. Recent studies demonstrate the importance of microRNAs in differentiating smooth muscle cells, suggesting that leiomyosarcomas are more similar to human mesenchymal cells derived from bone marrow. **Objective:** To establish a microRNA profile that characterizes specific signature to differentiate uterine leiomyosarcoma from leiomyoma and from atypical leiomyoma and to establish a microRNA profile that correlates uterine leiomyosarcomas with clinical pathological parameters. **Material and methods:** Clinical information from patients with uterine leiomyosarcoma was previously retrieved from medical records of the A.C.Camargo Cancer Center from 1982 to 2010 and from 2000 to 2010 from the Discipline of Gynecology of Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina, of University of São Paulo (FMUSP). The casuistry comprises a total of 37 cases of leiomyosarcoma, 8 atypical leiomyomas 3 leiomyomas and 2 myometres. A real-time PCR technique was performed with and the analysis of microRNAs was performed by bioinformatics methods. **Conclusion:** A panel composed by the microRNAs differentially expressed found in this study, miR-144-3p, -34a-5p, let-7a-5p and -206, can characterize uterine LMS, distinguishing it from the benign tumors and

normal tissue. In addition, the signature of these 4 identified miRNAs may contribute to a better understanding of the mechanism of tumorigenesis and development of uterine LMS and also assist in the diagnosis and management of the disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura uterina com representação dos tumores benignos e malignos.....	2
Figura 2	Leiomioma. Corte do espécime após histectomia.....	4
Figura 3	Peça cirúrgica e corte histológico de leiomioma variante.....	7
Figura 4	Peça cirúrgica de leiomiossarcoma uterino.....	9
Figura 5	Corte histológico com tumor viável e feixes de células fusocelulares.....	9
Figura 6	Painel imunoistoquímico realizado para tumores de músculo liso.....	11
Figura 7	Esquema comparativo das três entidades tumorais do estudo.....	14
Figura 8	Biogênese do microRNA.....	24
Figura 9	Oncogênese pela desregulação de expressão de microRNAs.....	26
Figura 10	Workflow do projeto de estudo.....	31
Figura 11	Esquema do processo de síntese do cDNA.....	38
Figura 12	Placa de 96-poços.....	40

Figura 13	Esquema representativo da avaliação de alvos de miRNA.....	46
Figura 14	Heatmap da análise dos microRNAs associados às características clínico-patológicas dos leiomiossarcomas uterinos.....	55

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1	Estadiamento FIGO 2009 dos sarcomas uterinos.....	15
Tabela 1	Características clínicas das 37 pacientes com leiomiossarcoma de útero e estadiamento tumoral.....	34
Tabela 2	Componentes da reação de Transcriptase Reversa.....	37
Tabela 3	Componentes para a reação de Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays.....	41
Tabela 4	Condições de Ciclagem para PCR em Tempo Real.....	42
Tabela 5	Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma.....	48
Tabela 6	Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e miométrio.....	49
Tabela 7	Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma variante.....	50
Tabela 8	Comparação de microRNAs expressos diferencialmente entre amostras de leiomiomas variantes e miométrio.....	51
Tabela 9	Comparação de microRNAs expressos diferencialmente entre amostras de variantes de leiomiomas variantes e leiomiomas.....	52

Tabela 10	Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre LMS uterino e amostras de leiomioma variante juntamente com leiomioma.....	53
Tabela 11	Quantidade de microRNAs hiper e hipoexpresso nos grupos tumorais em cada análise realizada.....	53
Tabela 12	Dados das características clínico-patológicas de pacientes com LMS.....	54
Tabela 13	microRNAs diferencialmente expressos nas análises comparativas, exceto os miRNAs da análise com os parâmetros clínico-patológicos, pois não houve correlação, e os genes alvos regulados.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABI	Applied Biosystem
cDNA	DNA complementar
Ct	threshold-cycle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EMA	Antígenos de membrana epitelial
ESS	Sarcoma do Estroma Endometrial (do inglês <i>Endometrial Stromal Sarcoma</i>)
FC	<i>Fold Change</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FM	Figura Mitótica
HMGA2	<i>High-mobility-group AT-hook</i>
HPF	<i>High Power Field</i>
Ki-67	Proteína Nuclear Associada à Proliferação Celular
LM	Leiomioma
LMS	Leiomiossarcoma
LMV	Leiomioma variante
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
miRNA	microRNA
MM	Miométrio
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
p53	Proteína Citoplasmática de Massa Molecular 53 kDa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET-CT	Tomografia computadorizada por emissão de pósitron
PTEN	Gene Fosfatase Homóloga a Tensina (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>

RA	Receptor Androgênico
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RE	Receptor de Estrogênio
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RP	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido Ribonucléico
TF	<i>Transcription Factor</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores de Corpo Uterino	1
1.2	Leiomiomas e Leiomiomas Variantes	3
1.2.1	Características Clínicas	6
1.2.2	Características Patológicas	6
1.3	Leiomiossarcoma Uterino	7
1.3.1	Sintomas.....	10
1.3.2	Perfil Molecular	10
1.3.2.1	Características Moleculares do LMS com relação aos LMV e LM	13
1.3.3	Características Clínico Patológicas	14
1.3.4	Estadiamento Clínico.....	15
1.3.5	Prognóstico e Tratamento	16
1.3.6	Diagnóstico por Imagem.....	17
1.4	miCrona.....	18
1.4.1	Biogênese do microRNA	21
1.4.2	microRNA e Câncer.....	26
1.4.3	microRNA como Alvo Terapêutico.....	28
1.4.4	microRNAs em tumores mesenquimais uterinos	29
1.5	Justificativa	29
2	OBJETIVOS	30
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	Delineamento do Projeto e Aspectos Éticos.....	31
3.2	Pacientes.....	32
3.3	Descrição da Casuística	32
3.4	Características Clínicas das Pacientes	33
3.5	Extração de RNA Total	35
3.5.1	Quantificação da amostra obtida	36

3.6	Síntese de cDNA – Transcrição Reversa	37
3.7	Real-Time PCR para Análise do Perfil de Expressão do miRNA Maduro	41
3.8	Análise do Perfil de Expressão do miRNA Maduro	43
3.9	Análise Estatística	45
3.10	Busca de Genes Alvos por Análise <i>in Silico</i>	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMS em Relação a LM.....	47
4.2	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMS em Relação a MM.....	48
4.3	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMS em Relação aos LMV	49
4.4	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMV em Relação a MM.....	50
4.5	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMV em Relação a LM.....	51
4.6	Comparação entre o Perfil de Microrna de LMS em Relação a LM e LMV	52
4.7	Comparação entre o Perfil de Expressão de MIRNA do LMS e suas Características Clínico-Patológicas	54
4.8	Análise <i>in Silico</i> de Predição de Alvos.....	57
5	DISCUSSÃO	58
5.1	miR-34a-5p.....	60
5.2	miR-372-3p.....	62
5.3	let-7	63
5.4	miR-135b-5p.....	64
5.5	miR-144-3p.....	64
5.6	miR-122	65
5.7	miR-206	66
5.8	LMS e Características Clínico-Patológicas	67
5.9	Análise <i>in Silico</i> de Predição de Alvos.....	67
5.10	Considerações Finais	68
6	CONCLUSÃO	71

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	72
----------	---	-----------

ANEXOS

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

APÊNDICES

Apêndice 1 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma

Apêndice 2 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e miométrio

Apêndice 3 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma variante

Apêndice 4 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomioma variante e miométrio

Apêndice 5 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomioma variante e leiomioma

Apêndice 6 Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino juntamente com o leiomioma e o leiomioma variante

1 INTRODUÇÃO

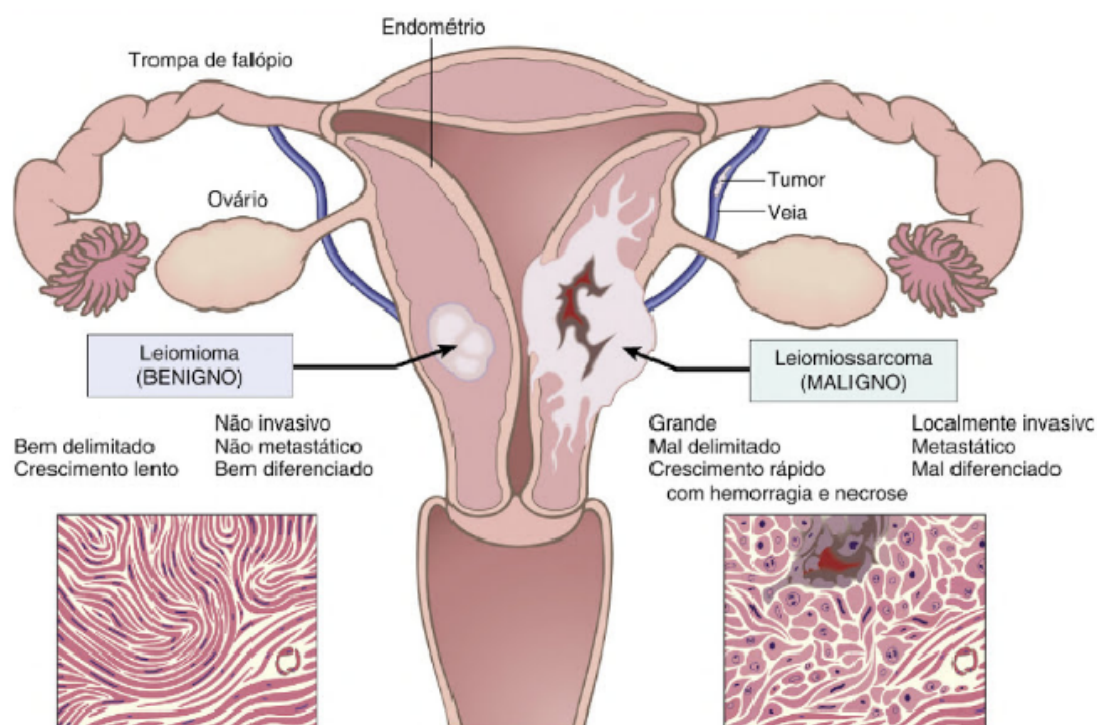
1.1 TUMORES DE CORPO UTERINO

O corpo uterino consiste em duas camadas principais de tecido: o miométrio, a camada externa de músculo liso e o endométrio, uma camada interna composta pelo epitélio do endométrio glandular com estroma de base. Ambas as camadas sofrem alterações de cunho hormonal ao longo da vida – o miométrio especialmente durante a gravidez e o endométrio mensalmente. Essas duas camadas são frequentemente alvo de mudanças que representam a maior parte dos tumores ginecológicos. Dependendo da camada, cujas células são transformadas, os tumores malignos do corpo uterino podem ser divididos em dois grupos principais: tumores endometriais e tumores mesenquimais (BRANY et al. 2015). Dentre o segundo grupo estão os leiomiomas (tumores mesenquimais benignos) e os leiomiossarcomas e sarcomas do estroma endometrial (Figura 1) (OLIVA 2014).

Os sarcomas uterinos são menos comuns e representam cerca de 3-7% do câncer de útero (D'ANGELO e PRAT 2010; BAIOCCHI et al. 2016). Podem ser amplamente categorizados como tumores mesenquimais malignos os sarcomas do estroma endometrial, os leiomiossarcoma (LMS), e tumores mistos estromais/epiteliais (variantes de carcinomas) (NOVETSKY e POWELL 2013). Esses tumores apresentam pior

prognóstico. No passado, o problema com a classificação tumoral mesenquimal, bem como quanto ao tratamento terapêutico, foram causados pela sua heterogeneidade e ocorrência rara, apresentando frequentemente um diagnóstico desafiador (BRANY et al. 2015; MCCLUGGAGE 2016). Atualmente, existem muito poucos biomarcadores que são úteis em sua distinção diagnóstica (KOWALEWSKA et al. 2013).

O patologista tem o importante papel de fazer o diagnóstico, especialmente nos casos difíceis. Apesar das marcações imunoistoquímicas serem favoráveis ao estabelecimento de um diagnóstico final, as características morfológicas superam todas as outras técnicas auxiliares para esse grupo de neoplasias (SANGLE e LELE 2011).



Fonte: Adaptado de <http://aftercervicalcancer.blogspot.com.br> (2014).

Figura 1 - Estrutura uterina com representação dos tumores benignos e malignos.

Os sarcomas uterinos estão entre as malignidades uterinas mais letais com pior prognóstico considerando todas as doenças malignas ginecológicas; a taxa de sobrevida de 5 anos é inferior a 50% para o estadio I e menos de 30% para os estadios restantes (KOWALEWSKA et al. 2013; MAJOR et al. 1993). A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) de 2009, diferencia o estadiamento de leiomiossarcoma (LMS), sarcomas de estroma endometrial (ESSs) e adenossarcomas (PRAT 2009; NOVETSKY e POWELL 2013).

1.2 LEIOMIOMAS E LEIOMIOMAS VARIANTES

Os leiomiomas (LM) são tumores mesenquimais de músculo liso, benignos. São os tumores uterinos mais comuns e afetam com mais frequência mulheres entre a quarta e quinta década de vida. Apresentam diversas características morfológicas, possuindo algumas variantes distintas. Geralmente são intramurais, bem delimitados e de consistência fibrosa (Figura 2) (KURMAN et al. 2014).



Fonte: Retirado de KURMAN et al. (2014).

Figura 2 - Leiomioma. Corte do espécime após histectomia.

Leiomiomas podem apresentar padrões de crescimento incomuns, tais como leiomioma parasita, leiomiomatose peritoneal disseminada e leiomioma benigno metastatizante, mas como são leiomiomas histologicamente semelhantes aos leiomiomas convencionais, não são categorizados como variantes. No entanto, podem ser difíceis para um radiologista distinguí-los de um tumor agressivo, em particular os que envolvem a cavidade peritoneal e os pulmões (COHEN et al. 2007; ARLEO et al. 2015).

Alguns leiomiomas possuem características morfológicas pouco frequentes, por isso podem ser alvo de grande dificuldade diagnóstica como, por exemplo, intensa atipia celular (leiomiomas bizarros), alta celularidade (leiomiomas celulares) e alto índice mitótico (leiomiomas mitoticamente ativos). Apesar de apresentarem comportamento benigno, estas variantes possuem algumas características morfológicas semelhantes aos dos

leiomiossarcomas. Tais variantes morfológicas são consideradas leiomiomas variantes (COHEN et al. 2007; ARLEO et al. 2015).

Embora seja incomum, uma mulher com uma massa uterina que se supõe ser um mioma pode ser, na realidade, um leiomiossarcoma ou uma variante de leiomioma (estimado em 1 a cada 100 casos) observados na análise patológica. Assim, o diagnóstico de uma variante não pode ser feito com certeza até que um patologista avalie completamente o tumor removido cirurgicamente (ARLEO et al. 2015). No entanto, em grande maioria, as variantes do leiomioma se comportam de forma clinicamente benigna e não requerem terapia adjuvante (KURMAN et al. 2014). Apesar disso, devido à sua raridade, não há diretrizes clínicas bem definidas para o clínico seguir. Estudos sugerem que leiomiomas variantes possam ter um risco maior de recorrência (GUNTUPALLI et al. 2009; LY et al. 2013), porém, não há critérios padrões para monitorar pacientes com estas variantes morfológicas. Na literatura disponível, não há recomendação de uma vigilância adicional de pacientes submetidas a histerectomia após apresentarem um leiomioma variante (ARLEO et al. 2015).

Para as pacientes submetidas apenas a miomectomia e que se encontram com leiomioma variante e desejam manter seu útero, a ultrassonografia pélvica ou a ressonância magnética, preferencialmente, devem ser incorporadas ao seguimento de controle do útero. A utilização do PET-CT para diferenciar leiomiomas convencionais, leiomiomas variantes e leiomiossarcomas permanece limitada (ARLEO et al. 2015). Atualmente, desenvolvimentos de técnicas a nível molecular contribuem, tanto no

diagnóstico quanto no prognóstico, para uma maior compreensão da história natural dos leiomiomas e suas variantes, bem como sua classificação (MEHINE et al. 2013; ZHANG et al. 2014).

1.2.1 Características Clínicas

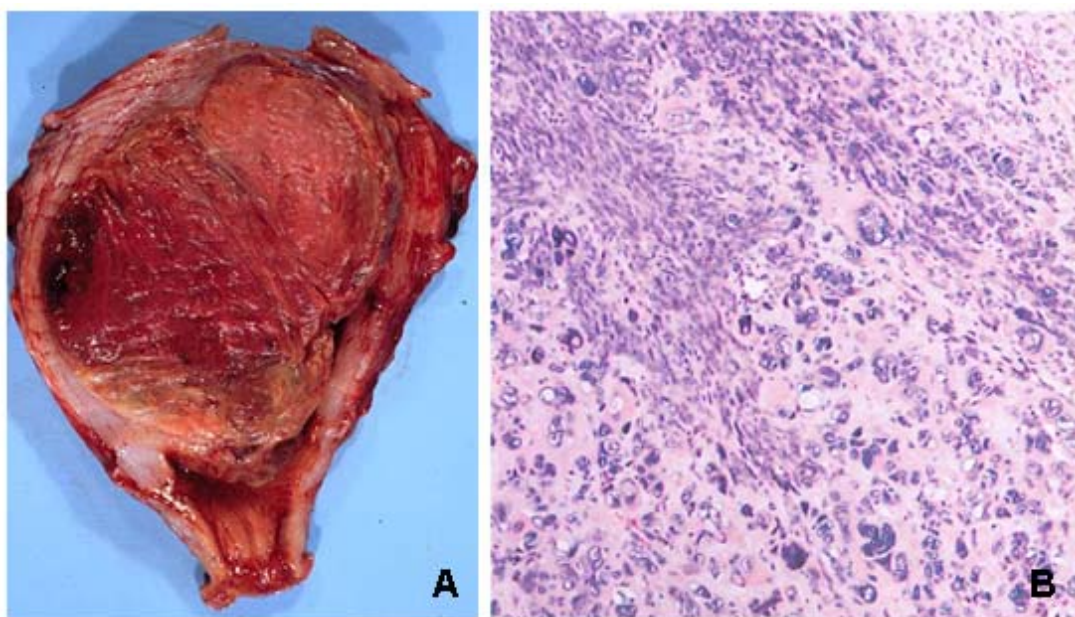
A maioria das pacientes são assintomáticas, mas um terço apresenta menorragia, dor ou compressão pélvica. Os sintomas estão relacionados com a quantidade, tamanho e localização dos tumores. Outras características clínicas menos comuns incluem ascite, eritrocitose secundária a produção de eritropoetina do tumor, leiomiomatose peritoneal disseminada coexistente e leiomiomatose hereditária. A massa tumoral é clinicamente acompanhada e em alguns casos é realizada a ressecção cirúrgica, miomectomia ou histerectomia (KURMAN et al. 2014).

1.2.2 Características Patológicas

Na análise patológica (macroscópica), os leiomiomas uterinos são circunscritos com textura firme “emborrachada” e superfície de corte protuberante; são geralmente brancos, mas se houver a degeneração, a cor (vermelho, marrom ou amarelo) e a textura (edemaciada, “carnuda” ou necrótica) podem ser diferentes (Figura 3A) (ARLEO et al. 2015).

Histologicamente, os leiomiomas são compostos por fascículos de células do músculo liso alongadas com citoplasma eosinofílico e um núcleo em forma de charuto situado centralmente (Figura 3B) (ARLEO et al. 2015). Os casos de LMV exigem uma avaliação detalhada de múltiplas variáveis

histológicas - incluindo mitoses, atipia e necrose tumoral, e o diagnóstico atualmente está limitado apenas a características histológicas (ZHANG et al. 2014).



Fonte: A. Retirado de Liga de Patologia (2011). B. Retirado de KURMAN et al. (2014).

Figura 3 - Peça cirúrgica e corte histológico de leiomioma bizarro. A. Leiomioma variante após histerectomia com degeneração hemorrágica. B. Corte histológico de leiomioma de núcleo bizzaro.

1.3 LEIOMIOSSARCOMA UTERINO

O leiomiossarcoma é um tumor mesenquimal raro que pode afetar o útero. É um tumor maligno de músculo liso (Figura 4), mais comumente exibindo uma morfologia com presença de hiper celularidade, necrose, mitose, feixes musculares entrecortados formado por células fusiformes (Figura 5). É o sarcoma uterino mais comum, representando 1-2% de todas as malignidades uterinas e uma incidência de 0,3-0,4/100 mil mulheres por

ano. Há um aumento da incidência associado à terapia com tamoxifeno em câncer de mama, mas, em geral, a maioria ocorre em mulheres com mais de 50 anos (KURMAN et al. 2014).

Este tumor é diagnosticado histologicamente após miomectomia ou histerectomia, porém nem sempre é diagnosticado precocemente (SERRANO e GEORGE 2013; GOCKLEY et al. 2014). Mesmo quando diagnosticado no estágio inicial e confinado ao útero, este tumor apresenta um desfecho muito ruim e altas taxas de recorrência, principalmente à distância (RAUH-HAIN et al. 2013). As metástases em linfonodos, por outro lado são raras (NOVETSKY e POWELL 2013).

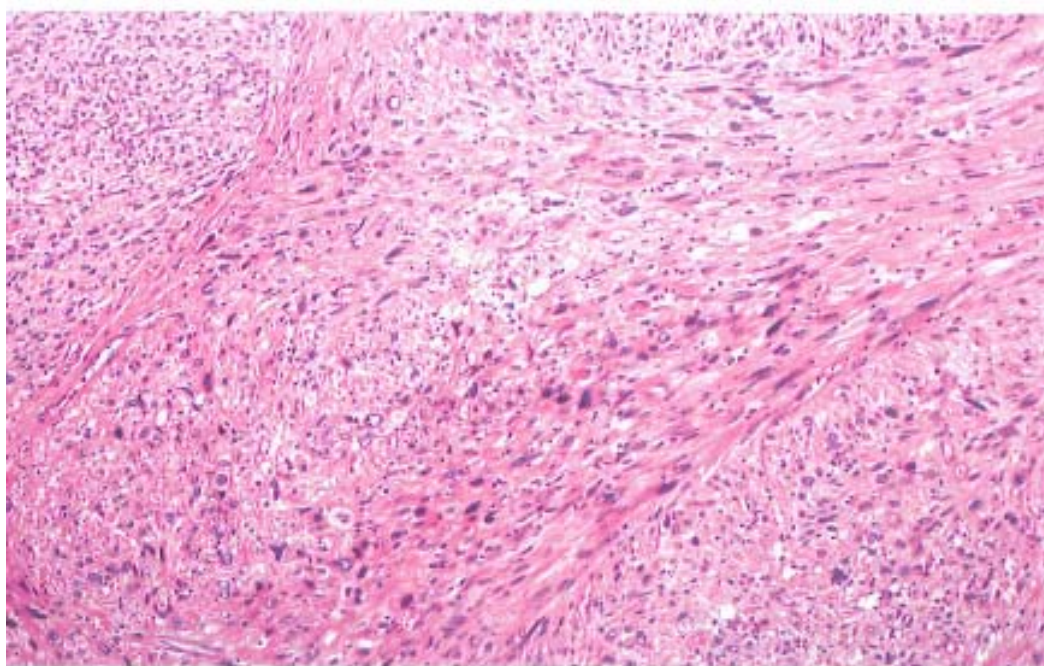
Dada a agressividade do tumor, o tratamento principal é a histerectomia total. Além disso, a quimioterapia adjuvante e a radioterapia são utilizadas para melhorar o tratamento, mas não conseguiram melhorar a sobrevida livre de doença (SERRANO e GEORGE 2013; RAUH-HAIN et al. 2013; GOCKLEY et al. 2014).

Embora o comportamento agressivo da maioria dos casos seja bem reconhecido, sua raridade e sua diversidade histopatológica contribuíram para a falta de consenso sobre os fatores de risco para resultados ruins e tratamento adequado (D'ANGELO e PRAT 2010).



Fonte: Retirado de KURMAN et al. (2014).

Figura 4 - Peça cirúrgica de leiomiossarcoma uterino.



Fonte: KURMAN et al. (2014).

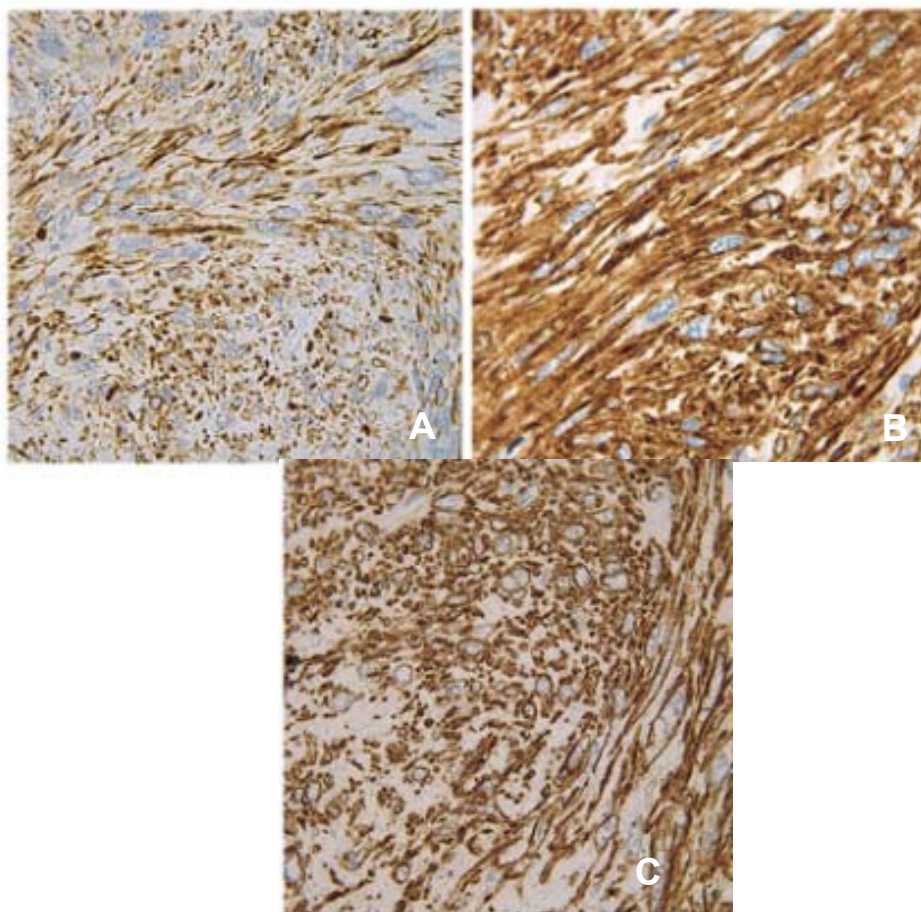
Figura 5 - Corte histológico com tumor viável e feixes de células fusocelulares.

1.3.1 Sintomas

Os principais sintomas geralmente são hemorragia vaginal anormal (56%), massa pélvica palpável (54%) e dor pélvica (22%). Os sinais e sintomas se assemelham aos do leiomioma que é o mais comumente diagnosticado e a distinção pré-operatória entre os dois tumores pode ser difícil. No entanto, a malignidade deve ser suspeitada pela presença de certos comportamentos clínicos, como o crescimento rápido da massa uterina em mulheres na menopausa que não estão em terapia de reposição hormonal (PERRI et al. 2009). Ocasionalmente, as manifestações apresentadas estão relacionadas à ruptura do tumor (hemoperitônio), extensão extrauterina ou metástases (D'ANGELO e PRAT 2010).

1.3.2 Perfil Molecular

Os leiomiossarcomas são frequentemente imunorreativos para desmina, caldesmon e actina de músculo liso e eventualmente marcadores epiteliais, incluindo queratina e antígenos de membrana epitelial (EMA) (Figura 6) (ABELER e NENODOVIC 2011), no entanto, a imuno-histoquímica não é de grande valia para auxiliar no diagnóstico.



Fonte: Adaptado de ABELER e NENODOVIC (2011).

Figura 6 - Painel imunoistoquímico realizado para tumores de músculo liso.

A. Desmina. B. H-caldesmon. C. Actina de músculo liso.

Alguns estudos mostraram um aumento estatisticamente significativo de Ki-67 em leiomiossarcomas uterinos em comparação com tumores de músculo liso benignos (ENGIN et al. 2005; CHEN e YANG 2008). Expressam ainda receptores de estrogênio, receptores de progesterona e receptores androgênicos em 30 a 40% dos casos (D'ANGELO e PRAT 2010; SERRANO e GEORGE 2013).

A mutação e a expressão proteica de p53 foram descritas em uma minoria de leiomiossarcomas uterinos (25-47%), mas não em leiomiomas (ENGIN et al. 2005; CHEN e YANG 2008). Alteração na expressão proteica de p16 foi descrita em leiomiossarcomas uterinos (CHEN e YANG 2008; D'ANGELO e PRAT 2010).

Um estudo relatou que pacientes com mutações germinativas em fumarato hidratase apresentam maior risco de desenvolver leiomiossarcomas uterinos, bem como leiomiomas uterinos (LEHTONEN et al. 2006), uma vez que a proteína com função de supressão tumoral favorece a tumorigênese, quando alterada.

A grande maioria dos leiomiossarcomas uterinos são esporádicos e os mecanismos oncogênicos subjacentes ao desenvolvimento dessa doença permanecem desconhecidos. No geral, o leiomiosarcoma uterino é um tumor geneticamente instável que demonstra anormalidades cromossômicas estruturais complexas e regulação de genes altamente perturbada, o que provavelmente reflete o estado final de acúmulo de múltiplos defeitos genéticos (D'ANGELO e PRAT 2010).

As técnicas padrão de cariotipagem e hibridização *in situ* fluorescente mostraram que as alterações citogenéticas e moleculares em leiomiossarcomas são complexas e não há aberrações consistentes e recorrentes mostradas a nível cromossômico (SERRANO e GEORGE 2013).

1.3.2.1 Características Moleculares do LMS com relação aos LMV e LM

Alguns estudos MITTAL et al. (2009) e ZHANG et al. (2014) têm discutido o desenvolvimento do leiomiossarcoma uterino a partir de um leiomioma variante pré-existente, uma vez que o leiomiossarcoma é considerado de surgimento *de novo* e as características histológicas entre os dois tumores possuem algumas semelhanças (Figura 7). Além disso, ZHANG et al. (2014) mencionaram que o LMS e o leiomioma bizarros (uma das variantes de leiomioma) compartilham padrões de expressão gênica, bem como mutações genéticas similares, e que LMS e leiomioma bizarros estão mais próximos uns dos outros do que as outras variantes, sugerindo que eles estão também mais geneticamente relacionados; os autores ainda mostraram que o nível e a frequência de alterações moleculares específicas nos leiomiomas variantes tendem a estar mais intimamente relacionadas ao LMS ao invés do LM. Por exemplo, as variantes compartilham com o LMS uma frequência similar de mutações genéticas selecionadas, incluindo *P53*, *MED12* e *PTEN*, mas não com o LM.

As médias das idades das pacientes no diagnóstico de leiomiomas variantes e LMS giram em torno de 41 e 55 anos, respectivamente, com isso, ZHANG et al. 2014 sugerem a existência de relações temporais possíveis entre as variantes e os LMS. LY et al. (2013) propõem que a diferença de idade encontrada nas pacientes com as variantes e com LMS pode ser compatível com os achados de tumores em outros órgãos, onde 10-15 anos devem se passar do pré-câncer para um carcinoma invasivo. No

entanto, os mecanismos de desenvolvimento desses tumores ainda não são devidamente conhecidos e não foram elucidados.

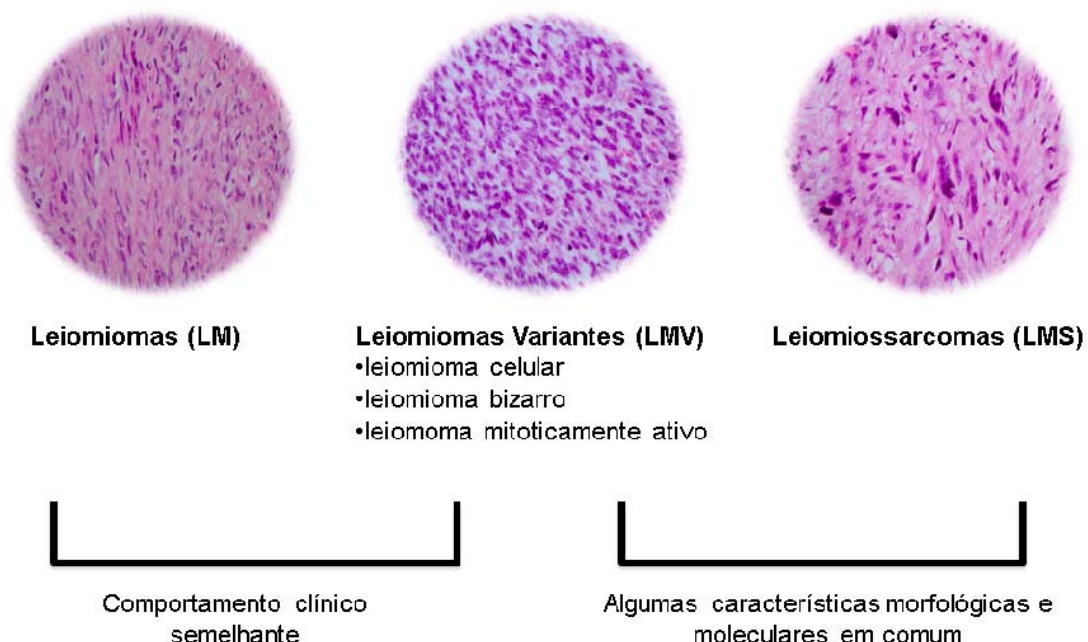


Figura 7 - Esquema comparativo das três entidades tumorais do estudo.

1.3.3 Características Clínico Patológicas

O diagnóstico de leiomiossarcoma uterino deve incluir pelo menos 2 dos 3 critérios seguintes: atipia nuclear difusa, aumento da taxa mitótica e necrose coagulativa. O diagnóstico diferencial com entidades benignas ou limítrofes (leiomioma variantes) é desafiador (SERRANO e GEORGE 2013).

O diagnóstico histopatológico de leiomiossarcoma uterino é geralmente direto, uma vez que a maioria dos tumores do músculo liso clinicamente malignos do útero mostram a “constelação” microscópica de hipercelularidade, atipia nuclear grave e alta taxa mitótica geralmente superior a 15 figuras mitóticas por 10 campos de grande aumento

(D'ANGELO e PRAT 2010). No estágio inicial, o tamanho do tumor e o número de mitoses estão associados à sobrevida. Em contraste com o estágio tardio, apenas a contagem mitótica está associada à sobrevida (RAUH-HAIN et al. 2013).

Uma ou mais características clínico patológicas como idade perimenopausa ou pós-menopausa, extensão extrauterina, tamanho aumentado (mais de 10 cm), borda infiltrada, necrose e figuras mitóticas atípicas estão frequentemente presentes (D'ANGELO e PRAT 2010).

1.3.4 Estadiamento Clínico

Em 2009, a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) desenvolveu um sistema único de estadiamento para sarcomas uterinos (Quadro 1).

Quadro 1 – Estadiamento FIGO 2009 dos sarcomas uterinos.

Estadio	Definição
I	Tumor limitado ao útero
IA	≤ 5 cm
IB	> 5 cm
II	Tumor além dos limites do útero, mas dentro da pélvis
IIA	Envolvimento de regiões anexas
IIB	Envolvimento de outros tecidos pélvicos
III	Invasão tumoral dos tecidos abdominais
IIIA	1 sítio metastático
IIIB	Mais de 1 sítio metastático
IV	
IVA	Invasão tumoral da bexiga e/ou do reto
IVB	Metástases à distância

Fonte: Adaptado de D'ANGELO e PRAT (2010) e GOCKLEY et al. (2014).

O tamanho do tumor superior a 5 cm parece ser um indicador prognóstico importante e foi incorporado a FIGO de 2009 para o leiomiossarcoma uterino (IP e CHEUNG 2011).

1.3.5 Prognóstico e Tratamento

Esse tipo tumoral apresenta comportamento agressivo, com altas taxas de recorrência (50-80%) em 2 anos (BAIOCCHI et al. 2016), mesmo quando confinado ao útero no momento do diagnóstico (SERRANO e GEORGE 2013; GOCKLEY et al. 2014), sendo considerado um tumor de prognóstico muito ruim. É frequentemente metastático e sua disseminação ocorre por via hematogênica, promovendo a recorrência à distância (BARLIN et al. 2015).

O tratamento convencional para doença não metastática é a histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral, embora em mulheres em pré-menopausa seja considerada uma histerectomia simples sem ooforectomia. A metástase em linfonodos é bastante rara e a linfadenectomia não é considerada útil na ausência de acometimento macroscópico (NOVETSKY e POWELL 2013; SERRANO e GEORGE 2013).

Recentemente, o tratamento com gemcitabina e docetaxel parece ser uma abordagem eficaz no leiomiossarcoma com a adição de doxorrubicina em doença em estágio inicial, mostrando algum benefício. Nenhuma terapia biomolecular direcionada mostrou ter atividade significativa em sarcomas uterinos, embora o Bevacizumab, um inibidor de VEGF, em combinação

com outras quimioterapias venha sendo utilizado e demonstrado alguma ação no atraso da progressão da doença (NOVETSKY e POWELL 2013).

KELLEY et al. (2004) demonstraram que 80% dos leiomiossarcomas uterinos expressam receptores de estrogênio e progesterona, sugerindo um potencial papel das terapias hormonais.

A radioterapia tem sido utilizada no manejo dos sarcomas uterinos, mas parece ter pouco benefício no tratamento dessas neoplasias em estágio inicial, no entanto, tem sido utilizada para tentar reduzir taxas de recorrência local (NOVETSKY e POWELL 2013; RAUH-HAIN et al. 2013).

Até o momento, nenhuma estratégia de tratamento adjuvante mostrou um benefício na sobrevida, embora a cirúrgica esteja associada à sobrevida livre de progressão (PFS). A radioterapia adjuvante e a quimioterapia não são recomendadas rotineiramente (NOVETSKY e POWELL 2013; SERRANO e GEORGE 2013), pois não apresentam benefício significativo na maioria dos casos.

As diretrizes para vigilância pós-tratamento de leiomiossarcomas incluem exame físico a cada 3-4 meses por 2 anos, bem como exames de imagem do tórax, abdômen e pelve a cada 3-4 meses por 2-3 anos e a cada 6-12 meses nos 2 anos seguintes (ARLEO et al. 2015).

1.3.6 Diagnóstico por Imagem

O diagnóstico pré-operatório de sarcomas uterinos, incluindo o diagnóstico baseado em imagens, é extremamente difícil porque não há características patognomônicas que permite uma distinção precisa entre

este grupo de tumores. Como os sarcomas uterinos raramente são diagnosticados no pré-operatório, o tratamento inicial geralmente é baseado em um diagnóstico pouco preciso (KOWALEWSKA et al. 2013).

As abordagens de imagem incluem ressonância magnética em tumores de partes moles e tomografia computadorizada com contraste para lesões retroperitoneais. A tomografia computadorizada no tórax e abdominal é necessária na avaliação inicial, porque a disseminação hematogênica é um evento frequente em leiomiossarcomas, e o pulmão e o fígado são dois locais comuns de metástase.

Estudos que investigam o papel da tomografia de emissão de pósitron (PET-CT) na detecção de recorrência do leiomiossarcoma mostraram que, embora o PET-CT seja sensível (85,7%) e específico (100%), não proporciona nenhuma vantagem significativa em relação à imagem convencional (SHARMA et al. 2012; GOCKLEY et al. 2014).

1.4 MICRORNA

O RNA é considerado um mensageiro que serve como modelo para a tradução de genes em proteínas. Em contraste, as moléculas de RNA funcionais ou não codificantes são transcritas a partir de uma sequência de DNA, mas não traduzidas em proteínas. A sequência de DNA codificante é frequentemente referida como um gene de RNA. Os genes de RNA funcionais no genoma humano incluem RNA transportador (tRNA), RNA ribossômico (rRNA) e vários outros pequenos RNAs não codificantes.

Milhares de genes em nosso genoma (aproximadamente 25mil genes) codificam moléculas de RNA funcionais pequenas, convencionalmente chamadas de microRNAs (miRNAs) (SASSEN et al. 2008).

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, não codificantes que regulam negativamente a expressão gênica a nível pós-transcricional e podem funcionar como indutores da tradução dos mRNAs codificantes (KOWALEWSKA et al. 2013). Em geral, os miRNAs se ligam a 3'-UTR do seu mRNA alvo através de reconhecimento por sequência guiada para desencadear degradação de mRNA ou repressão da tradução (CALIN et al. 2004a; LU et al. 2005).

Os miRNAs estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos normais e patológicos. São os principais atores na regulação da carcinogênese, onde os mesmo miRNAs podem desempenhar um papel de indutores de tumor (os chamados oncomirs) ou supressores (BERNSTEIN et al. 2003). A acumulação de informações na expressão de miRNA em diferentes tipos tumorais aponta para os miRNAs como marcadores preditivos, prognósticos e preditivos putativos (SASSEN et al. 2008).

miRNAs são responsáveis por coordenar diversas redes gênicas regulatórias, sendo essenciais para o desenvolvimento normal dos mamíferos, manutenção de células-tronco, metabolismo, crescimento celular, interação vírus-hospedeiro, apoptose, proliferação de músculo cardíaco e esquelético e expressão gênica neuronal (BETEL et al. 2008; CREIGHTON et al. 2008). Sua importância é ainda ressaltada pela expressão ubíqua em quase todos os tipos de células e a sua conservação

evolucionária na maior parte das espécies de plantas e metazoários (BARTEL 2004; BETEL et al. 2008).

Um miRNA pode ter múltiplos mRNA alvo; da mesma forma, um mRNA pode ser regulado por múltiplos miRNAs. Demonstrou-se que cada tipo de câncer possui padrões únicos de perfis de expressão de miRNA (HUANG et al. 2015; LU et al. 2005).

A expressão de microRNA (miRNA) está sendo reconhecida como um possível mecanismo epigenético (sem alteração de sequência) na patogênese dos tumores uterinos de músculo liso. miRNAs têm sido considerados sintetizadores de linhagem celular ou tecido de origem de forma confiável e, portanto, podem ser usados para subclassificar tumores (LU et al. 2005). Os perfis de expressão de miRNA entre leiomiossarcoma e leiomioma foram mostrados como diferentes. No leiomiossarcoma uterino, foi demonstrado que está intimamente relacionado com a célula mesenquimal primitiva (totipotente), enquanto os leiomiomas são semelhantes às células maduras do músculo liso, indicando que são de fato duas entidades separadas (DANIELSON et al. 2010; IP e CHEUNG 2011).

Experimentalmente, os miRNAs são descobertos pela clonagem de todos os RNAs pequenos de um determinado tipo de tecido ou estágio de desenvolvimento e posteriormente é realizado um sequenciamento para identificar o subgrupo de pequenos RNAs que atendem aos critérios para microRNAs (LAGOS-QUINTANA et al. 2012; LIU et al. 2014).

A tecnologia de DNA *microarray* convencional foi modificada para formar *microarrays* de miRNA, permitindo a detecção de múltiplos miRNAs

simultaneamente em várias amostras (THOMSON et al. 2004; CASTOLDI et al. 2006). Paralelamente às plataformas de *microarray*, ensaios comerciais para a reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) tornaram-se disponíveis. As qRT-PCR permitem a análise de miRNAs em pequenas amostras de tecido ou mesmo células únicas (TANG et al. 2006), bem como a validação de dados de *microarrays*. Além dos miRNA maduros, esses ensaios quantitativos de RT-PCR podem ser aplicados para analisar os precursores de miRNA e os transcritos primários (JIANG et al. 2005). A hibridação *in situ* para a detecção de miRNAs maduros tornou-se possível através do uso de sondas de oligonucleotídeos de DNA de alta afinidade com bloqueio do ácido nucleico (LNA, do inglês *locked nucleic acid*) e é promissor para a aplicação em tecido humano embebido em formalina e embocado em parafina (CHO et al. 2005; SASSEN et al. 2008).

1.4.1 Biogênese do microRNA

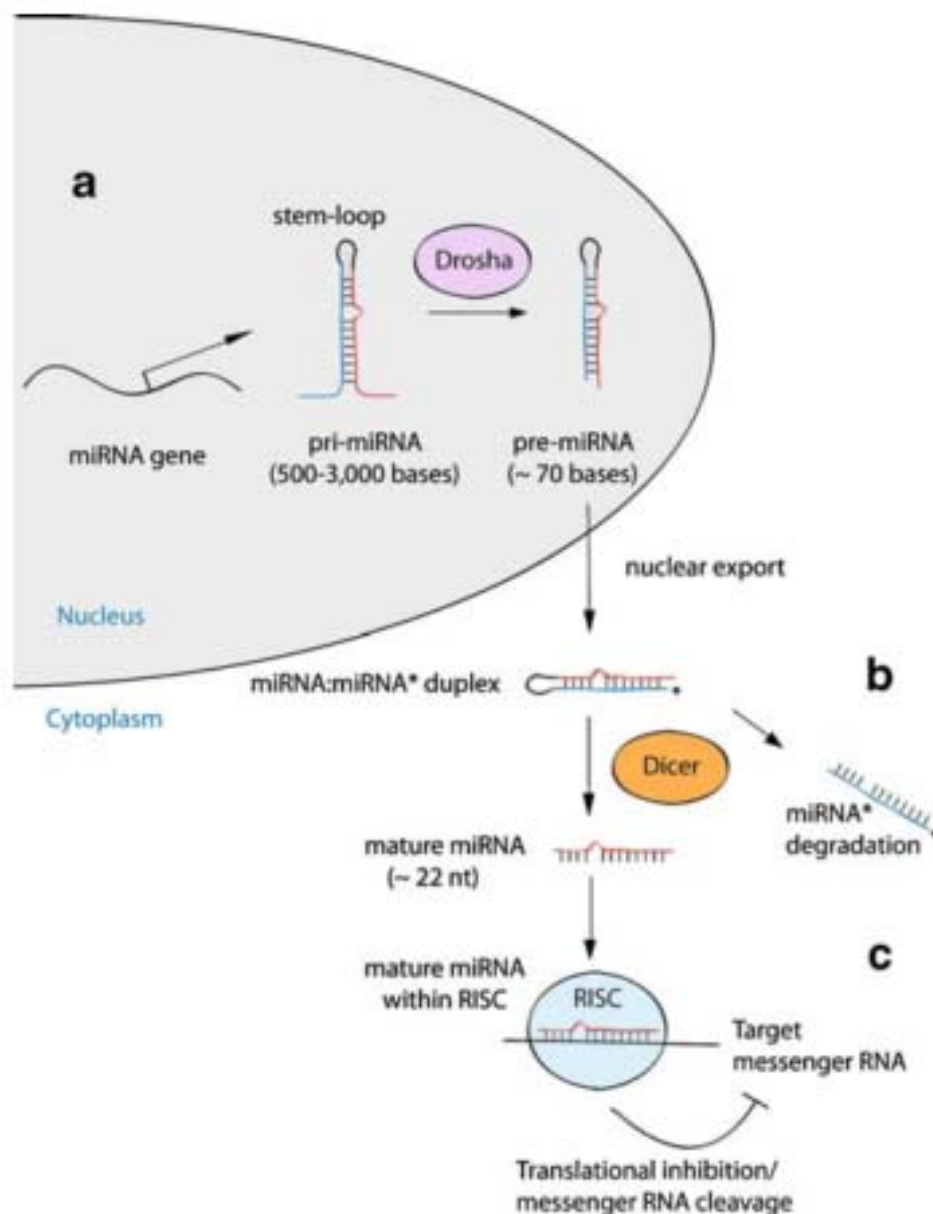
Os microRNAs são sequencialmente processados a partir de moléculas precursoras mais longas codificadas pelos genes de miRNA (BARTEL 2004).

O desenvolvimento da molécula de microRNA maduro se inicia no núcleo a partir de miRNAs primários (pri-miRNA) que são transcritos a partir de longas sequências de DNA codificadores (genes miRNA). O transcrito primário (pri-miRNA) contém uma ou mais estruturas de *stem-loop* (ou *hairpin*) de aproximadamente 70 bases (SASSEN et al. 2008). Os *stem-loop*

são estruturas de RNA de fita dupla que consistem em uma sequência de nucleotídeos que pode dobrar-se sobre si mesmo para formar uma dupla hélice com uma região de emparelhamento de base imperfeita que forma um circuito aberto na extremidade 3', que geralmente apresenta uma saliência de 2 nucleotídeos livres (STAREGA-ROSLAN et al. 2011). Ainda no núcleo, a enzima ribonuclease Drosha (enzima RNase III) cliva a estrutura *stem-loop* para formar o miRNA precursor (pré-miRNA) de cadeia dupla (Figura 8A) (LEE et al. 2003). A saliência 3' e o *stem-loop* do pré-miRNA de cadeia dupla, são elementos estruturais essenciais para serem reconhecidos pela proteína Exportin-5 (Exp-5). Em cooperação com a guanina trifosfatase (GTPase) Ran (ou RanGTP), a Exp-5 transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma independentemente da sua sequência de nucleotídeos e a presença de vários padrões estruturais (STAREGA-ROSLAN et al. 2011; YI et al. 2003). Após a exportação para o citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela ribonuclease Dicer (outra RNase III) para gerar um pequeno duplex de RNA (miRNA:miRNA*) (Figura 8B) (BERNSTEIN et al. 2003). Para se tornar funcional, o miRNA maduro de fita simples é carregado para a proteína Argonauta para compor o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), enquanto a cadeia complementar (miRNA*) geralmente é rapidamente degradada. O miRNA incorporado no RISC pode se ligar ao RNA mensageiro alvo por combinação de bases, levando a inibição da tradução e / ou degradação da proteína do RNA mensageiro alvo (Figura 8C) (ZHANG et al. 2007; STAREGA-ROSLAN et al. 2011).

Os microRNAs reconhecem seus alvos com base na complementariedade da sequência (BRENNECKE et al. 2003) e nos seres humanos, os sítios complementares estão normalmente localizados na região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro alvo. Embora as 3'-UTRs dos mRNAs sejam as regiões mais frequentes alvejadas por miRNA, os *open reading frames* (ORFs) também podem ser alvejados. A frequência e o efeito em ORF alvejado por miRNAs são menores do que a em 3'-UTR, enquanto que o alvejamento em 5'-UTR é um evento raro (HUANG et al. 2015). O miRNA maduro é parcialmente complementar a um ou mais RNAs mensageiros. O fato de que um único miRNA pode regular vários alvos e um alvo específico pode ser regulado por vários miRNAs sugere uma rede altamente complexa de interações com o miRNA alvo (SASSEN et al. 2008).

Se a complementariedade de bases entre o miRNA e seu alvo é perfeita, uma função endonucleolítica da Argonauta cliva o mRNA, levando à sua rápida destruição. A complementaridade imperfeita pode provocar a repressão da tradução ou causar instabilidade do mRNA. A repressão da tradução é possivelmente mediada por um mecanismo de neutralização.



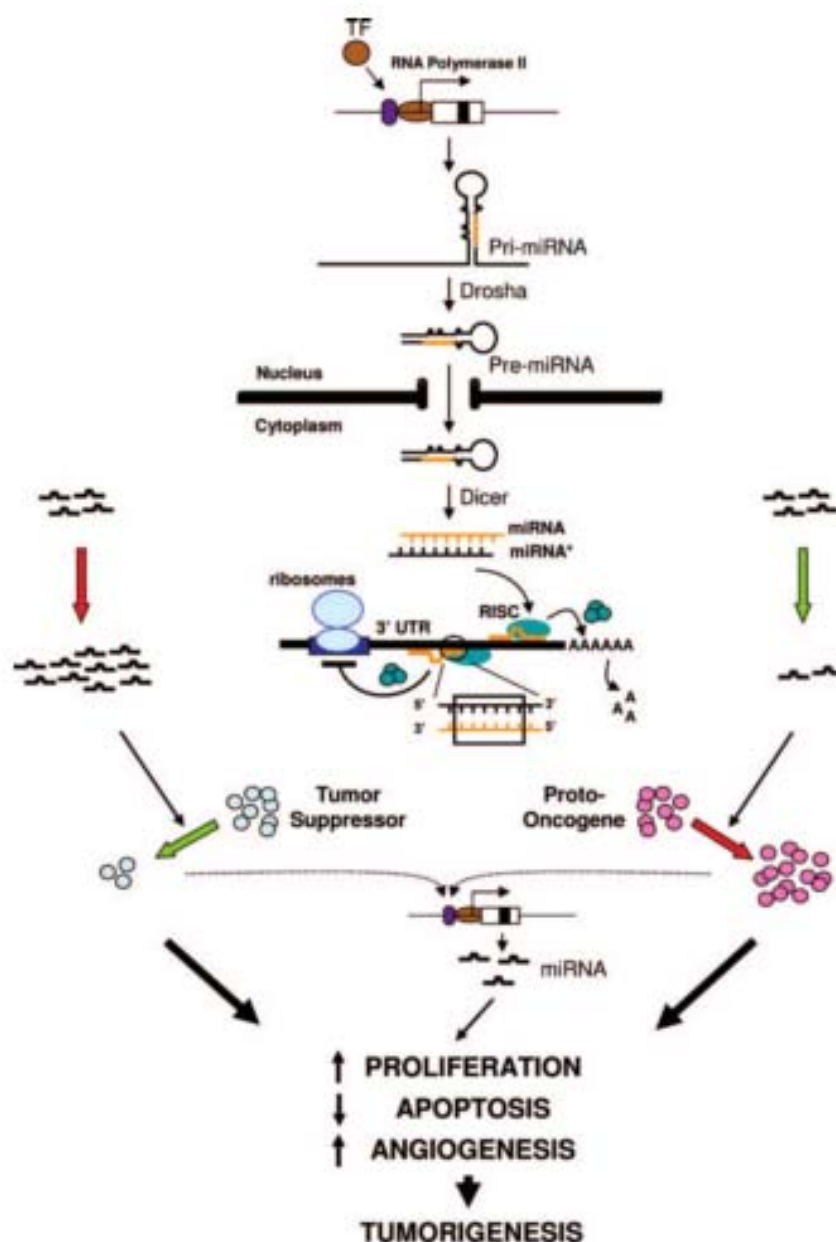
Fonte: Retirado de SASSEN et al. (2008).

Figura 8 - Biogênese do microRNA. A: Processo de transcrição que ocorre no núcleo. B: Exportação do miRNA para o citoplasma onde ocorre a clivagem. C: O miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC e poderá se ligar ao mRNA alvo.

A desregulação de miRNAs pode ocorrer na transcrição de genes de miRNA devido a uma alteração no número de cópias do gene miRNA, estado de metilação do promotor ou alterações na atividade dos fatores de transcrição (TFs) que controlam sua transcrição. Alguns desses TFs podem

ser produtos proteicos de proto-oncogenes ou de genes supressores de tumores. TFs cujas quantidades são controladas por um miRNA podem, por sua vez, controlar a produção de outros miRNAs. O miRNA também pode ser desregulado como resultado de anormalidades globais ou específicas no processamento do miRNA (ZHANG et al. 2007).

Na tumorigênese, a acumulação excessiva de um miRNA que normalmente regula a síntese de um supressor de tumor pode promover o câncer, causando a hipo-expressão do supressor de tumor (Figura 9: à esquerda). Por outro lado, a hipo-expressão de um miRNA que normalmente controla a expressão de um proto-oncogene pode levar ao excesso de acúmulo desse produto de gene (Figura 9: à direita). Os desequilíbrios nas quantidades de produtos de proto-oncogene ou supressores de tumores podem promover a proliferação celular, diminuição da apoptose e estimulação da angiogênese, o que contribui para a formação de tumores (ZHANG et al. 2007).



Fonte: Retirado de ZHANG et al. (2007).

Figura 9 - Oncogênese pela desregulação de expressão de microRNAs.

1.4.2 microRNA e Câncer

Atualmente, sabe-se que os microRNAs estão envolvidos no desenvolvimento do câncer. Foi demonstrado que os miRNAs mais antigos descobertos em *C. elegans* e na mosca de fruta *Drosophila* controlavam a proliferação celular e a apoptose (BRENNECKE et al. 2003; BARTEL 2004).

A sua desregulação pode contribuir para doenças proliferativas como o câncer. Após a descoberta dos miRNAs humanos, foi observado que muitos genes de miRNA estavam localizados em locais frágeis no genoma ou regiões que são comumente amplificadas ou deletadas no câncer humano (CALIN et al. 2004b).

Os tumores malignos e as linhagens de células tumorais apresentaram uma expressão de miRNA desregulada generalizada em relação aos tecidos normais (LU et al. 2005; CALIN e CROCE 2006) e vem sendo discutido se a alteração da expressão do miRNA observada no câncer é uma causa ou consequência da transformação maligna (SASSEN et al. 2008). SASSEN et al. (2008) mencionam ainda que miRNAs específicos podem ter um papel além do evento iniciador do tumor e participar diretamente da progressão tumoral e metástase.

Com relação ao diagnóstico, o trabalho de LU et al. (2005) questionou se os perfis globais de expressão de miRNA poderiam classificar o câncer humano e segundo o estudo, os perfis de expressão de microRNA diferenciam claramente os cânceres humanos de acordo com sua origem de desenvolvimento, ou seja, câncer de origem epitelial e hematopoiética, por exemplo, apresentam perfis distintos de miRNA.

A existência de perfis de expressão únicos de miRNA para diferentes tipos e subtipos histológicos de tumor deve ser um complemento útil na classificação de tumores que não podem ser diagnosticados com precisão por morfologia e imunofenótipo. Os miRNAs ou um subconjunto deles podem ser usados como complemento dos marcadores moleculares

presentes para a estratificação de subgrupos prognósticos (ZHANG et al. 2007).

1.4.3 microRNA como Alvo Terapêutico

Os RNAs regulatórios também podem ter aplicações terapêuticas pelas quais os miRNA promotores de doenças podem ser antagonizados ou os miRNAs funcionais restaurados. A escolha das moléculas para corrigir as interações alteradas do RNA com o miRNA mensageiro são os oligonucleotídeos de RNA. Estes oligonucleotídeos precisam ser modificados quimicamente para permitir a estabilidade na absorção no soro e na estrutura celular. Os oligonucleotídeos anti-sense modificados vêm sendo desenvolvidos para a administração na terapia genética (ZHANG et al. 2007).

Como os miRNA são frequentemente diferencialmente expressos entre tecidos normais e cancerígenos, um painel de miRNAs poderia ser usado para diferenciar entre lesões malignas e reativas quando essa distinção não pode ser determinada por métodos convencionais. Esse painel de miRNAs também poderia ser útil para discriminar tumores de diferentes origens histogênicas ou entre subtipos histológicos de um determinado tipo de tumor. Diante disso, os miRNAs podem ser úteis como biomarcadores prognósticos (ZHANG et al. 2007).

Os microRNAs podem regular os níveis de mRNA dos seus alvos e o silenciamento farmacológico desses miRNAs usando antagomirs pode levar à regulação de muitos mRNA (KRÜTZFELDT et al. 2005).

1.4.4 microRNAs em tumores mesenquimais uterinos

Atualmente têm sido demonstrada a importância de miRNAs na diferenciação de células de músculo liso em tumores mesenquimais uterinos. Assinaturas de miRNA de tumores uterinos de músculo liso sugerem que leiomiossarcomas são mais semelhantes às células mesenquimais humanas derivadas da medula óssea, enquanto leiomiomas são agrupados separadamente e parecem estar relacionados com células de músculo liso mais maduras e com o miométrio. Se as células de leiomiossarcoma derivam do bloqueio de diferenciação de células progenitoras de músculo liso ou da desdiferenciação de células lisas maduras ainda não foi esclarecido (DANIELSON et al 2010). BARLIN et al. (2015) relataram que o perfil de microRNA suporta vias de transformação divergentes do tecido normal ao leiomioma ou LMS, com LMS sendo filogeneticamente mais parecido com células tronco mesenquimais.

1.5 JUSTIFICATIVA

A literatura em leiomiossarcoma uterino, bem como a das variantes de leiomioma, é bastante escassa. A raridade de informações biológicas nestes tipos tumorais leva à necessidade de identificar a expressão de moléculas, como microRNAs na atuação de vias reguladas por mRNAs-alvo que possam contribuir para o melhor conhecimento da biologia deste tumor.

2 OBJETIVOS

Identificar e caracterizar microRNAs e seus padrões de expressão em leiomiossarcomas uterinos.

Estabelecer um perfil de microRNA que caracterize uma assinatura específica para diferenciar os leiomiossarcomas uterinos dos leiomiomas convencionais e dos leiomiomas variantes.

Buscar um perfil de microRNA que correlacione os leiomiossarcomas uterinos aos parâmetros clínico-patológicos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO PROJETO E ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, com utilização de amostras de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE).

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética do A.C.Camargo Cancer Center e encontra-se aprovado sob o número 1816/13 (Anexo 1).

O delineamento resumido do estudo pode ser visualizado na Figura 10.

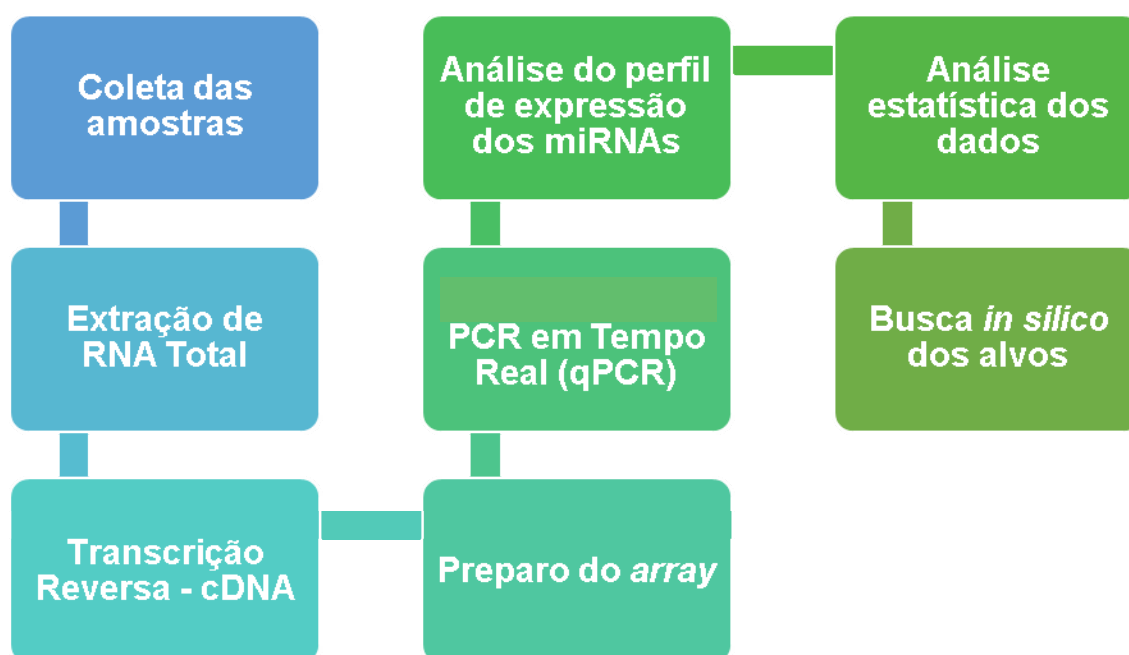


Figura 10 - Workflow do projeto de estudo.

3.2 PACIENTES

As informações do quadro clínico inicial, do tratamento e do seguimento, quando disponível, das mulheres diagnosticadas com leiomiossarcoma de útero entre 1982 a 2010 e entre 2000 a 2010 foram obtidas no A.C.Camargo Cancer Center e na Disciplina de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), respectivamente, a partir da análise retrospectiva dos prontuários médicos.

Os critérios de inclusão foram pacientes com leiomiossarcoma uterino, que foram acompanhadas nos dois centros citados e que possuíam material anatomopatológico disponível para estudo. Os critérios de exclusão foram pacientes que não tinham informação clínica e nem material anatomopatológico disponível.

Os casos foram resgatados do arquivo de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, para estudos prévios do mesmo grupo, e da Disciplina de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), revistos por dois patologistas (Isabela Werneck da Cunha e Roberto Falzoni) e reclassificados, quando necessário.

3.3 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Cinquenta e seis casos com diagnóstico confirmado de leiomiossarcoma uterino procedentes do A.C.Camargo Cancer Center e da

Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FMUSP foram incluídos neste estudo.

Após a realização das extrações de RNA, 19 amostras de leiomiossarcoma uterino foram excluídas do estudo devido a limitações no material anatomopatológico que inviabilizaram a quantificação adequada para análises posteriores, totalizando assim, 37 casos de leiomiossarcomas uterinos incluídos para a realização desse trabalho.

Como amostra referência, para as análises de qRT-PCR, foram incluídas 2 amostras de miométrio normal. Para fins comparativos, foram incluídos 3 leiomiomas convencionais e 8 amostras de leiomiomas variantes, totalizando, assim 50 amostras.

3.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES

A mediana de idade das pacientes com LMS uterino do ACCCC foi de 50 anos, variando entre 35 e 84 anos e da FMUSP-HC foi de 59 anos, variando de 32 a 91 anos. Os principais sintomas relatados foram dor pélvica e/ou abdominal em 13 (35,1%) pacientes e sangramento vaginal em 14 (37,9%). Mais da metade das pacientes (59,5%) apresentaram metástase à distância. Por ser um tumor inicialmente tratado com cirurgia, não é realizada quimioterapia neoadjuvante, porém, como tratamento adjuvante, 14 (37,9%) pacientes foram submetidas a protocolos de quimioterapia e 16 (43,2%) foram encaminhadas para a radioterapia. A maior parte das pacientes foi a óbito (75,7%).

Com relação ao estadiamento FIGO 2009, 16 (43,2%) casos eram de estágio I, 11 (29,8%) estágio II, 4 (10,8%) estágio III e 6 (16,2%) estágio IV.

Os dados podem ser melhor visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas das 37 pacientes com leiomiossarcoma de útero e estadiamento tumoral.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	N (%)
Menopausa	Sim	17 (46)
	Não	18 (48,6)
	Não especificado	2 (5,4)
Sintomas iniciais	Assintomático	2 (5,4)
	Dor pélvica e/ou abdominal	13 (35,1)
	Sangramento vaginal	14 (37,9)
	Corrimento vaginal	1 (2,7)
	Massa pélvica	4 (10,8)
	Hipermenorragia	1 (2,7)
	Não especificado	2 (5,4)
Metástase	Distância	22 (59,5)
	Pélvica	1 (2,7)
	Pélvica + distância	2 (5,4)
	Sem metástase	4 (10,8)
	Não especificado	8 (21,6)
Tratamento Adjuvante	Quimioterapia	14 (37,9)
	Radioterapia	16 (43,2)
	QT + RT	2 (5,4)
	Não especificado	5 (13,5)
Óbito	Sim	28 (75,7)
	Não	5 (13,5)
	Perda de segmento	4 (10,8)
Estadiamento FIGO 2009	I	16 (43,2)
	II	11 (29,8)
	III	4 (10,8)
	IV	6 (16,2)

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de microRNAs foi realizada com o *Kit ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System* (Promega), utilizando 20 cortes de 3µm de cada caso. Os cortes foram colocados diretamente em micro tubo e foram adicionados 500µl de óleo mineral. Uma incubação a 80°C foi realizada por 2 min e as amostras foram levadas ao vórtex. Após esse processo, foram adicionados 200µl de Tampão de lise e centrifugado a 12.000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. Duas fases se formaram, uma aquosa (inferior) e outra mais oleosa (superior). Foram adicionados 40µl de proteinase K na fase aquosa e homogeneizado levemente com a pipeta. As amostras ainda foram incubadas a 56°C por 15 min e logo depois a 80°C por mais 15 min. Os tubos foram colocados no gelo por 1 min e deixados à temperatura ambiente por mais 2 min. Para o tratamento com a DNase, foi confeccionado um mix em um novo tubo com 13µl de $MnCl_2$ 0.09M, 7µl de tampão da DNase e 10µl da enzima DNase I (PROMEGA) (multiplicar o volume pelo número de amostras e fazer, pelo menos, um excedente). Foram adicionados 30µl da DNase preparada na fase inferior e homogeneizado levemente com a pipeta. Uma incubação de 15 min é feita a temperatura ambiente. 325µl de tampão de ligação foram adicionados na amostra e logo depois foram adicionados 200µl de isopropanol 100%. Agita-se bem na mão. Uma centrifugação a 12.000 rpm foi realizada por 15 segundos a temperatura ambiente e novamente formaram-se duas fases. Para cada amostra processada, foi utilizada uma coluna depositada em um

novo tubo. A fase inferior (aquosa) foi transferida para a coluna, sem o precipitado. Foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente e o filtrado é descartado. Foram adicionados 700µl de Solução de lavagem 1X (preparado com etanol) à coluna e centrifugado a 12.000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. Este processo de lavagem e centrifugação foi repetido e o filtrado foi novamente descartado. Outra centrifugação foi realizada, agora a 14.500 rpm por 4 min, para secar bem a coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo de coleta e adicionados 40µl de água livre de nucleases. Uma nova centrifugação foi feita a velocidade máxima por 1 min a temperatura ambiente e a coluna foi removida e descartada. O micro tubo final contendo o RNA extraído foi quantificado em aparelho tipo espectrofotômetro (NANODROP) e armazenado a -80°C.

3.5.1 Quantificação da amostra obtida

Para realizar a quantificação no aparelho NANODROP, 1µl do RNA total obtido é submetido à leitura de concentração e determinação das razões 260/280 (verifica contaminação por sais) e 260/230 (verifica contaminação por proteína). A determinação da concentração é necessária para saber se a quantidade de RNA extraído será suficiente para as etapas seguintes da reação (concentração utilizada: 250ng/µl). As razões devem ter valores próximos a 2.0, que é o valor ideal para sabermos a pureza do material extraído, não atrapalhando, assim, as etapas seguintes do experimento.

3.6 SÍNTESE DE cDNA – TRANSCRIÇÃO REVERSA

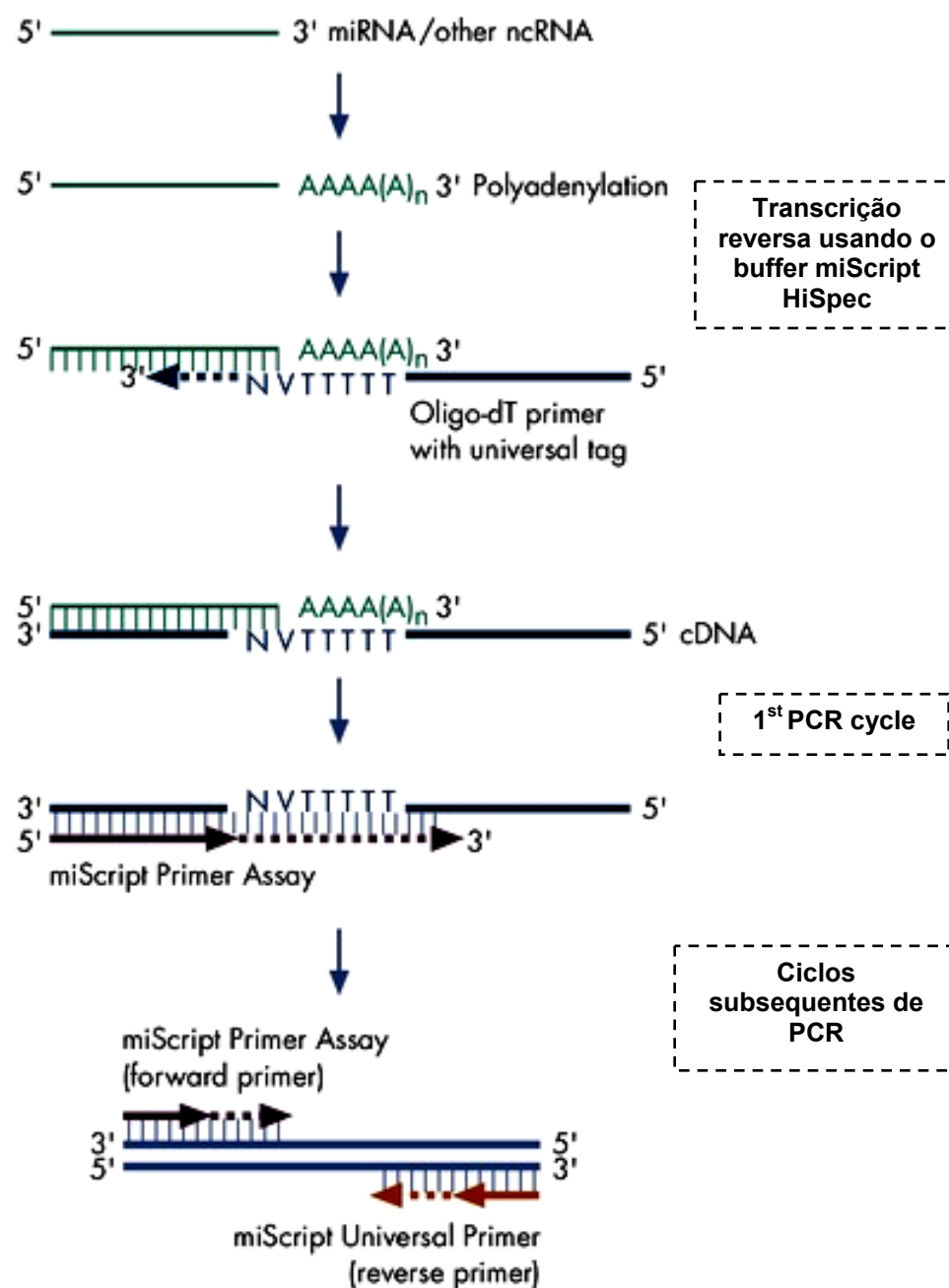
A síntese de cDNA é um processo em que são produzidas cópias de DNA a partir de mRNA, sintetizando uma fita complementar. As amostras de RNA são submetidas a uma reação enzimática modulada pela ação da enzima transcriptase reversa, permitindo a síntese do DNA complementar (cDNA), que é utilizado como um molde para a análise de RT-PCR, à sequência do RNA extraído (Figura 11).

Para determinar o perfil de expressão do microRNA, o cDNA foi preparado utilizando o Kit *miScript II RT* com *miScript HiSpec Buffer* e *5X miScript HiSpec Buffer* (Qiagen, Germantown, MD), utilizando 250ng de RNA. A amostra de RNA deve ser retirada do freezer -20°C pouco antes de ser utilizada para ser descongelada em gelo. Já a água livre de RNase, *10X Nucleics Mix* e *5X miScript HiSpec Buffer* devem ser descongelados à temperatura ambiente (15-25°C) (Tabela 2). Cada tudo foi levemente homogeneizado. A reação da transcriptase reversa foi preparada no gelo.

Tabela 2 – Componentes da reação de Transcriptase Reversa.

COMPONENTE	VOLUME
5x miScript HiSpec Buffer	4µl
10x miScript Nucleics Mix	2µl
RNase-free water	Variável
miScript Reverse Transcriptase Mix	2µl
Template RNA (added in step 3)	125-250ng RNA
Volume Total	20µl

Fonte: Adaptado do manual da QIAGEN (2012).



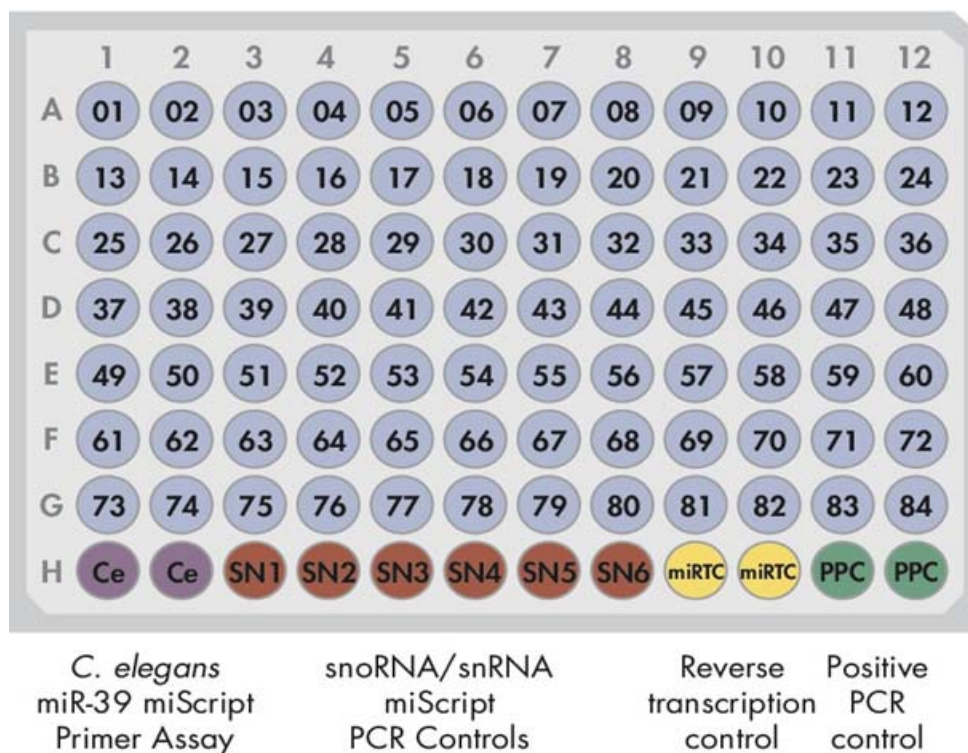
Fonte: Adaptado do manual da QIAGEN (2012).

Figura 11 - Esquema do processo de síntese do cDNA.

A mistura com reagentes foi homogeneizada delicadamente e, em seguida, armazenada no gelo. A mistura principal da transcriptase reversa contém todos os componentes necessários para a síntese da primeira cadeia de cDNA, com exceção do *RNA template*, que é adicionado

posteriormente em cada tubo. Novamente foi armazenado no gelo. Após a preparação, a mistura foi incubada por 60 min a 37°C, e em seguida, foi incubada por 5 min a 95°C para inativar o *miScript Reverse Transcriptase Mix* (Qiagen, Germantown, MD), e colocado no gelo. O cDNA foi diluído em água livre de RNase (200µl de água livre de RNase para cada 20µl de reação de transcriptase reversa) e foi colocado na *Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays* para então ser utilizado na reação de quantificação da expressão de microRNA maduro em PCR em tempo real.

Para identificar sequências de miRNA nos leiomiossarcomas uterinos, utilizou-se o *Human Cancer miRNA PCR Array (Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays)* (Qiagen, Germantown, MD). Essa placa, de 96-wells compreende primers de 84 sequências de miRNA, mais 12 controles endógenos da reação (2 controles de extração de miRNA, 6 “housekeeping” snRNAs, 2 controles de reação de transcrição reversa e 2 controles positivos de PCR), sendo os miRNAs mais relevantes relacionados à tumorigênese e devidamente estabelecidos para análises de diversos tipos de câncer (Figura 12).



Fonte: Manual Qiagen (2012).

Figura 12 - Placa de 96-poços.

A placa foi devidamente removida da embalagem e 25µl da mistura de reagentes e cDNA foram pipetados em cada poço. Esse *array* foi firmemente selado com *Optical Adhesive Filme* e centrifugado por 1 min à 1000 rpm à temperatura ambiente (15-25°C) para remover bolhas.

Após esse preparo, a placa seguiu para a realização da reação de qRT-PCR.

3.7 REAL-TIME PCR PARA ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO miRNA MADURO

A realização da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) dos perfis de microRNA maduro utilizou o Kit *miScript miRNA PCR Arrays* (que contém primers de microRNAs específicos *miRNA miScript Primer Assays*) em combinação com o Kit *miScript SYBR Green PCR*, que contém o *Universal Primer miScript* (primer reverso) e *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*.

Para o perfil de expressão do microRNA maduro, o pré-mix contendo cDNA, *miScript Universal Primer*, *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* e água livre de RNase foram adicionados ao *Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array*. O *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, *10x miScript Universal Primer*, cDNA template e a água livre de RNase devem ser descongelados à temperatura ambiente (15-25°C) e cada solução foi homogeneizada individualmente imediatamente antes do uso. Uma mistura foi preparada com os componentes visualizados na Tabela 3 e homogeneizada.

Tabela 3 - Componentes para a reação de *Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays*.

COMPONENTE	VOLUME
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375µl
10x miScript Universal Primer	275µl
RNase-free water	1000µl
Template cDNA	100µl
Volume Total	2750 µl

Fonte: Qiagen (2012).

A reação de PCR foi iniciada com uma incubação de 15 minutos a 95°C para ativar a *HotStarTaq DNA Polimerase* (incluída em *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*) e seguiu as condições de ciclagem definidas no termociclador e expostas na tabela 7. Não é necessário manter esta reação no gelo nem durante o preparo, nem durante a PCR (Tabela 4).

Tabela 4 – Condições de Ciclagem para PCR em Tempo Real.

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	COMENTÁRIOS
Ativação inicial de PCR	15 minutos	95°	<i>HotStarTaq DNA polymerase</i> é ativada por esta etapa de aquecimento
3 passos de ciclagem:			
Desnaturação	15 segundos	94°	
Hibridização	30 segundos	55°	
Extensão	34 segundos	70°	Realiza a coleta de dados de fluorescência
Número de ciclos	35 ciclos		Número de ciclos depende da quantidade de molde de cDNA e do volume do alvo

Fonte: Adaptado do Manual da Qiagen (2012).

O material foi analisado em equipamento de PCR em Tempo Real modelo ABI 7500 Real Time PCR System e uma análise das curvas de dissociação da PCR foi realizada no programa *7500 System SDS Software*. O padrão de expressão de miRNAs foi avaliado. O *array* introduzido no equipamento permite definir o perfil de expressão de 84 miRNAs com expressão presumível ou conhecida alterada durante a iniciação ou progressão do câncer.

Os controles presentes no *array* permitem uma análise utilizando o

método de quantificação relativa $\Delta\Delta CT$, que se resume na avaliação da qualidade da transcrição reversa e do PCR.

3.8 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO miRNA MADURO

Para caracterizar o perfil de expressão do leiomiossarcoma uterino, foi realizada uma normalização dos microRNAs do *array* entre todas as amostras através da plataforma RefFinder (2017). O miR-210 foi avaliado como o miRNA mais estável dentre todas as amostras e foi utilizado como referência.

O método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$ foi utilizado nas análises e é realizado a partir do cálculo da diferença de Ct (*threshold-cycle*) entre cada miRNA de interesse de cada placa (cada placa avalia uma amostra individualmente) e o controle normalizador:

$$\Delta Ct = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ controle normalizador}$$

Após esse cálculo, é realizada a média de ΔCt para cada miRNA entre todos os casos do grupo de tumor (maligno) e a média de ΔCt do grupo a ser comparado (normal, benigno e variante).

Então é calculada a diferença das médias de Ct para cada miRNA entre o grupo tumoral e o grupo comparativo: $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Média de } \Delta Ct \text{ do tumor} - \text{Média de } \Delta Ct \text{ do normal}$$

O resultado final (Rq_{microRNA}) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão do microRNA em n-vezes quando comparado à referência e ao normalizador:

$$Rq_{\text{microRNA}} = 2^{-(\Delta Ct \text{ do tumor} - \Delta Ct \text{ do comparativo})}$$

O *Fold Change* é então calculado seguindo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos miRNAs nas amostras tumorais em comparação com as amostras não neoplásicas assumimos os seguintes valores:

Expressão diminuída: Expressão (Rq) ≤ 0

Expressão aumentada: Expressão (Rq) $\geq 0,09$

Assim sendo, o microRNA com *fold change*, por exemplo, de 2, significa que está 2 vezes mais expresso no grupo tumoral quando comparado a outro grupo e com *fold change* de -2, significa que o miRNA está 2 vezes menos expresso no grupo tumoral com relação ao grupo comparativo.

A fim de compor uma assinatura única para o perfil de expressão do LMS uterino, optamos por selecionar somente os microRNAs mais diferencialmente expressos e menos diferencialmente expressos (quando possível) de cada análise, considerando o valor pelo *Fold Change* e não pelo p value ajustado, ou seja, apesar de todos os miRNAs apresentados serem significativamente estatísticos, não necessariamente o miRNA escolhido apresenta o melhor valor de p, mas sim uma expressão diferencial mais relevante biologicamente.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas diferentes análises para estabelecer o perfil de microRNA em LMS e LMV em relação ao miométrio (grupo referência) e ao leiomioma. Em seguida, foram comparados os perfis de expressão entre LMS, LMV e também LM e miométrio, a fim de encontrar diferenças que poderiam explicar suas características morfológicas e comportamentos distintos. Como uma análise adicional, também comparamos o perfil de microRNA do LMS uterino com os parâmetros clínico-patológicos.

A análise de expressão diferencial dos miRNAs foi realizada com o software estatístico R, baseada nos dados de expressão normalizados pela ferramenta RefFinder (2017). Aos logaritmos dos dados normalizados foi aplicado o teste t de Student, para comparar a expressão dos miRNA nos grupos de amostras. Os p-values obtidos pelo teste foram corrigidos pelo método de Benjamini-Hochberg e os miRNAs que apresentaram p-value corrigido menor que 0,1 (assumindo 10% de erro) foram considerados significativos, uma vez que, na tentativa de buscar novos miRNAs para caracterizar o tumor, as análises não devem ser de cunho restritivo. Com o objetivo de visualizar relações entre as expressões dos miRNAs e os dados clínicos, foi gerado também um gráfico do tipo heatmap (Figura 15).

3.10 BUSCA DE GENES ALVOS POR ANÁLISE *IN SILICO*

A fim de buscar genes alvos preditivos e validados experimentalmente para os microRNAs avaliados, foi utilizada a ferramenta online miRTaBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php> acesso em 28 de junho de 2017). Para essa análise, foram utilizados os seguintes critérios: quantidade de métodos usados para validação do alvo (priorizando o método de qPCR) e quantidade de publicações disponíveis na literatura referente ao alvo validado. Como é possível visualizar na figura 13, o gene ESR1 apresenta forte evidência de ser regulado pelo miR-206, uma vez que já foi validado por cinco diferentes métodos e possui quatro artigos publicados na literatura.

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods								Sum 	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence						
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	psilac	Other			
MIRT000700	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-206	ESR1	✓	✓	✓	✓			✓	5	4	
MIRT004671	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-206	PAX3	✓	✓	✓		✓		✓	5	3	
MIRT000185	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-206	MET	✓	✓	✓				✓	4	3	
MIRT000665	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-206	NOTCH3	✓	✓	✓				✓	4	2	
MIRT005410	Homo sapiens	Mus musculus	hsa-miR-206	Tppp	✓		✓	✓			✓	4	1	
MIRT054618	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-206	NR1H3	✓	✓	✓					3	1	

Fonte: Adaptado do site miRTarBase.

Figura 13 - Esquema representativo da avaliação de alvos de miRNA. Busca dos alvos do hsa-miR-206, tendo o gene ESR1 como um alvo de forte evidência a ser regulado por esse miRNA.

4 RESULTADOS

As análises foram realizadas em todos os casos avaliados por qRT-PCR (37 leiomiossarcomas, 3 leiomiomas, 8 leiomiomas variantes (leiomioma bizrro, leiomioma mitoticamente atípico e leiomioma celular) e 2 miométrios). Os dados foram obtidos a partir do programa *7500 System SDS Software* e analisados por Bioinformática. Uma planilha foi gerada contendo 7 grupos comparativos: Perfil de microRNA de LMS em relação a LM, LMV e MM. Ainda comparamos os LMV em relação ao LM e também ao MM e por fim, LMS com todas as amostras de LM (convencional e variante). Como análise final, realizamos uma comparação entre o perfil de microRNA dos LMS uterinos com os parâmetros clínico-patológicos das pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, que possuíam o seguimento completo e atualizado. Como mencionado anteriormente foi considerado p value ajustado $<0,1$.

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMS EM RELAÇÃO A LM

Comparando LMS aos LM, identificamos 27 microRNAs diferencialmente expressos, sendo 14 hiperexpressos e 13 hipoexpressos nos LMS. A tabela completa pode ser vista no Apêndice 1. Esta comparação

mostrou maiores níveis de expressão do miRNA-372-3p e menores níveis do miRNA-34a-5p no LMS.

Tabela 5 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma convencional.

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
miRNA	P value adj.	Fold Change	miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa.miR.372.3p	0,000294	5,698754	hsa.miR.148b.3p	0,057856	-1,475248
hsa.miR.122.5p	0,001391	4,837798	hsa.miR.181c.5p	0,069704	-1,515448
hsa.miR.206	0,059294	3,360921	hsa.miR.214.3p	0,037435	-1,727548
hsa.miR.144.3p	0,048007	3,069912	hsa.miR.125b.5p	0,069704	-1,874004
hsa.miR.373.3p	0,065615	2,935396	hsa.miR.23b.3p	0,043686	-2,137800
hsa.miR.138.5p	0,048007	2,694513	hsa.miR.21.5p	0,029880	-2,163121
hsa.miR.142.5p	0,038500	2,358521	hsa.miR.218.5p	0,048007	-2,335078
hsa.miR.155.5p	0,069704	1,998744	hsa.miR.181a.5p	0,028405	-2,539156
hsa.miR.29b.3p	0,073870	1,862776	hsa.miR.9.5p	0,039770	-2,626620
hsa.miR.193a.5p	0,097407	1,672076	hsa.miR.135b.5p	0,048007	-2,744331
hsa.miR.92a.3p	0,038500	1,422806	hsa.miR.148a.3p	0,000938	-2,927199
hsa.miR.128.3p	0,039770	1,372185	hsa.miR.27b.3p	0,000691	-3,096370
hsa.miR.25.3p	0,043686	1,282309	hsa.miR.34a.5p	1,067E-05	-3,948848
hsa.miR.98.5p	0,097407	1,151633			

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMS EM RELAÇÃO A MM

Comparando LMS com o nosso grupo de referência (MM), encontramos 7 microRNAs significativamente expressos. Cinco miRNAs foram hiperexpressos e 2 foram hipoexpressos como mostrado na Tabela 6. A tabela completa pode ser vista no Apêndice 2. miR-135b-5p mostrou o

maior nível de expressão e let-7a-5p mostrou a expressão mais baixa nesta análise.

Tabela 6 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e miométrio.

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
miRNA	P value adj.	Fold Change	miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa.miR.135b.5p	0,063515	5,95629	hsa.let.7e.5p	0,094578	-2,305944
hsa.miR.96.5p	0,073449	4,809527	hsa.let.7a.5p	0,073449	-2,383038
hsa.miR.183.5p	0,063515	4,230694			
hsa.miR.124.3p	0,093723	3,544531			
hsa.miR.127.5p	0,093723	2,442413			

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMS EM RELAÇÃO AOS LMV

Na comparação entre LMS e LMV identificamos 14 microRNAs diferencialmente expressos, dos quais 6 miRNAs mostraram expressão diferencial aumentada e 8 miRNAs mostraram expressão diferencial diminuída (Tabela 7). A tabela completa pode ser encontrada no Apêndice 3. Nesta análise, o miR-34a-5p apresentou o menor *fold* de expressão e o miR-144-3p mostrou o maior nível de expressão.

Tabela 7 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma variante.

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
miRNA	P value adj.	Fold Change	miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa.miR.144.3p	0,041085	2,371905	RNU6.6P	0,059652	-1,025881
hsa.miR.183.5p	0,041085	2,147752	hsa.miR.100.5p	0,020507	-1,299178
hsa.miR.203a.3p	0,088525	1,682125	hsa.miR.148a.3p	0,020507	-1,458452
hsa.miR.142.5p	0,059652	1,433420	hsa.miR.10b.5p	0,020507	-1,648642
hsa.miR.193a.5p	0,085156	1,273591	hsa.miR.146b.5p	0,02779	-1,827544
hsa.miR.15b.5p	0,088525	1,264887	hsa.miR.135b.5p	0,020507	-2,388273
			hsa.miR.335.5p	0,020507	-2,916416
			hsa.miR.34a.5p	2,247E-07	-3,004453

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMV EM RELAÇÃO A MM

Depois de comparar os LMS uterinos com os demais grupos decidimos analisar o grupo de LMV com os demais. Comparando os LMV com as amostras de referência (MM), encontramos 24 microRNAs diferencialmente expressos. Os 10 principais miRNAs encontrados estão na tabela abaixo, e a planilha completa está presente no Apêndice 4. Curiosamente, todos os miRNAs estavam hiper-regulados. miR-135b-5p se apresentou com uma expressão diferencial 50 vezes maior (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação de microRNAs expressos diferencialmente entre amostras de leiomiomas variantes e miométrio.

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-135b-5p	0,0185875	51,830803
hsa-miR-372-3p	0,0714463	2,88755
hsa-miR-127-5p	0,0369754	1,871743
hsa-miR-20a-5p	0,0953836	0,56596
hsa-miR-92a-3p	0,00971225	0,499887
hsa-miR-214-3p	0,067217	0,487968
hsa-let-7b-5p	0,0683309	0,452634
hsa-miR-146a-5p	0,063949	0,404233
hsa-miR-148b-3p	0,0310516	0,402501
hsa-let-7c-5p	0,0262616	0,400478

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMV EM RELAÇÃO A LM

Comparando LMV com o grupo de LM, identificamos 21 microRNAs, todos eles também hiper-regulados. miR-122-5p foi 10 vezes mais diferencialmente expresso (Tabela 9). Os 10 miRNAs mais significativos estão na tabela abaixo, e a planilha completa está disponível no Apêndice 5. Nós ainda pudemos notar o miR-372-3p expresso sete vezes mais, com uma expressão diferencial maior que a observada na comparação entre LMS e LM.

Tabela 9 - Comparação de microRNAs expressos diferencialmente entre amostras de variantes de leiomiomas variantes e leiomiomas.

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-122-5p	0,0325759	10,309624
hsa-miR-372-3p	0,00512457	7,464555
hsa-miR-124-3p	0,0065523	3,119064
hsa-miR-210-3p	0,0132358	3,038778
hsa-miR-373-3p	0,0586824	2,107957
hsa-let-7b-5p	0,0821935	0,626336
hsa-miR-181c-5p	0,0840933	0,615707
hsa-miR-130a-3p	0,0821251	0,60222
hsa-miR-148a-3p	0,0875742	0,580521
hsa-miR-30c-5p	0,092595	0,561992

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE MICRORNA DE LMS EM RELAÇÃO A LM E LMV

Nesta análise, decidimos comparar LMS uterino com leiomiomas convencionais e suas variantes conjuntamente. Encontramos 69 microRNAs diferencialmente expressos, todos eles hiper-regulados nos LMS (Tabela 10). Os 10 primeiros miRNAs mais significativos estão na tabela abaixo, e a planilha completa pode ser visualizada no Apêndice 6. O miR-206 apresentou expressão diferencial em mais de três vezes.

Tabela 10 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre LMS uterino e amostras de leiomioma variante juntamente com leiomioma.

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-206	0,0221571	3,1593382
hsa-miR-373-3p	0,00519721	2,7755556
hsa-miR-372-3p	0,022949	2,6455628
hsa-miR-124-3p	0,0273273	2,2583386
hsa-miR-25-3p	0,0109559	0,5699695
hsa-miR-193a-5p	0,0212753	0,5278316
hsa-miR-20b-5p	0,00846236	0,4779326
hsa-miR-32-5p	0,00776933	0,4743344
hsa-miR-29b-3p	0,019903	0,4709251
hsa-miR-132-3p	0,0187985	0,4684593

A fim de ilustrar as análises realizadas, é possível visualizar na Figura 14 a quantidade de microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos comparativos.

Tabela 11 - Quantidade de microRNAs hiper e hipoexpresso nos grupos tumorais em cada análise realizada.

Grupos Comparativos	Nº miRNAs hiperexpressos	Nº miRNA hipoexpresso	TOTAL
LMS x LM	14	13	27
LMS x MM	5	2	7
LMS x LMV	6	8	14
LMV x LM	21	-	21
LMV x MM	24	-	24
LMS x LM+LMV	69	-	69

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE MIRNA DO LMS E SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

A fim de buscar qualquer correlação clínico-patológica e com o prognóstico, selecionamos um conjunto de 19 amostras de LMS uterino do A.C.Camargo Cancer Center e analisamos algumas características clínico-patológicas (recidiva, idade, tamanho do tumor, metástases e óbito) (Tabela 11).

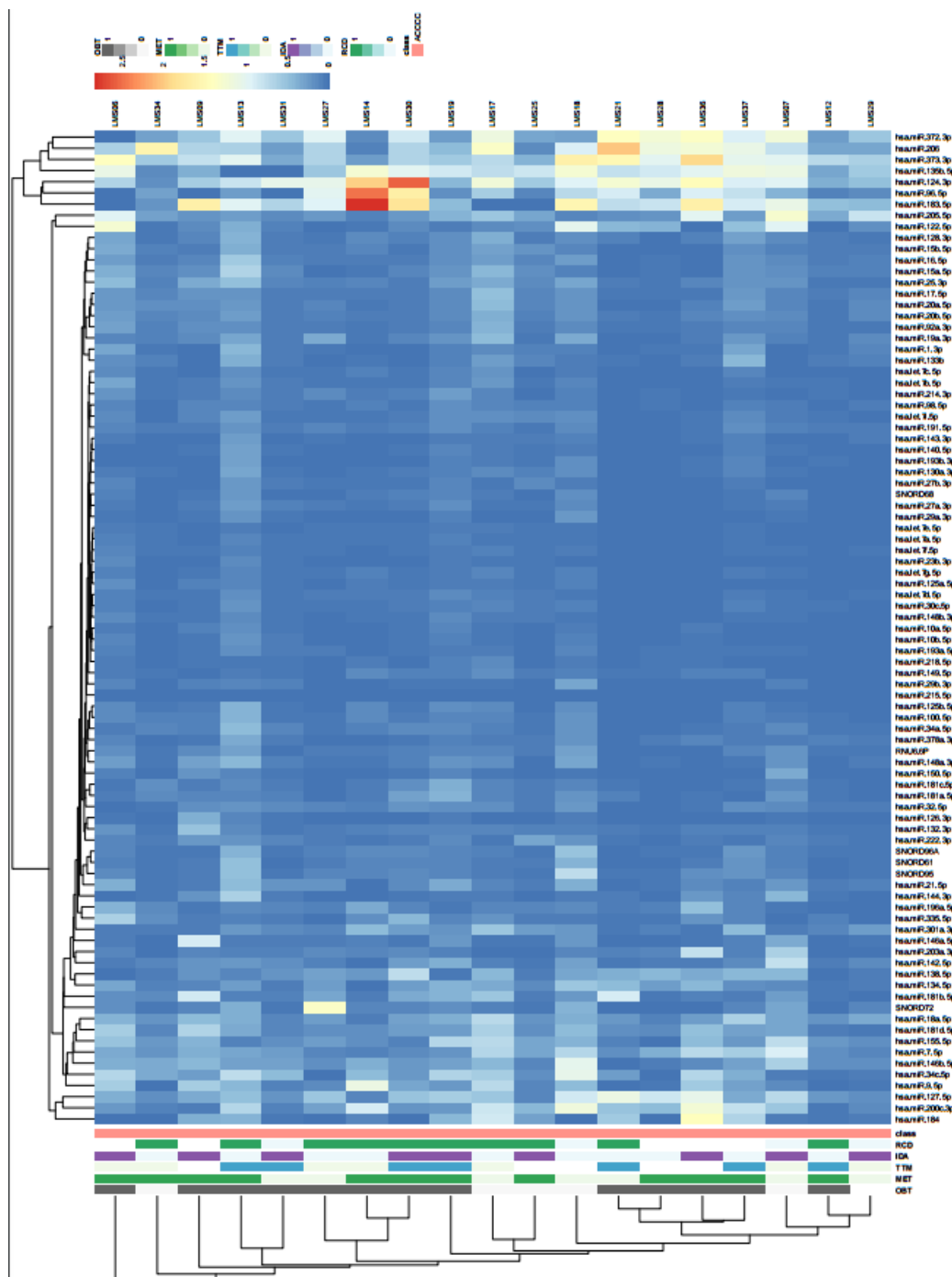
Tabela 12 - Dados das características clínico-patológicas de pacientes com LMS.

TIPO HISTOLÓGICO	RECIDIVA	IDADE	TAMANHO DO TUMOR	METÁSTASE	ÓBITO
LMS UTERINO	Sim	70	<10cm	Sim	Sim
LMS UTERINO	Não	60	<10cm	Não	Não
LMS UTERINO	Sim	53	NA	Sim	Sim
LMS UTERINO	Sim	35	>10cm	Sim	Sim
LMS UTERINO	Sim	50	NA	Não	Não
LMS UTERINO	Sim	40	<10cm	Sim	Sim
LMS UTERINO	Sim	46	<10cm	Não	Não
LMS UTERINO	Não	48	NA	Não	Não
LMS UTERINO	Sim	50	>10cm	Sim	Sim
LMS UTERINO	Sim	47	>10cm	Não	Sim
LMS UTERINO	Sim	62	NA	Sim	Não
LMS UTERINO	Sim	47	<10cm	Não	Sim
LMS UTERINO	Sim	42	NA	Sim	Sim
LMS UTERINO	Não	83	<10cm	Não	NA
LMS UTERINO	Sim	54	>10cm	Sim	Sim
LMS UTERINO	Não	65	>10cm	Não	Sim
LMS UTERINO	Sim	45	<10cm	Sim	Não
LMS UTERINO	Sim	58	NA	Sim	Sim
LMS UTERINO	Sim	38	>10cm	Sim	Sim

Legenda: LMS – leiomiossarcoma; NA – não aplicável; cm – centímetro.

Não encontramos nenhum perfil de expressão de microRNA capaz de selecionar qualquer subgrupo ou prever evolução clínica das pacientes.

A expressão dos microRNAs em associação com as características clínicas das pacientes é mostrada no heatmap na Figura 14.



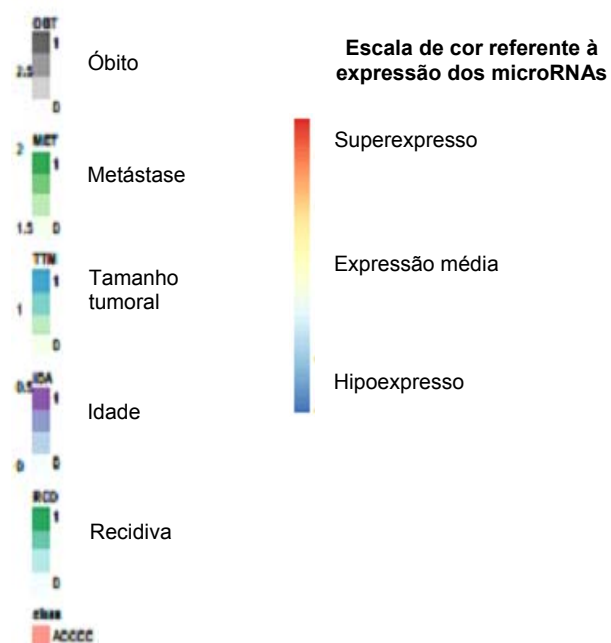


Figura 14 - Heatmap da análise dos microRNAs associados às características clínico-patológicas dos leiomiossarcomas uterinos. No lado superior são encontrados os casos e no lado direito estão os microRNAs estudados. As variáveis encontradas inferior ao heatmap correspondem as características clínicas avaliadas (Segue legenda das características clínico-patológicas, juntamente com a escala de cor da expressão dos miRNAs explorados).

4.8 ANÁLISE *IN SILICO* DE PREDIÇÃO DE ALVOS

A partir dos microRNAs selecionados mais diferencialmente expressos entre os grupos comparados, avaliamos os principais genes regulados por eles pela plataforma miRTarBase. A Tabela 12 apresenta os principais genes regulados pelos microRNAs diferencialmente expressos encontrados neste estudo.

Tabela 13 - microRNAs diferencialmente expressos nas análises comparativas, exceto os miRNAs da análise com os parâmetros clínico-patológicos, pois não houve correlação, e os genes alvos regulados.

microRNAs E OS GENES ALVOS QUE REGULAM	
microRNAs	GENES ALVOS
hsa-miR-135b-5p	SMAD5, KLF4, MAFB, ACVR1B
hsa-miR-206	ESR1, PAX3, MET, NOTCH3
hsa-miR-372-3p	LATS2, RHOC, NFIB, CDKN1A
hsa-miR-34a-5p	MYC, CDK6, E2F3, MDM4
hsa-miR-122-5p	PKM, IGF1R, SRF, PRKRA
hsa-miR-144-3p	ZFX, MET, NOTCH1, EZH2
let-7a-5p	NF2, KRAS, HMGA1, HMGA2

Legenda: Alvos selecionados a partir da base de dados miRTarBase.

5 DISCUSSÃO

Este estudo fornece análises específicas de perfis de microRNA com foco em LMS uterino, utilizando tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE). Já foi descrito que os miRNAs podem ser isolados a partir de tecidos de FFPE com sucesso (BOVELL et al. 2012; NAGY et al. 2015) e as amostras de FFPE geralmente produzem bastante RNA total e pequenos tamanhos de fragmentos de RNA que contenham miRNAs que podem ser detectados por qRT-PCR (NAGY et al. 2015).

Comparamos o tumor maligno, leiomiossarcoma, com o tumor benigno, leiomioma, a fim de comparar dois espectros de neoplasias musculares uterinas e descobrir os microRNA envolvidos no processo de tumorigênese e comportamento biológico. Encontramos alguns miRNAs importantes envolvidos na proliferação, tumorigênese e agressividade tumoral, como o miR-372-3p, e miRNAs envolvidos na resistência a múltiplos medicamentos e danos e reparos de DNA, como o miR-34a-5p, ambos nunca descritos em leiomiossarcomas uterinos.

Muito poucos estudos discutem sobre o papel de microRNA neste tipo de tumor. Esta malignidade rara requer um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais eficiente para beneficiar as pacientes e os microRNAs são ferramentas promissoras para desvendar o perfil da doença.

Na literatura atual, quando buscamos “*uterine leiomyosarcoma and microRNA*”, somente 12 trabalhos aparecem publicados. Em dois trabalhos,

o miR-200c mostra-se pouco expresso em leiomioma, quando comparado ao miométrio (CHUANG et al. 2012) e também mostra baixa expressão em leiomiossarcoma em comparação com o leiomioma (CHUANG et al. 2014). Outro trabalho se apresenta como *Retracted* (PAN et al. 2010). Um dos trabalhos mostra uma expressão diminuída do miR-93/106b nos leiomiomas em relação ao miométrio. NUOVO e SCHMITTGEN (2011) encontraram o miR-221 hiperexpresso em leiomiossarcoma através de hibridização *in situ*, relatando ser um microRNA capaz de diferenciar os leiomiossarcomas de leiomiomas metastatizantes. Outro trabalho demonstra que a repressão de let-7 leva à superexpressão do gene HMGA2 (SHI et al. 2009). Os demais trabalhos (DANIELSON et al. 2010; KOWALEWSKA et al. 2013; ZHANG et al. 2014; BRANY et al. 2015; RAVID et al. 2016) foram mencionados ao longo do estudo e na discussão.

RAVID et al. (2016) publicaram um estudo sobre uma assinatura única de microRNAs que diferenciou o leiomiossarcoma uterino do sarcoma do estroma endometrial (ESS). Os autores verificaram sete miRNAs diferencialmente expressos comparando LMS primário e ESS. Estes miRNAs estavam superexpressos em seu conjunto e dentre eles, estavam os miR-21 e miR-148b. Em nossos dados, encontramos estes microRNAs com baixa expressão nos LMS quando comparados ao LM.

SASSEN et al. (2008) relataram que os níveis de expressão de vários miRNAs foram significativamente reduzidos em cânceres em comparação com os tecidos normais correspondentes com base em um estudo de LU et al. (2005), que descreveu sobre os níveis de miRNAs diminuídos em câncer.

No entanto, permanece incerto se a expressão alterada de miRNA é causa ou consequência dos processos patológicos (SASSEN et al. 2008).

Mais significativamente, DANIELSON et al. (2010) mostraram a existência de um vínculo funcional na dupla atuação do miRNA na regulação da diferenciação celular e na oncogênese. GULED et al. (2014) mencionaram que resultados recentes têm demonstrado o valor diagnóstico e prognóstico do perfil de expressão de miRNA em pacientes com câncer.

A partir das análises realizadas, escolhemos alguns microRNAs que julgamos mais relevantes nos nossos achados para compor a discussão, que será apresentada em tópicos para melhor compreensão.

5.1 miR-34a-5p

O miR-34a-5p foi encontrado com baixa expressão significativa nos LMS em duas análises (LMS versus LM e LMS vs. LMV). Este microRNA está supostamente envolvido na resistência a medicamentos (PU et al. 2016). A resistência a medicamentos tem sido um grande obstáculo no tratamento do câncer e a expressão anormal de miRNAs tem um papel importante na biologia do tumor. Vários mecanismos medeiam a resistência aos medicamentos como o aprimoramento do reparo do DNA, apoptose e autofagia relacionada ao fármaco, desregulação de miRNA e células-tronco com potencial cancerígeno (PU et al. 2016). PU et al. (2016) demonstraram a resistência à fármacos do miR-34a-5p em linhagens celulares de osteossarcoma, através do gene CD117. Existe um ensaio clínico em

andamento de MRX34 em câncer de fígado e neoplasias hematológicas que utilizam imitadores de miR-34a como terapia de reposição (HUANG et al. 2015). Sabemos que os leiomiossarcomas não são efetivamente responsáveis à quimioterapia (NOVETSKY e POWELL 2013). Talvez a baixa expressão do miR-34a-5p possa ter um papel importante neste sentido.

Há ampla evidência de que o miR-34a é um supressor de tumor com níveis de expressão perdidos ou reduzidos em muitos tipos de câncer (MISSO et al. 2014). O miR-34a também foi sugerido como uma molécula terapêutica ideal contra metástases tumorais e recorrência (HART et al. 2016).

Ainda de acordo com PU et al. (2016), o miR-34a-5p é um alvo de transcrição direta de p53 e é regulado em muitos tumores. Além disso, este microRNA inibe a invasão e migração celular *in vitro*, sugerindo uma atuação na inibição da recorrência tumoral. Uma vez que o p53 é um supressor de tumor e o miR-34 o regula quando hipo-expresso, esse miRNA poderia, hipoteticamente, promover o desenvolvimento metastático. Embora o miR-34a-5p tenha sido bem estudado e associado a muitos tipos de câncer como sarcoma de Ewing (NAKATANI et al. 2012), câncer colorretal (GAO et al. 2014), câncer de mama (SI et al. 2016), osteossarcoma (PU et al. 2016) e assim por diante, estudos adicionais são necessários para avaliar a interação deste miRNA no leiomiossarcoma uterino e nos leiomiomas variantes.

5.2 miR-372-3p

Na análise entre LMS e LM, encontramos o miR-372-3p como o miRNA mais superexpresso em LMS. O miR-372-3p juntamente com o miR-373-3p estão envolvidos na regulação da proliferação e invasão das células cancerígenas via neutralização da inibição de quinase dependente de ciclina mediada por p53, além de estar envolvida na ativação da via de sinalização Wnt / b-catenina (SYRING et al. 2015). Esse microRNA nunca foi descrito em sarcomas uterinos.

Em alguns experimentos em cultura celular, VOORHOEVE et al. 2006 demonstram em seus resultados que, embora o miR-372 e o miR-373 confirmam proteção completa à senescência induzida por oncogene de maneira similar à inativação de p53, a resposta celular ao dano do DNA permanece intacta. Além disso, esses autores levantaram a hipótese de que o miR-372 e o -373 podem participar da tumorigênese de alguns tumores que bloqueiam o p53 de tipo selvagem e são sensíveis aos tratamentos que promovem danos ao DNA. Assim, a expressão desregulada de miR-372 e miR-373 predispõe as células para a acumulação de eventos cancerígenos.

Ainda na análise comparativa de LMV e LM, foi possível observar o miR-372-3p como segundo microRNA mais hiper-regulado nos LMV, e com expressão maior que a encontrada na análise de LMS quando comparados aos LM. O miR-372 foi o microRNA mais superexpresso na análise entre LMS e LM e está envolvido na proliferação celular, o que justificaria uma maior celularidade ou maior índice mitótico, mas não necessariamente o

caracterizaria com potencial maligno.

5.3 let-7

Outro microRNA relevante para a oncogênese que foi encontrado em nossas análises é o let-7, o primeiro miRNA descrito na literatura (BARTEL 2004; JOHNSON et al. 2005; VOORHOEVE et al. 2006). Um membro da família let-7, o let-7a-5p, foi encontrado como pouco expresso em LMS quando comparado ao miométrio normal (MM). KOWALEWSKA et al. (2013) também encontraram um resultado similar da família let-7, incluindo o let-7a-5p. Os autores mencionaram ainda o estudo de BOYERINAS et al. 2010, em que foi encontrada baixa expressão em toda a família let-7 em amostras diversas de tecidos tumorais, como em mama (SEMPERE et al. 2007), pulmão (JOHNSON et al. 2005), melanoma (MÜLLER e BOSSERHOFF 2008), apoiando um conceito de supressão de tumor que influencia a sobrevida.

let-7 está envolvido na inibição da expressão do gene RAS, mas nos tumores pulmonares correlaciona-se negativamente com os níveis de RAS (JOHNSON et al. 2005; VOORHOEVE et al. 2006). Além disso, let-7 tem um papel importante no controle do tempo de desenvolvimento. Quando é inativado, células epiteliais específicas sofrem divisões celulares adicionais em vez de sua diferenciação normal (LU et al. 2005). Ainda de acordo com BOYERINAS et al. (2010) e KOWALEWSKA et al. (2013), a maioria ou todos os membros da família let-7 estão hipo-regulados em muitos tipos de câncer,

incluindo sarcomas.

5.4 miR-135b-5p

Observando a análise entre LMS e MM e também a comparação entre LMV e MM, descobrimos o miR-135b-5p superexpresso. Esse miRNA está regulado positivamente nas amostras de LMS, e mostrou-se consideravelmente aumentado no LMV. Essas descobertas podem sugerir algum papel na diferenciação ou fenótipo celular. Esse microRNA tem sido associado ao câncer na última década, mas uma vez que os LMV não possuem comportamento agressivo ou potencial metastático, pode estar envolvido apenas em diferenciação celular e não em mecanismos de invasão. Alguns estudos descreveram o envolvimento do miR-135b-5p no carcinoma gástrico (VIDAL et al. 2016), câncer epitelial de ovário (WANG et al. 2014), tumores do endométrio (BRANY et al. 2015), entre outros.

5.5 miR-144-3p

Nossos resultados demonstraram que o miR-144-3p também se mostrou superexpresso nos LMS quando comparados aos LMV, o que poderia sugerir um envolvimento desse miRNA na proliferação celular e também em mecanismos de invasão e metástase uma vez que é a principal característica que distingue estes dois tipos tumorais. O miR-144-3p foi descrito anteriormente como um miRNA eritrose-específico (FU et al. 2009).

Mais recentemente, o miR-144 tem sido associado ao câncer e ZHANG et al. 2013 demonstraram, em experimentos *in vitro* e *in vivo* no carcinoma nasofaríngeo (NPC), um potencial papel oncogênico desse miRNA e sua atuação no desenvolvimento e progressão do NPC quando hiper-regulado. Os autores também demonstraram que esse miRNA, quando diminuído, pode inibir a proliferação celular e a invasão tecidual em camundongos. Porém, outro estudo em carcinoma de células escamosas da laringe mostrou que o miR-144-3p quando superexpresso pode inibir a progressão do ciclo celular e a invasão tecidual (ZHANG et al. 2016).

5.6 miR-122

O miR-122 mostrou-se consideravelmente hiper-regulado nos LMV quando comparado aos LM. Em um trabalho de WANG et al. 2012, a superexpressão do miR-122 em câncer de mama não só inibiu consideravelmente a proliferação celular, a formação de colônias pela indução da parada do ciclo celular na fase G1 *in vitro*, como também reduziu a tumorigenicidade *in vivo*. Porém em um estudo em osteossarcoma, sua baixa expressão foi associada a regulação do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) no tumor quando comparado ao tecido normal, sendo considerado um supressor de tumor, bem como o miR-34 (XIAO et al. 2015). Esse microRNA é usado em terapia alvo e foi o primeiro miRNA utilizado em estudos clínicos, mas seu potencial terapêutico não é usado para tratamento de câncer e sim para doença

hepática, como Hepatite C (HUANG et al. 2015). Outros estudos são necessários para compor um melhor entendimento do mecanismo de atuação desse microRNA em tumores uterinos.

5.7 miR-206

Quando comparamos nossas amostras de LMS com os leiomiomas convencionais juntamente com os leiomioma variantes, encontramos uma superexpressão de miR-206 nos LMS. Esse mesmo microRNA também foi encontrado superexpresso nos LMS quando comparado aos LM, apesar de não aparecer como diferencialmente expresso quando comparado somente com os LMV. Um estudo em rabdomiossarcoma em camundongo relata que esse miRNA, quando hipoexpresso, está envolvido na inibição do crescimento tumoral e estimulação da diferenciação muscular, sugerindo um papel de supressor tumoral (TAULLI et al. 2009). Em um estudo de sarcomas uterinos, KOWALEWSKA et al. (2013) publicaram que o miR-206 se mostrou também hipo-regulado no LMS em relação a fragmentos de útero normal, no entanto, os autores observaram uma tendência inesperada (embora não significativa) em relação à hiper-regulação de miR-206 em sarcomas endometriais e tumores epiteliais-mesenquimais mistos, quando comparados ao tecido uterino normal. Em outro estudo em câncer de mama, O'DAY e LAL (2010) relataram um potencial papel do miR-206 na supressão do câncer de mama e os autores ainda sugerem um envolvimento desse miRNA na regulação do gene do receptor de estrogênio ER α (ESR1) devido

à sua hiper-regulação em cânceres de mama receptores de estrogênio (ER) negativos. No carcinoma hepatocelular, a superexpressão do miR-206 está associada à inibição do crescimento celular, indução da apoptose e parada do ciclo celular (LIU et al. 2014). Em nosso trabalho encontramos um resultado contraditório onde a hiperexpressão se deu em LMS e não em leiomiomas. Mais estudos são necessários, em LMS para entender este resultado contraditório uma vez que o miR-206 parece apresentar um papel como supressor tumoral.

5.8 LMS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Por fim, comparamos um conjunto menor de LMS uterinos (19 amostras do A.C.Camargo Cancer Center) com as características clínico-patológicas das pacientes. No entanto, como mencionado anteriormente, não encontramos nenhum perfil de expressão de microRNA capaz de selecionar qualquer subgrupo ou prever evolução clínica das pacientes. É possível que o baixo número de casos e eventos justifiquem esses dados.

5.9 ANÁLISE *IN SILICO* DE PREDIÇÃO DE ALVOS

Perante os principais RNAs diferencialmente expressos encontrados e discutidos acima, fomos avaliar quais os principais genes e vias moleculares regulados por eles. É interessante notar que o microRNA miR-34a-5p, hipoexpresso nas análises LMS vs. LM e LMS vs. LMV, participa da

via de p53, importante supressor tumoral; o miR-135b-5p, hiperexpresso em LMS vs. MM e LMV vs. MM, está envolvido na via de sinalização do TGF β , que é um fator de crescimento bastante evidente em câncer; o miR-372-3p, hiperexpresso em LMS vs. LM também está envolvido na via do p53; o miR-122-5p está hiperexpresso em LMV vs. LM e participa da via de fator de crescimento epidérmico (EGF); o miRNA let-7a-5p encontra-se hipoexpresso na análise LMS vs. MM e está envolvido na via de regulação do ciclo celular e ciclinas; o miR-144-3p, hiperexpresso na comparação LMS vs. LMV, está envolvido na via de mTOR; por fim, o miR-206, hiperexpresso na comparação de LMS com os tumores benignos (LM e LMV), participa de via de baixa regulação dos receptores de EGF (Cancer Genome Anatomy Project 2017).

5.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos miRNA encontrados neste estudo, o miR-34a-5p aparece nas comparações entre LMS e LM e LMS e LMV e está hipoexpresso em ambas as análises, sugerindo ser um miRNA envolvido na tumorigênese e no desenvolvimento de metástases, pois o LMV não oferece um potencial metastático. O miR-122 aparentemente apresenta um papel na inibição da proliferação celular, o que biologicamente justifica o crescimento tumoral do LMV, porém não favorece um crescimento desenfreado das células tumorais, freando um processo de invasão e metástase. Por outro lado, o let-7a-5p, um membro da família let-7, pode ser um supressor de

tumor e, estando diminuído nos LMS em comparação com os MM, sugere que esse miRNA não está atuando em mecanismos de inibição de proliferação celular e também pode caracterizar o potencial oncogênico do LMS uterino.

Considerando o envolvimento do miR-144-3p na progressão e invasão do ciclo celular, e sua hiper-expressão na comparação entre LMS e LMV, pode-se sugerir uma atuação desse miRNA mecanismos de progressão e metástase.

O miR-206 pode compor uma assinatura de diferenciação do LMS com relação aos tumores benignos, uma vez que foi o miRNA mais diferencialmente expresso na comparação entre LMS e os leiomiomas (LMV e LM), no entanto, em outros tipos tumorais, quando hipoexpresso, está associado à inibição da progressão celular, por isso, estudos em sarcomas uterinos devem ser conduzidos para aprimorar o entendimento desse miRNA nesse tumor. O miR-206 também aparece hiper-expresso na comparação entre LMS e LM, indicando estar, de fato, envolvido no desenvolvimento do leiomiossarcoma uterino.

Existem poucos estudos sobre miRNAs em sarcomas, especialmente nos sarcomas uterinos. Um mecanismo de identificação dos LMS e sua distinção de outros tumores do útero seria de grande utilidade para um diagnóstico precoce e preciso. A partir da identificação de biomarcadores que poderiam especificar o leiomiossarcoma uterino, o tratamento poderia ser melhor gerenciado e aprimorado, sugerindo cirurgias precoces quando identificado uma massa uterina, por exemplo, assim como, abordagens mais

precisas para uma melhor resposta ao tratamento.

Um painel composto pelos miRNA desregulados -144-3p, -34a-5p, let-7a-5p e -206 poderia caracterizar uma assinatura única para o LMS uterino, distinguindo-o das variantes benignas e do tecido normal precocemente, porém, para concretizar esses achados, validações desses genes são necessárias. Os miRNAs -372-3p e -135b-5p, apesar de serem estatisticamente significativos, não foram capazes de caracterizar uma distinção entre LMS e LMV, já que ambos se encontram hiper-expressos nos dois grupos tumorais.

O miR-122-5p parece ser um potencial marcador para distinção de variantes de leiomioma, uma vez que se apresentou consideravelmente hiper-regulado na análise LMV versus LM.

Procuramos explorar as funções e os mecanismos subjacentes mais prováveis dos microRNAs no leiomiossarcoma uterino. A assinatura dos 4 miRNAs no leiomiossarcoma uterino pode contribuir para uma melhor compreensão do mecanismo de tumorigênese e desenvolvimento do LMS e também auxiliar no diagnóstico e manejo da doença. Além disso, os 2 miRNAs superexpressos que caracterizam o LMV (miR-135b-5p e miR-122-5p) nos traz algum conhecimento sobre essa entidade tumoral que possui características semelhante ao LMS, já que o miR-135b-5p também aparece no LMS, apesar do seu potencial benigno. Contudo, estudos adicionais são necessários para validar esses achados.

6 CONCLUSÃO

- A partir das análises realizadas, foi possível identificar 4 microRNAs, miR-34a-5p, -144-3p, -206 e let-7a-5p, com potencial para caracterizar uma assinatura para o LMS uterino, distinguindo-o dos leiomiomas e do miometrio normal.
- Os 2 miRNAs hiper-expressos que caracterizam as variantes de leiomioma (miR-135b-5p e miR-122-5p) nos trazem algum conhecimento sobre esses tumores que possuem características morfológicas entre os LM e LMS.
- Não foi possível encontrar nenhum perfil de microRNA relacionado ao prognóstico no LMS uterino.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeler VM, Nenodovic M. Diagnostic immunohistochemistry in uterine sarcomas. **Int J Gynecol Pathol** 2011; 33:236-43.

Arleo EK, Schwartz PE, Hui P, McCarthy S. Review of leiomyoma variants. **Am J Roentgenol** 2015; 205:912-21.

Baiocchi G, Poliseli FLV, De Brot L, et al. *TOP2A* copy number and *TOP2A* expression in uterine benign smooth muscle tumours and leiomyosarcoma. **J Clin Pathol** 2016; 69:884-9.

Barlin JN, Zhou QC, Leitao MM, et al. Molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma and correlation with clinical outcome. **Neoplasia** 2015; 17:183-9.

Bartel DP. MicroRNAs. **Cell** 2004; 116:281-97.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. **Nat Genet** 2003; 35:215-7.

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

Bovell L, Shanmugam C, Katkoori VR, et al. miRNAs are stable in formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue specimens of colorectal cancers stored for up to 28 years. **Front Biosci** 2012; 4:1937-40.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:F19-36.

Brany D, Dvorska D, Nachajova M, Slavik P, Burjanivova T. Malignant tumors of the uterine corpus: molecular background of their origin. **Tumor Biol** 2015; 36:6615-21.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. **Cell** 2003; 113:25-36.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:857-66.

Calin GA, Liu C, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004a; 32:11755-60.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004b; 101:2999-3004.

Cancer Genome Anatomy Project. **Pathway information provided by BioCarta.** Available from: <URL:https://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways> [2017 jan 12]

Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). **RNA** 2006; 12:913-20.

Chen L, Yang B. Immunohistochemical Analysis of P16, P53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors. **Int J Gynecol Pathol** 2008; 27:326-32.

Cho YL, Bae S, Koo MS, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of uterine leiomyosarcoma. **Gynecol Oncol** 2005; 99:545-51.

Chuang T DER, Panda H, Luo X, Chegini N. miR-200c is aberrantly expressed in leiomyomas in an ethnic-dependent manner and targets ZEBs, VEGFA, TIMP2, and FBLN5. **Endocr Relat Cancer** 2012; 19:541-56.

Chuang TD, Ho M, Khorram O. The regulatory function of miR-200c on inflammatory and cell-cycle associated genes. **Reprod Sci** 2015; 22:563-71.

Cohen DT, Oliva E, Hahn PF, Fuller AF, Lee SI. Uterine smooth-muscle tumors with unusual growth patterns: imaging with pathologic correlation. **Am J Roentgenol** 2007; 188:246-55.

Creighton CJ, Nagaraja AK, Hanash SM, Matzuk MM, Gunaratne PH. S. A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of microRNA target predictions. **RNA** 2008; 14:2290-6.

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. **Gynecol Oncol** 2010; 116:131-39.

Danielson LS, Menendez S, Attolini CS-O, et al. A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. **Am J Pathol** 2010; 177:908-17.

Engin S, Yavuz E, Tecer A, Ahmet C. The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas : a clinicopathologic study. **Gynecol Oncol** 2005; 99:36-42.

Fu YF, Du TT, Dong M, et al. Mir-144 selectively regulates embryonic {alpha}-hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. **Blood** 2009; 113:1340-49.

Gao J, Li N, Dong Y, et al. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. **Oncogene** 2014; 34:1-11.

Gockley AA, Rauh-Hain JA, Del Carmen MG. Uterine leiomyosarcoma. **Int J Gynecol Cancer** 2014; 24:1538-42.

Guled M, Pazzaglia L, Borze I, et al. Differentiating soft tissue leiomyosarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma: a miRNA analysis. **Genes Chromosom Cancer** 2014; 53:693-702.

Guntupalli SR, Ramirez PT, Anderson ML, Milam MR, Bodurka DC, Malpica A. Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: A retrospective analysis. **Gynecol Oncol** 2009; 113:324-26.

Hart M, Rheinheimer S, Leidinger P, et. al. Identification of miR-34a-target interactions by a combined network based and experimental approach. **Oncotarget** 2016; 7:34288-99.

Huang J, Lyu H, Wang J, Liu B. MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. **Am J Cancer Res** 2015; 5:20-31.

Ip PP, Cheung AN. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2011; 25:691-704.

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:5394-403.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell** 2005; 120:635-47.

Kelley TW, Borden EC, Goldblum JR. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas: an immunohistochemical study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2004; 12:338-41.

Kowalewska M, Bakula-Zalewska E, Chechlinska M, et al. microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. **Tumor Biol** 2013; 34:2153-60.

Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs”. **Nature** 2005; 438:685-89.

Kurman R, Carcangiu ML, Herrington CS YR. **WHO Classification of tumours of female reproductive organs**. Lyon: IARC, 2014. Tumours of the uterine corpus – Mesenchymal tumours. p.135-147. (WHO/IARC Classification of Tumours, 4th ed., v. 6)

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 2001; 294:853-8.

Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature** 2003; 425:1-5.

Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. **J Med Genet** 2006; 43:523-6.

Life after cervical cancer. Monday, June 30, 2014.
<URL:<http://aftercervicalcancer.blogspot.com.br/>> [2017 jan 12]

Liga de Patologia. **Leiomiomas**. 10 jan 2011. Disponível em:
<URL:<http://ligadepatologiaufc.blogspot.com.br/2011/01/leiomiomas.html>>
[2017 jun 19]

Liu W, Xu C, Wan H, et al. MicroRNA-206 overexpression promotes apoptosis, induces cell cycle arrest and inhibits the migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Int J Mol Med** 2014; 34:420-8.

Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature** 2005; 435:834-38.

Ly A, Mills AM, McKenney JK, et al. Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:643-9.

Major FJ, Blessing JA, Silverberg SG, et al. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma: a Gynecologic Oncology Group Study. **Cancer** 1993; 71:1702-9.

McCluggage WG. A practical approach to the diagnosis of mixed epithelial and mesenchymal tumours of the uterus. **Mod Pathol** 2016; 29:S78-S91.

Mehine M, Kaasinen E, Katainen R, et al. Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. **N Engl J Med** 2013; 369:43-53.

miRTarBase. **The experimentally validated microRNA-target interactions database.** Available from: <URL:
<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>> [2017 jun 12]

Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? **Mol Ther Nucleic Acids** 2014; 3:e194.

Mittal KR, Chen F, Wei JJ, et al. Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas. **Mod Pathol** 2009; 22:1303-11.

Müller DW, Bosserhoff A-K. Integrin $\beta 3$ expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. **Oncogene** 2008; 27:6698-706.

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, Barták BK, Tulassay Z, Molnár B. miRNA isolation from FFPET specimen: a technical comparison of miRNA and total RNA isolation methods. **Pathol Oncol Res** 2016; 22:505-13.

Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, et al. miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy. **J Pathol** 2012; 226:796-805.

Novetsky AP, Powell MA. Management of sarcomas of the uterus. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:546-52.

Nuovo G, Schmittgen T. Benign Metastasizing Leiomyoma of the Lung: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Micro-RNA Analyses. **Diagn Mol Pathol** 2008; 17:145–150.

O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:201.

Oliva E. Cellular mesenchymal tumors of the uterus. **Int J Gynecol Pathol** 2014; 33:374-84.

Pan Q, Luo X, Chegini N. microRNA 21: response to hormonal therapies and regulatory function in leiomyoma, transformed leiomyoma and leiomyosarcoma cells. **Mol Hum Reprod** 2010; 16:215-27.

Perri T, Korach J, Sadetzki S, Oberman PB, Fridman E, Ben-baruch G. Uterine leiomyosarcoma : does the primary surgical procedure matter ? **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19:257-60.

Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. **Int J Gynecol Obstet** 2009; 104:177-8.

Pu Y, Zhao F, Wang H, Cai W, Gao J. MiR-34a-5p promotes the multi-drug resistance of osteosarcoma by targeting the CD117 gene. **Oncotarget** 2016; 7:28420-34.

Qiagen. Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. **miScript® miRNA PCR Array Handbook** 2012.

Rauh-Hain JA, Oduyebo T, Diver EJ, et al. Uterine leiomyosarcoma. **Int J Gynecol Cancer** 2013; 23:1036-43.

Ravid Y, Formanski M, Smith Y, Reich R, Davidson B. Uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma have unique miRNA signatures. **Gynecol Oncol** 2016; 140:512-17.

RefFinder. Available from:
<URL:<http://leonxie.esy.es/RefFinder/?type=reference#>> [2017 jun 28]

Sangle N, Lele S. Uterine mesenchymal tumors. **Indian J Pathol Microbiol** 2011; 54:243-53.

Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. **Virchows Arch** 2008; 452:1-10.

Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. **Cancer Res** 2007; 67:11612-20.

Serrano C, George S. Leiomyosarcoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2013; 27:957-74.

Sharma P, Kumar R, Singh H, et al. Role of FDG PET-CT in detecting recurrence in patients with uterine sarcoma: comparison with conventional imaging. **Nucl Med Commun** 2012; 33:185-90.

Shi G, Perle MA, Mittal K, et al. Let-7 repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma. **J Cell Mol Med** 2009; 13:3898-905.

Si W, Li Y, Shao H, et al. MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting Wnt1 in Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Am J Med Sci** 2016; 352:191-9.

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.

Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer. **J Urol** 2015; 193:331-37.

Tang F, Hajkova P, Barton SC, et al. 220-plex microRNA expression profile of a single cell. **Nat Protoc** 2006; 1:1154-9.

Taulli R, Bersani F, Foglizzo V, et al. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. **J Clin Invest** 2009; 119:2366-78.

Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. **Nat Methods** 2004; 1:47-53.

Vidal AF, Cruz AMP, Magalhães L, et al. Hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. **World J Gastroenterol** 2016; 22:2060-70.

Voorhoeve PM, Le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. **Cell** 2006; 124:1169-81.

Wang B, Wang H, Yang Z. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R. **PLoS One** 2012; 7:1-9.

Wang L, Zhu M-J, Ren A-M, et al. A ten-microRNA signature identified from a genome-wide microRNA expression profiling in human epithelial ovarian cancer. **PLoS One** 2014; 9:e96472.

Xiao F, Chen J, Lian C, Han P, Zhang C. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces cytotoxicity specific to osteosarcoma by microRNA response elements. **Mol Med Rep** 2015; 11:739-45.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev** 2003; 3011-6.

Zhang LY, Lee VHF, Wong AMG, et al. Microrna-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. **Carcinogenesis** 2013; 34:454-63.

Zhang Q, Ubago J, Li L, et al. Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: Emphasis in atypical leiomyoma. **Cancer** 2014; 120:3165-77.

Zhang S-Y, Lu Z-M, Lin Y-F, et al. miR-144-3p, a tumor suppressive microRNA targeting ETS-1 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2016; 7:11637-50.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. **Am J Pathol** 2007; 171:728-38.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 25 de outubro de 2013.

A
Dra. Isabela Werneck da Cunha.

Aluna: Beatriz Nunes Schiavon (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1816/13

“Caracterização de microRNAs associadas a variações genéticas em leiomiossarcomas uterinos”.

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 17/09/2013, aprovaram a realização do protocolo do estudo em referência (datado de 10 de junho de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos: -

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com 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 o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,

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

Apêndice 1 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
microRNA	Fold Change	P value ajust.	microRNA	Fold Change	P value ajust.
hsa.miR.372.3p	5,698754141	0,000294462	hsa.miR.10a.5p	-0,000592673	0,999291956
hsa.miR.122.5p	4,837798372	0,001391854	hsa.miR.193b.3p	-0,008074198	0,999291956
hsa.miR.206	3,360921129	0,059294934	hsa.miR.132.3p	-0,010460322	0,999291956
hsa.miR.144.3p	3,069912642	0,048007334	RNU6.6P	-0,125939643	0,910461871
hsa.miR.373.3p	2,935396138	0,065615397	hsa.miR.30c.5p	-0,14425574	0,893763739
hsa.miR.138.5p	2,694513774	0,048007334	hsa.let.7b.5p	-0,156880837	0,903882444
hsa.miR.142.5p	2,358521831	0,038500499	hsa.miR.15b.5p	-0,18666539	0,903882444
hsa.miR.124.3p	2,16893969	0,115174378	hsa.let.7c.5p	-0,200715041	0,903882444
hsa.miR.155.5p	1,998744327	0,069704361	hsa.let.7g.5p	-0,200966165	0,898111501
hsa.miR.205.5p	1,971819536	0,126522724	hsa.miR.17.5p	-0,209544461	0,830734858
hsa.miR.29b.3p	1,862776208	0,073870712	hsa.miR.143.3p	-0,258297938	0,903882444
hsa.miR.193a.5p	1,672076793	0,097407506	hsa.let.7f.5p	-0,267643598	0,804715696
hsa.miR.92a.3p	1,422806249	0,038500499	hsa.miR.27a.3p	-0,280546464	0,679937167
hsa.miR.128.3p	1,372185738	0,039770747	hsa.let.7d.5p	-0,379228099	0,679937167
hsa.miR.25.3p	1,282309224	0,043686152	hsa.miR.10b.5p	-0,391877619	0,777218361
hsa.miR.222.3p	1,225027123	0,161414194	SNORD72	-0,399182764	0,804715696
hsa.miR.146a.5p	1,218576916	0,303341397	hsa.miR.100.5p	-0,399472296	0,677619138
hsa.miR.210.3p	1,217826705	0,219501237	hsa.let.7i.5p	-0,558269124	0,458741219
hsa.miR.98.5p	1,151633035	0,097407506	hsa.miR.16.5p	-0,607018592	0,458741219
hsa.miR.96.5p	1,091025091	0,539874633	hsa.miR.1.3p	-0,69455055	0,706049292
hsa.miR.20b.5p	0,96248878	0,161414194	SNORD61	-0,816293659	0,588878842
hsa.miR.183.5p	0,953149987	0,634930469	hsa.miR.127.5p	-0,905099715	0,392571012
hsa.miR.203a.3p	0,89853218	0,588878842	hsa.miR.378a.3p	-1,162912979	0,224299002

hsa.miR.149.5p	0,898314763	0,396685054	hsa.let.7a.5p	-1,199401851	0,161414194
hsa.miR.150.5p	0,8174065	0,588878842	hsa.miR.200c.3p	-1,21554276	0,502375392
hsa.miR.20a.5p	0,797501497	0,341718216	hsa.miR.181b.5p	-1,291194285	0,266792594
hsa.miR.181d.5p	0,747465309	0,392571012	hsa.miR.146b.5p	-1,293093295	0,299194609
hsa.miR.184	0,745034955	0,766989101	hsa.miR.19a.3p	-1,295865709	0,125028479
hsa.miR.29a.3p	0,626462863	0,588878842	hsa.miR.335.5p	-1,318648596	0,526042126
hsa.miR.32.5p	0,549797603	0,610445414	hsa.miR.196a.5p	-1,356916899	0,231379721
hsa.miR.134.5p	0,538303264	0,634930469	SNORD68	-1,357169225	0,200458394
hsa.miR.126.3p	0,531426086	0,634930469	hsa.miR.130a.3p	-1,369338579	0,110282756
hsa.miR.7.5p	0,505821517	0,706049292	hsa.let.7e.5p	-1,447609849	0,115174378
hsa.miR.191.5p	0,449064802	0,610445414	hsa.miR.148b.3p	-1,475248902	0,057856401
hsa.miR.15a.5p	0,237975078	0,898111501	hsa.miR.181c.5p	-1,515448761	0,069704361
hsa.miR.140.5p	0,096094783	0,940284252	hsa.miR.214.3p	-1,727548358	0,037435738
hsa.miR.133b	0,059945778	0,998755744	hsa.miR.125b.5p	-1,874004424	0,069704361
hsa.miR.301a.3p	0,05859129	0,998755744	hsa.miR.23b.3p	-2,137800268	0,043686152
hsa.miR.18a.5p	0,053474441	0,998755744	hsa.miR.34c.5p	-2,138786508	0,130390991
hsa.miR.125a.5p	0,016139819	0,999291956	hsa.miR.21.5p	-2,163121101	0,029880799
			hsa.miR.218.5p	-2,335078051	0,048007334
			hsa.miR.181a.5p	-2,539156618	0,02840563
			hsa.miR.9.5p	-2,626620452	0,039770747
			hsa.miR.135b.5p	-2,744331696	0,048007334
			hsa.miR.148a.3p	-2,927199975	0,000938381
			hsa.miR.27b.3p	-3,096370132	0,000691073
			hsa.miR.34a.5p	-3,948848787	1,06766E-05

Apêndice 2 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e miométrio

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
microRNA	Fold Change	P value ajust.	microRNA	Fold Change	P value ajust.
hsa.miR.184	NA	NA	hsa.miR.222.3p	-0,155847409	0,868372013
hsa.miR.135b.5p	5,95629936	0,063515954	hsa.miR.148a.3p	-0,160449533	0,868372013
hsa.miR.96.5p	4,809527493	0,073449883	hsa.miR.15b.5p	-0,191189517	0,868372013
hsa.miR.183.5p	4,230694298	0,063515954	hsa.miR.181c.5p	-0,249621677	0,82244109
hsa.miR.124.3p	3,544531909	0,093723246	hsa.miR.146a.5p	-0,297302112	0,828079386
hsa.miR.373.3p	3,206616876	0,185539491	RNU6.6P	-0,346672061	0,780361615
hsa.miR.372.3p	3,021887483	0,185539491	hsa.miR.214.3p	-0,4493441	0,723799205
hsa.miR.127.5p	2,442413874	0,093723246	hsa.miR.378a.3p	-0,498375903	0,74919296
hsa.miR.206	2,3641146	0,292137742	hsa.miR.1.3p	-0,510638208	0,814634613
hsa.miR.205.5p	2,190411721	0,254496048	hsa.miR.203a.3p	-0,531365578	0,798631867
hsa.miR.200c.3p	2,120780962	0,292137742	hsa.miR.92a.3p	-0,637746118	0,452429004
hsa.miR.34c.5p	1,910841422	0,292137742	hsa.miR.98.5p	-0,645518668	0,471341876
hsa.miR.7.5p	1,676343412	0,276984487	hsa.miR.191.5p	-0,688183685	0,467764504
hsa.miR.146b.5p	1,673728038	0,292137742	hsa.miR.335.5p	-0,707196907	0,790301759
hsa.miR.122.5p	1,640447279	0,40859899	hsa.let.7i.5p	-0,724169784	0,40859899
hsa.miR.210.3p	1,547271392	0,268978674	hsa.miR.100.5p	-0,773249789	0,452429004
hsa.miR.155.5p	1,52923215	0,292137742	hsa.miR.27a.3p	-0,794914268	0,292137742
hsa.miR.18a.5p	1,479474722	0,254496048	hsa.miR.30c.5p	-0,89370025	0,276984487
hsa.miR.301a.3p	1,457668098	0,292137742	hsa.miR.130a.3p	-1,00015184	0,38055601
hsa.miR.181d.5p	1,292276278	0,254496048	SNORD61	-1,151339639	0,46517086
hsa.miR.138.5p	1,208089466	0,487270103	hsa.miR.125b.5p	-1,165350038	0,403470603
hsa.miR.134.5p	0,915413344	0,46517086	hsa.miR.29b.3p	-1,178498362	0,403470603
hsa.miR.142.5p	0,885779587	0,534642955	hsa.miR.27b.3p	-1,285981938	0,292137742
hsa.miR.25.3p	0,869898586	0,292137742	hsa.miR.149.5p	-1,294066773	0,292137742

hsa.miR.9.5p	0,580435286	0,780361615	hsa.let.7b.5p	-1,341567022	0,254496048
hsa.miR.15a.5p	0,573554713	0,738755632	hsa.miR.10a.5p	-1,346528299	0,276984487
hsa.miR.196a.5p	0,558132056	0,76747554	hsa.miR.10b.5p	-1,414925326	0,292137742
hsa.miR.32.5p	0,536862116	0,723799205	hsa.miR.133b	-1,432610901	0,41327081
hsa.miR.20b.5p	0,410963299	0,723799205	hsa.miR.125a.5p	-1,442861193	0,254496048
SNORD72	0,367947154	0,816412582	hsa.miR.148b.3p	-1,485294498	0,185539491
hsa.miR.132.3p	0,367375399	0,780361615	hsa.miR.193b.3p	-1,53152101	0,254496048
hsa.miR.17.5p	0,357519457	0,74919296	hsa.miR.140.5p	-1,596901494	0,168255258
hsa.miR.21.5p	0,34198217	0,7997281	SNORD68	-1,651013932	0,268978674
hsa.miR.16.5p	0,314532919	0,780361615	hsa.miR.126.3p	-1,683305266	0,224358052
hsa.miR.181b.5p	0,310132055	0,826745622	hsa.let.7f.5p	-1,7016425	0,158875961
hsa.miR.181a.5p	0,307240982	0,82244109	hsa.miR.150.5p	-1,714324029	0,292137742
hsa.miR.19a.3p	0,286302822	0,814634613	hsa.let.7d.5p	-1,735431039	0,136488383
hsa.miR.144.3p	0,26675719	0,868372013	hsa.miR.143.3p	-1,771094234	0,314781245
hsa.miR.128.3p	0,257977261	0,790301759	hsa.miR.218.5p	-1,7908189	0,276984487
hsa.miR.34a.5p	0,100125835	0,909164447	hsa.miR.29a.3p	-1,897910124	0,185539491
hsa.miR.20a.5p	0,049867811	0,943575455	hsa.miR.193a.5p	-1,914827989	0,191753897
			hsa.let.7c.5p	-1,958561875	0,185539491
			hsa.miR.23b.3p	-1,972980096	0,185539491
			hsa.let.7g.5p	-2,072611389	0,13233991
			hsa.let.7e.5p	-2,305944635	0,094578686
			hsa.let.7a.5p	-2,383038582	0,073449883

Apêndice 3 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino e leiomioma variante

Hiper-regulado			Hipo-regulado		
microRNA	Fold Change	P value ajust.	microRNA	Fold Change	P value ajust.
hsa.miR.144.3p	2,371905438	0,041085948	hsa.miR.127.5p	-0,052178771	0,910742128
hsa.miR.183.5p	2,147752142	0,041085948	hsa.miR.191.5p	-0,067114411	0,859722195
hsa.miR.206	1,94789059	0,129459558	hsa.miR.140.5p	-0,120081685	0,828434424
hsa.miR.373.3p	1,810854794	0,117008272	hsa.let.7c.5p	-0,124738653	0,828833265
hsa.miR.203a.3p	1,682125857	0,088525868	hsa.miR.181b.5p	-0,137853083	0,828833265
hsa.miR.138.5p	1,45606979	0,137763434	hsa.let.7i.5p	-0,153373359	0,786104792
hsa.miR.142.5p	1,433420068	0,059652868	hsa.miR.148b.3p	-0,16677293	0,786104792
hsa.miR.193a.5p	1,273591329	0,085156413	hsa.miR.29a.3p	-0,179585798	0,802272695
hsa.miR.15b.5p	1,264887437	0,088525868	hsa.miR.9.5p	-0,248894732	0,794963899
hsa.miR.210.3p	1,121387148	0,11571493	hsa.miR.218.5p	-0,251274195	0,786104792
hsa.miR.29b.3p	1,07714191	0,170361431	hsa.miR.122.5p	-0,255073799	0,826027797
hsa.miR.146a.5p	0,937349373	0,257729009	hsa.let.7a.5p	-0,312639953	0,634187045
hsa.miR.149.5p	0,8158226	0,257729009	hsa.miR.23b.3p	-0,344364234	0,657259022
hsa.miR.378a.3p	0,795275198	0,257729009	hsa.miR.130a.3p	-0,367419418	0,580197026
hsa.miR.124.3p	0,76112152	0,496126758	hsa.miR.1.3p	-0,367607797	0,786104792
hsa.miR.133b	0,741962102	0,496126758	hsa.miR.181c.5p	-0,406905142	0,551764477
hsa.miR.372.3p	0,709704957	0,561219268	hsa.miR.196a.5p	-0,440479084	0,618313511
hsa.miR.200c.3p	0,632096578	0,600571874	hsa.miR.16.5p	-0,487012644	0,360686264
hsa.miR.205.5p	0,59913549	0,561219268	hsa.let.7g.5p	-0,492027218	0,496126758
hsa.miR.181d.5p	0,575521323	0,317513626	hsa.let.7e.5p	-0,544853085	0,467303739
hsa.miR.222.3p	0,562421833	0,399021999	hsa.miR.34c.5p	-0,559605515	0,61946714
hsa.miR.92a.3p	0,529777901	0,257729009	hsa.let.7f.5p	-0,603757561	0,278738722
hsa.miR.30c.5p	0,526268146	0,230420559	hsa.miR.19a.3p	-0,65399486	0,278738722
hsa.miR.134.5p	0,479504715	0,528779746	hsa.miR.184	-0,663796413	0,738058537

hsa.miR.25.3p	0,477602992	0,278738722	hsa.miR.27b.3p	-0,710127006	0,278738722
hsa.miR.32.5p	0,473614244	0,512703054	hsa.miR.125a.5p	-0,744549771	0,256011989
hsa.miR.18a.5p	0,452591242	0,528779746	hsa.miR.181a.5p	-0,817322095	0,278738722
hsa.miR.155.5p	0,420186638	0,621768126	hsa.miR.10a.5p	-0,842446231	0,210694547
hsa.miR.27a.3p	0,401199828	0,328580872	SNORD61	-1,003039886	0,257729009
hsa.miR.132.3p	0,384184562	0,561219268	hsa.miR.125b.5p	-1,018368851	0,187817875
hsa.miR.301a.3p	0,369645069	0,657259022	hsa.miR.15a.5p	-1,020627515	0,173130813
hsa.miR.98.5p	0,353611543	0,528779746	RNU6.6P	-1,025881696	0,059652868
hsa.miR.20a.5p	0,352940666	0,562132823	SNORD72	-1,029198888	0,23232544
hsa.miR.126.3p	0,349199482	0,621768126	SNORD68	-1,179643937	0,117008272
hsa.miR.150.5p	0,306220255	0,786104792	hsa.miR.96.5p	-1,225704447	0,398162411
hsa.miR.128.3p	0,281418545	0,564909541	hsa.miR.100.5p	-1,299178852	0,020507565
hsa.miR.7.5p	0,247245621	0,786104792	hsa.miR.148a.3p	-1,458452453	0,020507565
hsa.let.7b.5p	0,230485748	0,718069489	hsa.miR.10b.5p	-1,648642735	0,020507565
hsa.let.7d.5p	0,173277302	0,786104792	hsa.miR.146b.5p	-1,827544471	0,02779481
hsa.miR.143.3p	0,171800073	0,828833265	hsa.miR.135b.5p	-2,388273817	0,020507565
hsa.miR.214.3p	0,146854721	0,802272695	hsa.miR.335.5p	-2,916416738	0,020507565
hsa.miR.193b.3p	0,139595525	0,828833265	hsa.miR.34a.5p	-3,004453439	2,24717E-07
hsa.miR.21.5p	0,11641946	0,828833265			
hsa.miR.20b.5p	0,08763903	0,828833265			
hsa.miR.17.5p	0,06644393	0,858284708			

Apêndice 4 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomioma variante e miométrio

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-135b-5p	0,0185875	51,830803
hsa-miR-372-3p	0,0714463	2,88755
hsa-miR-127-5p	0,0369754	1,871743
hsa-miR-20a-5p	0,0953836	0,56596
hsa-miR-92a-3p	0,00971225	0,499887
hsa-miR-214-3p	0,067217	0,487968
hsa-let-7b-5p	0,0683309	0,452634
hsa-miR-146a-5p	0,063949	0,404233
hsa-miR-148b-3p	0,0310516	0,402501
hsa-let-7c-5p	0,0262616	0,400478
hsa-miR-27a-3p	0,014536	0,388314
hsa-miR-15b-5p	0,0529077	0,369855
hsa-let-7d-5p	0,0142847	0,368247
hsa-let-7e-5p	0,0220732	0,361966
hsa-miR-378a-3p	0,0510798	0,328879
hsa-miR-193b-3p	0,0140986	0,3107
hsa-miR-149-5p	0,000868693	0,307588
hsa-miR-23b-3p	0,0224784	0,304554
hsa-let-7a-5p	0,00928703	0,300714
hsa-miR-150-5p	0,0137445	0,23293
hsa-miR-126-3p	0,046466	0,228604
hsa-miR-29b-3p	0,000145435	0,214468
hsa-miR-193a-5p	0,02811	0,209895
hsa-miR-144-3p	0,0445442	0,19871
hsa-miR-133b	0,335695	0,31357
hsa-miR-122-5p	0,167712	1,587087
hsa-miR-20b-5p	0,262528	0,675062
hsa-miR-335-5p	0,461632	3,386935
hsa-miR-196a-5p	0,927036	0,944404
hsa-miR-125a-5p	0,224345	0,497663
hsa-miR-142-5p	0,125767	0,62655
hsa-miR-96-5p	0,269705	15,394783
hsa-miR-222-3p	0,26002	0,480081
hsa-miR-184	0,66493	1,570172
hsa-miR-15a-5p	0,586719	1,337744

hsa-miR-205-5p	0,251677	2,211787
hsa-miR-181a-5p	0,654047	1,138898
hsa-miR-130a-3p	0,526952	0,603636
hsa-miR-140-5p	0,160094	0,332423
hsa-miR-146b-5p	0,139179	3,528917
hsa-miR-132-3p	0,23005	0,634674
hsa-miR-183-5p	0,358727	2,142435
hsa-miR-34c-5p	0,311221	2,72403
hsa-miR-30c-5p	0,257171	0,399597
hsa-miR-148a-3p	0,793913	1,130063
hsa-miR-134-5p	0,390518	0,801686
hsa-let-7g-5p	0,466631	0,478235
hsa-miR-138-5p	0,55658	0,761825
hsa-miR-373-3p	0,558944	2,50892
hsa-miR-218-5p	0,295325	0,373911
hsa-miR-206	0,504377	1,812044
hsa-miR-124-3p	0,228137	4,287044
hsa-miR-21-5p	0,71928	0,788837
hsa-miR-181d-5p	0,840056	0,951973
hsa-miR-301a-3p	0,96508	0,980197
hsa-miR-200c-3p	0,375469	1,624343
hsa-miR-100-5p	0,878348	0,902323
hsa-miR-10b-5p	0,486444	0,602054
hsa-miR-155-5p	0,969795	0,9795
hsa-miR-1-3p	0,245724	0,502356
hsa-let-7i-5p	0,281852	0,548448
hsa-miR-27b-3p	0,188666	0,533748
hsa-miR-7-5p	0,672597	1,175478
hsa-miR-29a-3p	0,157753	0,324655
hsa-miR-191-5p	0,59989	0,641344
hsa-miR-9-5p	0,754466	1,273024
hsa-let-7f-5p	0,392051	0,486891
hsa-miR-10a-5p	0,383882	0,519175
hsa-miR-181b-5p	0,964857	1,010414
hsa-miR-16-5p	0,822846	0,886003
hsa-miR-17-5p	0,371495	0,707711
hsa-miR-98-5p	0,25012	0,438424
hsa-miR-34a-5p	0,204772	2,559137
hsa-miR-25-3p	0,443427	0,785642

hsa-miR-128-3p	0,252897	0,664744
hsa-miR-143-3p	0,178185	0,290514
hsa-miR-210-3p	0,268978	1,547271
hsa-miR-19a-3p	0,919902	0,945891
hsa-miR-18a-5p	0,792634	1,064746
hsa-miR-125b-5p	0,166718	0,684505
hsa-miR-203a-3p	0,386307	0,367614
hsa-miR-32-5p	0,436947	0,80604
hsa-miR-181c-5p	0,259433	0,737781
SNORD61	0,869921	0,927034
SNORD68	0,365276	0,703948
SNORD72	0,724199	1,128359
RNU6-6P	0,849092	1,037606

Apêndice 5 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomioma variante e leiomioma

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-122-5p	0,0325759	10,309624
hsa-miR-372-3p	0,00512457	7,464555
hsa-miR-124-3p	0,0065523	3,119064
hsa-miR-210-3p	0,0132358	3,038778
hsa-miR-373-3p	0,0586824	2,107957
hsa-let-7b-5p	0,0821935	0,626336
hsa-miR-181c-5p	0,0840933	0,615707
hsa-miR-130a-3p	0,0821251	0,60222
hsa-miR-148a-3p	0,0875742	0,580521
hsa-miR-30c-5p	0,092595	0,561992
hsa-miR-27a-3p	0,0660768	0,551724
hsa-let-7d-5p	0,0930807	0,544733
hsa-let-7e-5p	0,0778915	0,488513
hsa-let-7a-5p	0,0642936	0,475465
hsa-miR-148b-3p	0,057322	0,461662
hsa-miR-214-3p	0,0239664	0,420833
hsa-miR-21-5p	0,0417824	0,417467
hsa-miR-27b-3p	0,0175455	0,366969
hsa-miR-23b-3p	0,0293509	0,349531
hsa-miR-218-5p	0,0269351	0,330783
hsa-miR-378a-3p	0,0381027	0,328586
hsa-miR-133b	0,130478	0,416718
hsa-miR-20b-5p	0,774539	0,916077
hsa-miR-335-5p	0,464587	2,280081
hsa-miR-196a-5p	0,248879	0,617039
hsa-miR-125a-5p	0,889705	0,96274
hsa-miR-142-5p	0,598638	1,228151
hsa-miR-96-5p	0,118877	10,833481
hsa-miR-222-3p	0,626035	0,864579
hsa-miR-92a-3p	0,941557	0,985088
hsa-miR-184	0,176951	1,910564
hsa-miR-15a-5p	0,188294	1,430834
hsa-miR-205-5p	0,149331	2,508693
hsa-miR-181a-5p	0,183931	0,626625
hsa-miR-140-5p	0,361228	0,706964
hsa-miR-20a-5p	0,455633	0,805655
hsa-miR-146b-5p	0,357149	1,540462
hsa-miR-132-3p	0,252209	0,688457
hsa-miR-193b-3p	0,184952	0,553934
hsa-miR-183-5p	0,805975	0,83367
hsa-miR-34c-5p	0,290215	0,502592
hsa-miR-134-5p	0,532024	0,848343
hsa-let-7g-5p	0,535949	0,817974
hsa-miR-138-5p	0,382431	1,597947
hsa-let-7c-5p	0,271932	0,668165

hsa-miR-29b-3p	0,394099	1,25408
hsa-miR-146a-5p	0,581743	0,844731
hsa-miR-135b-5p	0,999027	0,999366
hsa-miR-206	0,478571	2,585619
hsa-miR-181d-5p	0,902032	0,973567
hsa-miR-301a-3p	0,575299	0,824285
hsa-miR-200c-3p	0,310436	0,18393
hsa-miR-100-5p	0,738266	1,093226
hsa-miR-10b-5p	0,992728	1,005496
hsa-miR-155-5p	0,464076	1,269833
hsa-miR-1-3p	0,305611	0,566814
hsa-miR-150-5p	0,606118	0,802299
hsa-let-7i-5p	0,170847	0,680991
hsa-miR-7-5p	0,879513	1,062318
hsa-miR-127-5p	0,364402	0,852164
hsa-miR-29a-3p	0,981444	0,990388
hsa-miR-191-5p	0,740419	0,911318
hsa-miR-9-5p	0,182604	0,462683
hsa-let-7f-5p	0,499633	0,79697
hsa-miR-10a-5p	0,879231	0,922777
hsa-miR-181b-5p	0,205808	0,723569
hsa-miR-15b-5p	0,190146	0,459712
hsa-miR-16-5p	0,447098	0,809702
hsa-miR-17-5p	0,269197	0,73083
hsa-miR-98-5p	0,67356	0,865903
hsa-miR-34a-5p	0,442166	0,688118
hsa-miR-25-3p	0,668028	1,157359
hsa-miR-144-3p	0,695988	1,320434
hsa-miR-128-3p	0,659615	1,10485
hsa-miR-143-3p	0,122456	0,49595
hsa-miR-19a-3p	0,307372	0,749943
hsa-miR-193a-5p	0,857744	0,949914
hsa-miR-18a-5p	0,550888	0,870302
hsa-miR-125b-5p	0,131542	0,664441
hsa-miR-126-3p	0,242613	0,59507
hsa-miR-149-5p	0,242682	0,707878
hsa-miR-203a-3p	0,243213	0,528538
hsa-miR-32-5p	0,689734	0,897018
SNORD61	0,793786	0,926825
SNORD68	0,382609	0,763218
SNORD72	0,831247	1,080177
RNU6-6P	0,404961	1,197588

Apêndice 6 - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de leiomiossarcoma uterino juntamente com o leiomioma e o leiomioma variante

miRNA	P value adj.	Fold Change
hsa-miR-206	0,0221571	3,1593382
hsa-miR-373-3p	0,00519721	2,7755556
hsa-miR-372-3p	0,022949	2,6455628
hsa-miR-124-3p	0,0273273	2,2583386
hsa-miR-25-3p	0,0109559	0,5699695
hsa-miR-193a-5p	0,0212753	0,5278316
hsa-miR-20b-5p	0,00846236	0,4779326
hsa-miR-32-5p	0,00776933	0,4743344
hsa-miR-29b-3p	0,019903	0,4709251
hsa-miR-132-3p	0,0187985	0,4684593
hsa-miR-128-3p	0,00358506	0,4509281
hsa-miR-34c-5p	0,0515773	0,4461512
hsa-miR-146a-5p	0,0101112	0,4407465
hsa-miR-92a-3p	0,000501987	0,4296376
hsa-miR-222-3p	0,00482163	0,4280206
hsa-miR-181b-5p	0,00348607	0,4277615
hsa-miR-20a-5p	0,00425211	0,4161571
hsa-miR-15b-5p	0,0450295	0,4096292
hsa-miR-196a-5p	0,0152285	0,4044583
hsa-miR-17-5p	0,00105734	0,3967673
hsa-miR-133b	0,05358	0,3816065
hsa-miR-149-5p	0,00075076	0,3788508
hsa-miR-98-5p	0,00344212	0,355232
hsa-miR-378a-3p	0,0144388	0,3512211
hsa-miR-9-5p	0,00727258	0,3354525
hsa-miR-21-5p	0,00333783	0,3265287
hsa-miR-16-5p	0,000179667	0,3043833
hsa-miR-19a-3p	9,71967E-05	0,2960401
hsa-miR-191-5p	2,43267E-05	0,2951649
SNORD72	0,000888082	0,2932242
hsa-miR-15a-5p	4,32081E-05	0,2920481
hsa-miR-146b-5p	0,000475066	0,2909558
hsa-miR-30c-5p	0,000195347	0,2863667
hsa-miR-214-3p	0,00025047	0,2597239
hsa-miR-181c-5p	0,000012598	0,2557341
hsa-miR-27a-3p	3,13847E-05	0,2553689
hsa-miR-181a-5p	4,75709E-05	0,2541746
hsa-miR-150-5p	0,00201982	0,2514878
hsa-miR-126-3p	0,000987702	0,2487695
hsa-let-7b-5p	2,46611E-05	0,2376354
RNU6-6P	2,47627E-06	0,2226443
SNORD61	1,10597E-05	0,21493
hsa-miR-140-5p	5,06466E-05	0,2129152
hsa-miR-1-3p	0,00672908	0,2070537

hsa-let-7d-5p	8,59451E-05	0,2043795
hsa-let-7i-5p	8,32748E-06	0,2042705
hsa-miR-193b-3p	9,92526E-05	0,1998996
hsa-miR-130a-3p	2,15544E-06	0,1994299
hsa-miR-143-3p	0,00127648	0,1890774
hsa-miR-10a-5p	0,0002462	0,1847121
hsa-miR-148b-3p	0,000055084	0,1839307
hsa-miR-218-5p	0,000325258	0,1775219
hsa-miR-29a-3p	1,12909E-06	0,1694045
hsa-miR-100-5p	4,31728E-07	0,1658691
hsa-let-7c-5p	1,39403E-05	0,1625201
SNORD68	4,80157E-07	0,1577005
hsa-let-7g-5p	8,05999E-06	0,1563321
hsa-miR-335-5p	0,00265719	0,1557409
hsa-miR-125a-5p	0,000001119	0,1517133
hsa-miR-148a-3p	2,11378E-07	0,1462737
hsa-let-7f-5p	6,11615E-06	0,1459186
hsa-miR-10b-5p	0,000284551	0,1287276
hsa-miR-125b-5p	3,63617E-07	0,1238647
hsa-let-7e-5p	5,80132E-06	0,1222352
hsa-let-7a-5p	8,60718E-06	0,1201434
hsa-miR-23b-3p	0,000032501	0,1194025
hsa-miR-27b-3p	1,29183E-06	0,1053303
hsa-miR-34a-5p	3,58948E-07	0,0948313
hsa-miR-135b-5p	4,17145E-06	0,0932877
hsa-miR-122-5p	0,680766	1,2343326
hsa-miR-142-5p	0,486374	0,8195094
hsa-miR-96-5p	0,417255	0,4896429
hsa-miR-184	0,282552	0,6131351
hsa-miR-205-5p	0,416537	0,6824806
hsa-miR-183-5p	0,106563	3,0042255
hsa-miR-134-5p	0,187051	0,7259939
hsa-miR-138-5p	0,69734	1,1531774
hsa-miR-181d-5p	0,129297	0,7195463
hsa-miR-301a-3p	0,125182	0,6342664
hsa-miR-200c-3p	0,53011	0,6865646
hsa-miR-155-5p	0,44555	0,8020515
hsa-miR-7-5p	0,431599	0,7863168
hsa-miR-127-5p	0,875265	1,0341905
hsa-miR-144-3p	0,252392	1,8174371
hsa-miR-210-3p	0,229475	5,979287
hsa-miR-18a-5p	0,134728	0,7165096
hsa-miR-203a-3p	0,536349	0,765852