LAURA GONZALEZ DOS ANJOS

**Estudo da expressão de microRNAs em amostras de
carcinossarcomas e sarcomas uterinos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Anjos, Laura Gonzalez dos

Estudo da expressão de microRNAs em amostras de carcinossarcomas e sarcomas uterinos / Laura Gonzalez dos Anjos. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Leiomiossarcoma 2.Carcinossarcoma 3.Sarcoma do estroma endometrial 4.Adenossarcoma 5.microRNAs 6.Reação em cadeia da polimerase em tempo real

USP/FM/DBD-417/16

Aos meus pais, **Maria Aparecida Gonzalez dos Anjos e Aldeny Benedito dos Anjos**, e ao meu irmão **Henrique Gonzalez dos Anjos**, por todo amor e incentivo.

A **Deus** por conduzir meu caminho e ajudar a vencer obstáculos.

Ao meu amor **Gustavo Polidori**, por ter vivido comigo todas as alegrias e dificuldades durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edmund C. Baracat por todo suporte intelectual e infraestrutura para realização desse trabalho.

À minha querida orientadora de mestrado Dra. Kátia Candido Carvalho, primeiramente pela oportunidade de ingressar na pós-graduação, contribuindo desta forma com meu crescimento profissional. Obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos compartilhados e pela impecável condução deste projeto.

Ao Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel, Dr. Nilo Bozzini e Dra. Iara Moreno Linhares pela contribuição com as correções desse projeto, participando da banca de qualificação.

Aos funcionários e amigos do LIM-58: Thiago Hideki, Marinalva de Almeida, Juciara Costa, Anamaria Ritti, Bruna Cristine de Almeida, Kelly Pedrozo, Leonardo Tomiatti e especialmente à Natalia Garcia por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que vou levar para sempre comigo.

Aos funcionários da Disciplina e do Departamento Obstetrícia e Ginecologia.

Aos meus pais, Aldeny e Maria e ao meu irmão Henrique por todo o carinho, incentivo e cooperação que sempre tive. Vocês são a base de tudo para mim.

Ao meu namorado Gustavo Polidori, por todo o amor, companheirismo e compreensão. Obrigada por estar comigo em todos os momentos auxiliando-me e zelando por mim.

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha e Dr. André Mourão Lavorato da Rocha, pela oportunidade que tive de participar da equipe de alunos do departamento de patologia do AC Camargo Cancer Center, onde tive meu primeiro contato com a pesquisa oncológica e que me estimulou a seguir nessa área. Sempre serei grata pelos ensinamentos que adquiri durante esse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.

Augusto Cury

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 Introdução	2
1.1 Sarcomas e carcinosarcomas uterinos.....	2
1.2 Estadiamento clínico.....	4
1.3 Prognóstico e sobrevida.....	6
1.4 Diagnóstico e tratamento padrão	7
1.5 Principais características dos tipos histológicos de tumores incluídos nesse estudo	9
1.5.1 Leiomiossarcomas (LMS)	9
1.5.2 Carcinosarcomas (CS).....	11
1.5.3 Sarcomas do Estroma Endometrial (SEE).....	12
1.5.4 Adenossarcomas (AS).....	14
1.6 Os microRNAs	16
1.7 microRNAs e câncer	18
1.8 microRNAs em sarcomas	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Gerais	26
2.2 Específicos	26
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	28
3.1 Casuística	28
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Extração de RNA das amostras e eliminação do DNA genômico.....	29
3.2.2 Reação de transcrição reversa (síntese de DNA complementar)	31
3.2.3 Reação de PCR em tempo real	32
1.5.1 Análise dos resultados da PCR em tempo real	35
1.5.1 Análise estatística.....	36

4 RESULTADOS.....	40
4.1 Descrição dos dados clínicos e anatomopatológicos	41
4.2 Análise da expressão dos miRNAs	44
4.3 Associação da expressão dos miRNAs com os dados clínicos e anatomopatológicos	55
4.4 Associação da expressão dos miRNAs das pacientes que realizaram tratamento adjuvante com os dados de metástase/recidiva e SLD.....	64
4.5 Redes de interação entre os miRNAs e seus principais alvos moleculares envolvidos com o desenvolvimento do câncer	67
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	93
7 ANEXOS	96
ANEXO A	96
8 REFERÊNCIAS.....	98
9 APÊNDICE	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAM10	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 10</i>
AGO2	Proteína Argonauta2
AGT	Angiotensinogênio
AIB1	<i>Amplified in breast 1</i>
AKT	Proteína Kinase B
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APPL1	<i>Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with PH Domain And Leucine Zipper 1</i>
AS	Adenossarcoma
BCL-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BRCA1	<i>Breast Cancer 1, Early Onset</i>
CA-125	<i>Cancer antigen 125</i>
c-ABI	<i>Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase</i>
CASP3	Caspase 3
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
CCND2	Ciclina D2
CD10	<i>Lymphoblastic leukemia antigen</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CDK4	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
cDNA	DNA complementar
CEP/FMUSP	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP
C-Kit	<i>V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
c-Myc	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>

COX2	Ciclo-oxigenase-2
CRYM	<i>Crystallin Um</i>
CS	Carcinossarcoma
CXCL-1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CYP1B1	<i>Cytochrome P450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1</i>
DDIT3	<i>DNA Damage Inducible Transcript 3</i>
DGCR8	<i>DGCR8 Microprocessor Complex Subunit</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	Estradiol
E2F1	<i>E2F Transcription Factor 1</i>
E2F2	<i>E2F Transcription Factor 2</i>
E2F3	<i>E2F Transcription Factor 3</i>
EC	Estádio clínico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGR2	<i>Early Growth Response 2</i>
EP300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
ERα	<i>Estrogen receptor alpha</i>
ERβ	<i>Estrogen receptor beta</i>
ETS1	<i>ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOLR3	<i>Folate Receptor 3 (Gamma)</i>
FOXO1	<i>Forkhead Box O1</i>
FSCN1	<i>Fascin Actin-Bundling Protein 1</i>
FZD6	<i>Frizzled Class Receptor 6</i>
FZD7	<i>Frizzled Class Receptor 7</i>
GJA1	<i>Gap Junction Protein Alpha 1</i>
GTF2A1	<i>General Transcription Factor IIA Subunit 1</i>
H.E	Hematoxilina e Eosina

H3K9	<i>Histone H3 lysine 9</i>
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMGA1	<i>High Mobility Group AT-Hook 1</i>
HMGA2	<i>High Mobility Group AT-Hook 2</i>
HOXA9	<i>Homeobox A9</i>
HOXD10	<i>Homeobox D10</i>
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
IGF1R	<i>Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
JAZF1	<i>JAZF Zinc Finger 1</i>
Ki-67	Proteína nuclear associada à proliferação celular
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LIM	Laboratório de investigação médica
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMS	Leiomiossarcoma
MAP3K1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1</i>
MED12	<i>Mediator Complex Subunit 12</i>
MIB1	Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
miRNA	MicroRNA
MITF	<i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MM	Miométrio
MMMT	Tumor mülleriano misto maligno
MMP14	<i>Matrix Metalloproteinase 14 (Membrane-Inserted)</i>
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>
MnCl₂	Cloreto de manganês

mRNA	RNA mensageiro
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS Homolog 6</i>
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NEE	Nódulo do Estroma Endometrial
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
Nurr1	<i>Nuclear acceptor Subfamily 4 Group A Member 2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX8	<i>Paired Box 8</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFr	<i>Platelet-derived growth factor receptors</i>
PIK3C	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase subunits</i>
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RA	Receptor Androgênico
RE	Receptor de estrogênio
RELA	<i>RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>
RHOC	<i>Ras Homolog Family Member C</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RM	Ressonância magnética
RMS	Rabdomiossarcoma
RNA	Ácido ribonucléico
ROCK1	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
RP	Receptor de progesterona
RQ	<i>Relative Quantification</i>
SCE	Sobrevida câncer específica
SEE	Sarcoma do estroma endometrial

SEE-AG	Sarcoma do Estroma Endometrial de alto grau
SEE-BG	Sarcoma do Estroma Endometrial de baixo grau
SGK3	<i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Family Member 3</i>
SHMT1	<i>Serine Hydroxymethyltransferase 1</i>
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
snoRNA	Pequenos RNAs nucleolares
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
snRNA	Pequenos RNAs nucleares
SOGESP	Associação de obstetrícia e ginecologia de São Paulo
Stat3	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>
STUMP	Tumor do músculo liso de potencial maligno incerto
SUI	Sarcoma uterino indiferenciado
SUZ12	<i>SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
TAGLN	<i>Transgelin</i>
TDO2	<i>Tryptophan 2,3-Dioxygenase</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor, Beta</i>
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>
TMBNP	Tumor maligno da bainha do nervo periférico
TNN1	<i>Tenascin N</i>
TPM1	<i>Tropomyosina 1</i>
TRH	Terapia de reposição hormonal
TSPAN10	Tetraspanina 10
TWIST1	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VEGFr	<i>Vascular Endothelial Growth Factor receptor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>
Xpo5	Exportina 5

YWHAE	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, Epsilon</i>
YY1	<i>YY1 Transcription Factor</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação histológica dos sarcomas uterinos (WHO, 2014)	3
Tabela 2	Estadiamento FIGO para sarcomas uterinos, 2009	5
Tabela 3	Estadiamento FIGO para o carcinoma de endométrio e carcinossarcomas, 2009	6
Tabela 4	Componentes, e seus volumes utilizados na reação de transcrição reversa para cada amostra	31
Tabela 5	Componentes da reação de PCR em tempo real	33
Tabela 6	Condições de ciclagens utilizadas nas reações de PCR em tempo real em aparelho 7500 <i>Real-Time PCR Systems</i> (Life <i>Technologies, USA</i>)	35
Tabela 7	Características clínicas e anatomopatológicas das pacientes incluídas no estudo (n=100)	43
Tabela 8	Aspectos clínicos e anatomopatológicos de acordo com o tipo histológico de neoplasia avaliada.....	44
Tabela 9	Dados gerados pela plataforma SAbiosciences (QIAGEN), indicando o <i>fold regulation</i> dos microRNAs avaliados nos diferentes tipos de tumores, em relação ao grupo referência ...	45
Tabela 10	Associação entre a expressão dos miRNAs e os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes incluídas nas análises (n=80).....	58
Tabela 11	Análise de correlação entre a expressão do <i>miR-138-5p</i> , <i>miR-146b-5p</i> e <i>miR-218-5p</i> e a SLD das pacientes que realizaram tratamento adjuvante.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de processamento dos miRNAs	17
Figura 2	Mecanismos de desregulação da expressão ou função do miRNA.....	20
Figura 3	Fotomicrografias de lâminas coradas por H.E. dos tumores avaliados nesse estudo (40X). A – Leiomiossarcoma, B – carcinossarcoma, C -sarcoma do estroma endometrial, D – adenossarcoma.....	29
Figura 4	Esquema representativo da conversão seletiva de miRNAs maduros em cDNAs utilizando o tampão <i>miScript Hispec</i>	32
Figura 5	Esquema representativo da Placa de 96 poços utilizada nesse estudo. [Fonte: Qiagen. <i>miScript™ miRNA PCR Array Handbook</i>].	34
Figura 6	Fluxograma das amostras incluídas no estudo.	41
Figura 7	<i>Heatmap</i> apresentando o perfil de expressão dos 84 miRNAs nos tumores avaliados, em relação às amostras referência (miométrios). SEE, sarcoma do estroma endometrial, MM, grupo referência, AS, adenossarcomas CS, carcinossarcomas e LMS, leiomiossarcoma.	48
Figura 8	Gráficos de dispersão apresentando o perfil de expressão dos miRNAs entre as amostras de LMS (figura 8A), CS (figura 8B), SEE (figura 8C), AS (figura 8D) e o grupo referência (miométrio- MM)	50
Figura 9	Gráficos de dispersão apresentando o perfil de expressão dos miRNAs entre as amostras de LMS e CS (figura 9A), LMS e SEE (figura 9B), LMS e AS (figura 9C), CS e SEE (figura 9D), CS e AS (figura 9E) e SEE e AS (figura 9F).....	52

Figura 10	Gráficos mostrando as diferenças nos níveis de expressão do <i>hsa-miR-96-5p</i> , <i>hsa-miR-205-5p</i> , <i>hsa-miR-181a-5p</i> , <i>hsa-miR-135b-5p</i> , <i>hsa-miR-183-5p</i> e <i>hsa-miR-193b-3p</i> entre os sarcomas e carcinosarcomas uterinos.	54
Figura 11	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE em relação à expressão dos miRNAs <i>miR-196a-5p</i> (figura 11A), <i>miR-34c-5p</i> (figura 11B), <i>miR-125a-5p</i> (figura 11C) e <i>miR-10a-5p</i> (figura 11D) nos LMS.	60
Figura 12	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD em relação à expressão de <i>miR-135b-5p</i> nos LMS.	60
Figura 13	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE específica em relação à expressão de <i>miR-184</i> (figura 13A), <i>let-7b-5p</i> (figura 13B) e <i>miR-124-3p</i> (figura 13C) nos CS.	61
Figura 14	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD em relação à expressão do <i>miR-205-5p</i> nos CS.	62
Figura 15	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE em relação à expressão dos miRNAs <i>let-7b-5p</i> (figura 15A), <i>miR-138-5p</i> (figura 15B), <i>miR-373-3p</i> (figura 15C), <i>miR-372-3p</i> (figura 15D), <i>let-7f-5f</i> (figura 15E) e <i>miR-23b-3p</i> (figura 15F) nos SEE-AG.	63
Figura 16	Curva de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD em relação à expressão do <i>miR-9-5p</i> nos SEE-AG.	64
Figura 17	miRNAs que apresentaram diferença de expressão significativa entre pacientes que realizaram tratamento adjuvante com ou sem metástase/recidiva.	65
Figura 18	miRNAs que apresentaram diferença de expressão entre as pacientes com LMS e foram tratadas, sendo ou não cometidas por metástase/recidiva.	65
Figura 19	Diferença de expressão do <i>miR-335-5p</i> , <i>miR-301a-3p</i> e <i>miR-210-3p</i> entre as pacientes com CS e foram tratadas, sendo ou não acometidas por metástase/recidiva.	66

Figura 20	Gráfico de dispersão mostrando a associação entre a expressão do <i>miR-138-5p</i> das pacientes que fizeram tratamento adjuvante, com a SLD (em meses).	67
Figura 21	Rede de interação do <i>miR-96-5p</i> com seus alvos moleculares.....	68
Figura 22	Rede de interação do <i>miR-373-3p</i> com seus alvos moleculares.....	69
Figura 23	Rede de interação do <i>miR-9-5p</i> com seus alvos moleculares...	70
Figura 24	Rede de interação do <i>hsa-let-7a-5p</i> com seus alvos moleculares.....	71
Figura 25	Rede de interação do <i>miR-205-5p</i> com seus alvos moleculares.....	72

RESUMO

Anjos LG. *Estudo da expressão de miRNAs em amostras de carcinossarcomas e sarcomas uterinos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Os sarcomas uterinos constituem uma forma rara de neoplasia maligna que compreende cerca de 3% de todos os cânceres uterinos. Os fatores de risco são pouco conhecidos e as formas de tratamento escassas, sendo o papel da quimioterapia e radioterapia limitado. Nesse contexto, torna-se importante a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese, tanto para diagnóstico e prognóstico mais precisos, quanto para ampliar os avanços terapêuticos. Um dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de cânceres é a regulação da expressão gênica por microRNAs (miRNAs), que são pequenas moléculas de RNAs não-codificantes que desempenham papéis importantes em várias vias biológicas. Alterações na expressão de miRNAs podem acarretar em diversas doenças incluindo o câncer. Poucos trabalhos foram realizados, até o momento, no sentido de esclarecer a regulação ou expressão de miRNAs nos sarcomas uterinos. **Objetivo:** Avaliar a expressão de miRNAs relacionados ao desenvolvimento de tumores em amostras de carcinossarcomas e sarcomas do útero. **Métodos:** Foram selecionadas 100 amostras incluindo: 56 leiomiossarcomas (LMS), 24 carcinossarcomas (CS), 18 sarcomas do estroma endometrial (SEE) e 2 adenossarcomas (AS). O RNA total de amostras incluídas em parafina foi obtido e utilizado para realização da síntese de cDNA. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando o *Kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen)* para análise a partir de 84 sequências de miRNAs já descritos na literatura para outros tipos de cânceres. Foram analisados dados clínicos como idade, sintomas principais, uso de contraceptivo oral, estado menopausal, terapia de reposição hormonal, tabagismo, tratamento cirúrgico, tratamento adjuvante, metástase, grau histológico, recorrência, óbito e estadiamento. Os resultados foram tabulados nos softwares SPSS e GraphPad Prism 5.01. **Resultados:** Observamos miRNAs que apresentaram diferentes perfis de expressão nos tumores, em comparação com o tecido referência (miométrio). Dentre 42 miRNAs que apresentaram diferenças de expressão nos sarcomas e carcinossarcomas uterinos, 6 destacaram-se por apresentar diferenças significativas entre os tipos histológicos: *miR-96-5p* ($p < 0,001$; LMSxCS), *miR-205-5p* ($p = 0,016$; CSxSEE), *miR-181a-5p* ($p = 0,010$; CSxLMS), *miR-135b-5p* ($p = 0,018$; CSxLMS), *miR-183-5p* ($p = 0,012$; CSxLMS) e *miR-193b-3p* ($p = 0,008$; CSxLMS). Diversas associações entre a hiper ou hipoexpressão dos miRNAs com as variáveis clínicas coletadas foram constatadas. A expressão de 12 miRNAs foram associadas com sobrevida global e 3 com sobrevida câncer específica. Maior expressão de *miR-335-5p*,

miR-301a-3p e *miR-210-3p* foi encontrada em amostras de pacientes que realizaram tratamento adjuvante e desenvolveram metástase ou recidiva, para as quais observamos a expressão de *miR-138-5p*, *miR-146b-5p* e *miR-218-5p* associada com maior sobrevida livre de doença. Conclusão: Em conjunto, os resultados sugerem que a caracterização dos miRNAs possui papel promissor para fins diagnóstico, prognóstico e até terapêuticos nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos.

Descritores: leiomiossarcoma; carcinosarcoma; sarcoma do estroma endometrial; adenossarcoma; microRNA; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Anjos LG. *Study of the expression of miRNAs in carcinosarcomas and uterine sarcomas samples* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: The uterine sarcomas are a rare form of malignancy comprising about 3% of all uterine cancers. Risk factors are not well known and the treatment forms are scarce, being the role of chemotherapy and radiotherapy limited. In this context, it becomes important the comprehension of the molecular mechanisms involved in the carcinogenesis process, as for more accurate diagnosis and prognosis, as to broaden the therapeutic advances. One of the molecular mechanisms involved in cancer development is the regulation of gene expression by microRNAs (miRNAs), which are small molecules of non-coding RNAs that play important roles in some biological pathways. Alterations in miRNA expression could result in some diseases, including cancer. Few studies were performed until present time, to clarify the miRNAs regulation or expression in uterine sarcomas. **Objective:** To evaluate the expression of miRNAs related to development of tumors in carcinosarcoma and uterine sarcomas samples. **Methods:** 100 samples were evaluated including: 56 leiomyosarcomas (LMS), 24 carcinosarcomas (CS), 18 endometrial stromal sarcomas (ESS) and 2 adenosarcomas (AS). The total RNA from paraffin-embedded samples were obtained and used to cDNA synthesis. The real time PCR reactions, was performed using the miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) for analysis of 84 sequences already described in literature in other types of cancer. Were analyzed clinical data such as age, main symptoms, oral contraceptive use, menopausal status, hormone replacement therapy, smoking, underlying pathology, surgical treatment, adjuvant treatment, metastasis, histological grade, recurrence, death and staging. The results were tabulated in the SPSS and Graphpad Prism 5.01. **Results:** We observed miRNAs that showed different expression profiles in tumors compared to the reference tissue (myometrium). Among 42 miRNAs that showed different expression in uterine sarcomas and carcinosarcomas, 6 stood out for showing significant differences among the histological types: *miR-96-5p* ($p<0,001$; LMSxCS), *miR-205-5p* ($p=0,016$; CSxSEE), *miR-181a-5p* ($p=0,010$; CSxLMS), *miR-135b-5p* ($p=0,018$; CSxLMS), *miR-183-5p* ($p=0,012$; CSxLMS) e *miR-193b-3p* ($p=0,008$; CSxLMS). Many associations between overexpression or hypoexpression of miRNAs with the clinical variables collected were found. The expression of 12 miRNAs were associated with cancer-specific survival and 3 with disease-free survival. It were also found, increased expression of *miR-335-5p*, *miR-301a-3p* and *miR-210-3p* in samples of patients who underwent adjuvant treatment and developed metastasis or recurrence, and correlation analysis showed that the expression of *miR-138-5p*, *miR-146b-5p* and *miR-218-*

5p are associated with higher disease-free survival of treated patients.
Conclusion: The results suggest that the characterization of miRNAs have a promising role for purposes of diagnosis, prognosis and therapeutic for the uterine sarcomas and carcinosarcomas.

Descriptors: leiomyosarcoma; carcinosarcoma; endometrial stromal sarcoma; adenosarcoma; microRNA; real-time polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sarcomas e carcinosarcomas uterinos

Os sarcomas uterinos constituem forma rara de neoplasia que compreende de 3 a 7% de todas as malignidades uterinas e representam cerca de 1% de todos os tumores ginecológicos (D'Angelo e Prat, 2010). Sua incidência é de 1,7 a cada 100.000 mulheres (Naaman *et al.*, 2011). A sociedade Americana de Câncer estima para o ano de 2016 o surgimento de 60.050 novos casos de câncer do corpo uterino nos Estados Unidos, sendo cerca de 1.600 desses casos diagnosticados como sarcomas (ACS, 2016).

Esses tumores podem ser provenientes do músculo liso no miométrio (leiomiossarcoma-LMS), do estroma endometrial (sarcoma de estroma endometrial-SEE e sarcoma uterino indiferenciado-SUI) ou de ambos (adenosarcoma-AS) (Santos e Cunha, 2015).

De modo geral, essas neoplasias caracterizam-se por rápida progressão com altas taxas de recidiva local, metastização à distância e mau prognóstico com sobrevida global em dois anos inferior a 50%, mesmo quando diagnosticadas precocemente (Livi *et al.*, 2003).

Histologicamente, os sarcomas uterinos foram inicialmente classificados em: carcinosarcomas (tumor mülleriano misto maligno), representando 50% dos casos; leiomiossarcomas, 30% dos casos; sarcoma do estroma endometrial, 15%; e sarcomas indiferenciados, 5%. Atualmente, os carcinosarcomas (CS) são classificados como uma forma metaplásica de carcinoma endometrial, porém, devido ao seu comportamento mais agressivo, ainda são incluídos na maioria dos estudos retrospectivos, bem como na seção de tumores mistos epitelial/mesenquimal proposta pela WHO- *World Health Organization* em 2014 (WHO, 2014; Prat e Mbatani, 2015).

De acordo com a WHO (WHO, 2014), os sarcomas uterinos estão divididos em dois grupos principais: tumores mesenquimais e tumores mistos. A classificação atualizada desses tumores é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação histológica dos sarcomas uterinos (WHO, 2014)

I. Tumores Mesenquimais (puros)
A. Tumores do Estroma Endometrial
1. Nódulo Estromal Endometrial (NEE)
2. Sarcoma do Estroma Endometrial de baixo grau (SEE-BG)
3. Sarcoma do Estroma Endometrial de alto grau (SEE-AG)
4. Sarcoma uterino indiferenciado (SUI)
B. STUMP – Tumor de músculo liso de potencial maligno incerto
C. Leiomiomas e suas variantes
D. Leiomiossarcoma
1. Epitelióide
2. Mixóide
II. Tumores Mistos (epiteliais e mesenquimais)
A. Adenossarcoma
1. Homólogo
2. Heterólogo
3. Alto Grau de Crescimento Estromal
B. Carcinossarcomas (tumores müllerianos mistos malignos)
4. Homólogo
5. Heterólogo

1.2. Estadiamento

O estadiamento clínico é o fator mais importante para estabelecer o prognóstico das pacientes. Anteriormente, um sistema modificado para o estadiamento de carcinomas endometriais era utilizado para os sarcomas uterinos, no entanto, devido às diferenças no comportamento biológico, esse sistema tornou-se obsoleto (Yim *et al.*, 2014; Prat e Mbatani, 2015).

O Comitê de Oncologia da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) reconheceu que a classificação utilizada já não era útil, uma vez que um número maior de informações tornou-se disponível e estas malignidades poderiam assim, ser classificadas individualmente. Dessa forma, a FIGO, em 2009, designou o estadiamento que atualmente se aplica aos sarcomas uterinos, esse sistema possui duas novas divisões: uma contendo os LMS e os SEE e outra os casos de AS. Os CS continuam sendo estadiados de acordo com o sistema utilizado para classificar os carcinomas endometriais (Prat, 2009; Piura, 2011).

De acordo com as novas regras estabelecidas, o estágio I é subdividido de acordo com o tamanho tumoral (< 5 cm vs. > 5 cm) em casos de LMS e SEE. O envolvimento anexial está agora incluído no estágio II. Antigamente essa subdivisão era feita considerando a profundidade de invasão miometrial que continua sendo válida para a subdivisão do estágio I nos AS (Piura, 2011; Yim *et al.*, 2014).

O novo sistema estipulado pela FIGO está apresentado na Tabela 2 e o estadiamento para o carcinoma de endométrio e carcinosarcomas está descrito na Tabela 3.

Tabela 2- Estadiamento FIGO para sarcomas uterinos, 2009

Estádio	Características
Leiomiossarcomas e sarcomas do estroma endometrial	
I	Tumor limitado ao útero
IA	< 5 cm
IB	> 5 cm
II	Tumor com Extensão à Pelve
IIA	Envolvimento de Anexos
IIB	Extensão ao tecido pélvico extrauterino
III	Tumor invade os tecidos abdominais
IIIA	Um sítio
IIIB	> Um sítio
IIIC	Metástase aos linfonodos pélvicos ou para-aórticos
IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ ou reto
IVB	Metástases à distância
Adenossarcomas	
I	Tumor limitado ao útero
IA	Tumor limitado a endométrio/ colo uterino sem invasão miometrial
IB	Invasão igual ou inferior à metade do miométrio
IC	Invasão de mais da metade do miométrio
II	Tumor com Extensão à Pelve
IIA	Envolvimento de Anexos
IIB	Extensão ao tecido pélvico extrauterino
III	Tumor invade os tecidos abdominais
IIIA	Um sítio
IIIB	> Um sítio
IIIC	Metástase aos linfonodos pélvicos ou para-aórticos
IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ ou reto
IVB	Metástases à distância

FONTE: Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Inter J GynaecolObstet.* 2009;104(3):177-8.

Tabela 3- Estadiamento FIGO para o carcinoma de endométrio e carcinosarcomas, 2009

Estádio	Características
I	Tumor restrito ao corpo uterino
IA	Invasão de menos da metade do miométrio
IB	Invasão de no mínimo metade do miométrio
II	Tumor invade o estroma do colo uterino, mas não se estende além do útero
III	Disseminação local e/ou regional do tumor
IIIA	Tumor invade a serosa do corpo uterino e/ ou anexos
IIIB	Envolvimento de vagina e/ ou paramétrios
IIIC	Metástase aos linfonodos pélvicos e/ ou para-aórticos
IIIC1	Linfonodos pélvicos positivos
IIIC2	Linfonodos para-aórticos positivos com ou sem linfonodos pélvicos positivos
IV	Tumor invade bexiga e/ ou intestino e/ ou metástase à distância
IVA	Invasão tumoral de mucosa vesical e/ ou intestinal
IVB	Metástases à distância, incluindo metástase intra-abdominal e/ ou para linfonodos inguinais

FONTE: Amant *et al.* FIGO Cancer Report 2012. *Int J Gynecol Obstetr.* 2012;119S2(2012):S110-7.

1.3. Prognóstico e sobrevida

Em comparação com os tipos mais comuns de cânceres endometriais, mulheres com sarcoma uterino apresentam pior prognóstico devido à agressividade desta neoplasia. Os fatores prognósticos mais importantes incluem o estágio tumoral, tipo histológico, grau histológico, invasão vascular e linfática e *status* menopausal (O'Neill *et al.*, 2007; Sait *et al.*, 2014).

Alguns autores observaram que a maioria das pacientes com sarcomas uterinos, são diagnosticadas em estágio I. A taxa de sobrevida em 5 anos, em relação ao estágio tumoral, é de: nos estádios I e II associados: 73,1%, estádios III e IV associados: 22,2%. Apesar dos avanços em métodos de

diagnóstico e tratamento, a sobrevida das pacientes não tem apresentado melhora ao longo dos últimos 25 anos (Piura, 2011; Tropé, *et al.*, 2012).

Com relação aos tipos histológicos, a natureza agressiva dos LMS se reflete diretamente nas baixas taxas de sobrevida, sendo de 51% em pacientes em estágio I e apenas 25% em pacientes em estágio II. Sarcomas do estroma endometrial de baixo grau (SEE-BG) apresentam bom prognóstico, com sobrevida de 60% a 90% em 5 anos em todos os estádios, diferentemente dos sarcomas do estroma endometrial de alto grau (SEE-AG), que apresentam sobrevida de aproximadamente 55% em 5 anos, com alto risco de recorrência (Norris e Taylor, 1966; Hensley, 2012). Os SUI representam os tumores mais agressivos presentes na classificação dos tumores do estroma endometrial. As pacientes no estágio I apresentam sobrevida de 57% em 5 anos e todas as pacientes em estádios mais avançados foram a óbito (Abeler *et al.*, 2009; Tropé *et al.*, 2012)

A estimativa de sobrevida para pacientes com CS é de 33 a 39% em 5 anos com altas taxas de recorrência (Cantrell *et al.*, 2015). Já os AS (na ausência de super crescimento sarcomatoso) apresentam taxas de sobrevida bastante favoráveis, sendo superior a 90% em 5 anos, porém, em casos de metástase, a sobrevida diminui para 43% em 5 anos (Abeler *et al.*, 2009; Hensley, 2012).

1.4. Diagnóstico e tratamento padrão

Devido à ausência de sintomas específicos associados aos sarcomas uterinos, a maioria dos casos são detectados incidentalmente ao examinar o espécime após a histerectomia ou após a doença atingir um estado avançado com o aparecimento de sintomas secundários (como por exemplo, a dispnéia devido à metástase pulmonar) (Denschlag *et al.*, 2015).

Níveis elevados de lactato desidrogenase (LDH) e do antígeno CA 125 podem ser úteis para o diagnóstico pré-operatório. A citologia endometrial anormal também pode ser encontrada em pacientes com sarcomas uterinos (Nagai, *et al.*, 2014).

Procedimentos de imagem podem ser utilizados para diagnosticar essas neoplasias, sendo adequados para avaliação da profundidade de invasão, extensão da infiltração de órgãos adjacentes, envolvimento ganglionar e a presença de outras metástases pélvicas (Santos e Cunha, 2015; Denschlag *et al.*, 2015).

A ressonância magnética (RM) pode demonstrar a presença de tumores mesenquimais como uma massa uterina de aspecto hemorrágico contendo focos de necrose. Estas características podem ser evidenciadas através do contraste gadolínio-DTPA, porém, a distinção entre tumores malignos e leiomiomas continua sendo um desafio (Seddon e Davda, 2011).

O diagnóstico também requer revisão patológica do útero a fim de caracterizar a extensão da invasão do miométrio. As amostras devem ser cuidadosamente analisadas por imunoistoquímica e, se necessário, podem ser utilizados procedimentos de patologia molecular (Dizon e Birrer, 2014; Denschlag *et al.*, 2015).

A cirurgia representa o principal método diagnóstico e de tratamento. A histerectomia total com salpingooforectomia bilateral é inicialmente realizada, com exceção nos casos onde a preservação do útero em pacientes jovens é considerada segura para o tipo de neoplasia apresentada (como por exemplo: mulheres em idade fértil com leiomiossarcoma de baixo grau) (Naaman *et al.*, 2011; PDQ, 2015).

A importância da dissecação linfonodal varia de acordo com a histologia do tumor, a linfadenectomia pélvica ou para-aórtica não tem se mostrado útil nas mulheres com LMS ou SUI. Já nos SEE seu papel não é claro, podendo ser realizada uma dissecação seletiva de linfonodos para-aórticos (Shah *et al.*, 2008).

A terapia adjuvante (quimioterapia e radioterapia) não parece trazer benefícios para as pacientes. Porém, nos LMS uterinos, a radioterapia adjuvante reduz a incidência de recorrência local, sem alterar a sobrevida global. A terapia hormonal para SEE já foi testada, sendo os benefícios ainda limitados (Puliyath e Nair, 2012; Sivakumari *et al.*, 2015).

Quanto aos tratamentos biomoleculares, Sleijfer e colaboradores (2009) demonstraram que a administração de Pazopanib, um inibidor da angiogênese

(cujos alvos são: VEGFR, PDGFR e c-kit), apresentou melhora na sobrevida livre de progressão (SLP) das pacientes com LMS em aproximadamente 3 meses, sendo aprovado para uso em sarcomas de tecidos moles (Sleijfer *et al.*, 2009).

Para os SEE, a terapia dirigida para a proteína c-Abl pode ser um potencial tratamento, uma vez que esse marcador é universalmente expresso nessa neoplasia (Novetsky e Powell, 2013).

Nos CS, a imunoistoquímica tem sido utilizada em muitos estudos, a fim de identificar potenciais marcadores e alvos terapêuticos. Os marcadores p27, p53, p16, c-KIT, COX2, EGFR, HER2/neu, AKT, PIK3C e PAX8 são todos expressos neste tumor, porém ainda não há alvos terapêuticos que sejam realmente eficazes (Menczer, 2015).

A análise imunoistoquímica nos AS uterinos mostrou a expressão de CD10, WT1, RE, RP, receptor androgênico (RA), citoqueratina e marcadores musculares. No entanto, a identificação de perfis genéticos e de expressão ainda são necessários para estabelecer uma terapia apropriada e individualizada para essa neoplasia (Amant *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2013).

O tratamento dos sarcomas uterinos deve ser individualizado e muitas vezes requer a integração de diferentes modalidades terapêuticas. O planejamento da terapia deve levar em consideração o benefício limitado dos tratamentos disponíveis, seus efeitos secundários e o impacto na qualidade de vida das pacientes (Gadducci *et al.*, 2008).

1.5. Principais características dos tipos histológicos

1.5.1. Leiomiossarcomas (LMS)

Trata-se do tipo de sarcoma uterino mais comum que representa cerca de 1- 3% de todas as malignidades desse órgão e um terço de todos os sarcomas do útero. São notórios por sua agressividade e mau prognóstico. Isto pode ser devido a sua localização no miométrio que permite uma maior vascularização,

disseminação hematogênica e metástases generalizadas, principalmente pulmonares, até 2 anos após a terapia primária. (Harry *et al.*, 2007; Chiang e Oliva, 2013; Amant, *et al.*, 2015).

Os critérios histopatológicos de identificação dos LMS permanecem controversos. Mais de 15 mitoses a cada 10 campos, necrose e atipia citológica (moderada a grave), são achados comuns. Muitos tumores benignos do músculo liso podem assemelhar-se às características dos LMS. Em casos raros, pode ser impossível diferenciar tumores benignos, malignos e *STUMPs* (tumores de músculo liso de potencial maligno incerto), sendo indicada a imunoistoquímica (Chiang e Oliva, 2013; Gockley *et al.*, 2014).

A maioria dos LMS são diagnosticados no estágio I (68%), enquanto 3%, 7% e 22% são diagnosticados nos estágios II, III e IV respectivamente (Kapp *et al.*, 2008). A média de idade para o desenvolvimento deste tumor é de 60 anos, sendo o sangramento vaginal anormal, dor abdominal, corrimento vaginal, maior frequência urinária, constipação e distensão abdominal, alguns dos sintomas apresentados (Gockley *et al.*, 2014).

O diagnóstico é, em geral, realizado somente no momento da cirurgia, após avaliação histopatológica. Sua realização através de exames de imagem é complexa, uma vez que os LMS uterinos podem ser identificados erroneamente como miomas (Harry *et al.*, 2007; Toledo e Oliva, 2008; Reed, 2013).

A incidência de LMS em mulheres operadas presumidamente para miomas uterinos é de cerca de 0,5%. Esta sobreposição clínica enfatiza a necessidade de um diagnóstico pré-operatório de confiança, afim de prolongar a sobrevida das pacientes (Harry *et al.*, 2007).

O tratamento padrão para os LMS é a histerectomia com sapingooforectomia bilateral. A radioterapia e a quimioterapia adjuvante não são habitualmente administradas, uma vez que não resultam em benefícios na sobrevida das pacientes. Os resultados do tratamento estão longe de serem satisfatórios, especialmente em pacientes inoperáveis, em estágio avançado e ou metastático (Hensley, 2000; Amant, *et al.*, 2015).

De modo geral os LMS apresentam melhor prognóstico quando há hiperexpressão de BCL-2, hipoexpressão ou ausência de expressão de Ki-67,

p53, p16 e TWIST1 e um pior prognóstico quando há hiperexpressão de Ki-67, p53, p16 e p21; moderada expressão de PTEN, FSCN1, RE (receptor de estrogênio), RP (receptor de progesterona) e MIB1; e hipoexpressão ou ausência de BRCA1 e MED12 (Kobayashi *et al.*, 2013).

1.5.2. Carcinossarcomas (CS)

Também denominados tumores müllerianos mistos malignos – MMMT são tumores altamente agressivos e raros (representando menos de 5 % de todos os tumores uterinos), compostos por elementos epiteliais e mesenquimais que aparentemente possuem origem monoclonal. A histerectomia com salpingooforectomia bilateral continua sendo a principal forma de tratamento (Kanthan e Senger, 2011; Banik *et al.*, 2011).

Esse tipo tumoral é composto por células que apresentam anaplasia com notável variação de tamanho e forma nuclear, mitoses irregulares e células gigantes. Em muitos casos há áreas extensas de necrose e nítida demarcação entre o epitélio e elementos mesenquimais (Artoli *et al.*, 2015).

De modo geral, esses tumores acometem mulheres a partir dos 50 anos de idade. O número de casos também é maior entre mulheres menopausadas e mulheres negras. Estudos têm demonstrado que os carcinossarcomas (CS) e os carcinomas endometriais compartilham fatores de risco semelhantes: ambas neoplasias podem ser associadas com obesidade, nuliparidade, utilização de estrogênio exógeno, exposição anterior à radiação, exposição ao tamoxifeno (Zelamanowicz, 1998; McCluggage, 2002; Singh, 2014).

Quanto aos aspectos moleculares desses tumores, observa-se hiperexpressão gênica e protéica de TGF- β , p16, p53, ER β , CATs e VEGF. Apresentam expressão moderada de HER-2 e PTEN e baixa expressão ou ausência de RE (receptor de estrogênio), RP (receptor de progesterona), IGF1R e CD10 (Kobayashi *et al.*, 2013).

Jong e colaboradores (2011) analisaram marcadores moleculares, por imunistoquímica, em 40 amostras de carcinossarcomas uterinos. Os autores observaram que a expressão de receptores de estrogênio α ocorreu em 8%

dos casos e β em 32%, o receptor de progesterona A foi negativo e B foi observado em 23%, β -catenina foi expressa em 4% e ciclina D1 em 7%. Mutações em *PTEN*, *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* ocorreram em 39%, 33%, 22% e 21% dos casos, respectivamente. A hiperexpressão de p53 foi observada em 38% das amostras.

Devido aos seus aspectos moleculares, epidemiológicos, genéticos e dados histológicos, os CS são agora considerados como carcinomas de alto grau, com diferenciação sarcomatosa e estromal. Isso se reflete na forma de tratamento adjuvante, que não é mais baseado nos sarcomas uterinos. Demonstrou-se que o tratamento com doxorrubicina (ativo contra sarcomas) tem pouco ou nenhum efeito sobre o componente carcinomatoso dos CS e que a adição de cisplatina, dirigida contra esse componente, promoveu uma melhor resposta. É possível que a combinação destes dois agentes quimioterápicos resulte em uma maior eficiência para o tratamento dessa neoplasia (McCluggage, 2002a e 2002b).

1.5.3. Sarcomas do Estroma Endometrial (SEE)

São tumores malignos muito raros (em torno de 0,2 % de todas as neoplasias uterinas). A patogênese do SEE é desconhecida, mas a exposição ao tamoxifeno e condições tais como síndrome dos ovários policísticos podem estar envolvidas. Nessa neoplasia há uma proliferação de pequenas células, semelhantes às do estroma endometrial em fase proliferativa. As células apresentam citoplasma escasso e oval, com núcleos arredondados e nucléolo imperceptível. A atividade mitótica é geralmente inferior a 5 a cada 10 campos analisados (Puliyath e Nair, 2012).

Esse tipo de sarcoma uterino ocorre com maior frequência em mulheres entre 40-50 anos, sendo que SEE-BG acomete mulheres mais jovens (média de 39 anos) e SEE-AG ocorre em mulheres mais velhas (média de 61 anos) (Puliyath *et al.*, 2010).

Os sintomas relacionados aos SEE incluem: hemorragia uterina (que ocorre em cerca de 90% das mulheres) aumento uterino (70% dos casos), dor

pélvica e dismenorreia. Em 25% dos casos, os SEE podem apresentar-se assintomáticos (Jabeen *et al.*, 2015).

A primeira descrição de grau histológico em SEE, com base nas diferenças de comportamento clínico, foi realizada por Norris e Taylor em 1966 (Norris e Taylor, 1966; Chan *et al.*, 2008;).

Os SEE originalmente foram divididos em SEE-BG e SEE-AG com base na contagem mitótica. Em 2003, A WHO extinguiu a categoria SEE-AG, dividindo os SEE em: SEE-BG e SUI, com base no pleomorfismo nuclear e necrose, não mais na contagem mitótica. Posteriormente, tornou-se cada vez mais evidente que a categoria dos SUI é ampla, ou seja, apresenta tumores heterogêneos com comportamentos clínicos distintos e que pelo menos um subgrupo destes tumores poderia ser morfológica e geneticamente classificado. Assim, em 2014 foi estabelecido um novo esquema de classificação para essas neoplasias que reintroduz a categoria SEE-AG que incorpora os novos achados moleculares: NEE, SEE-BG, SEE-AG e SUI (Puliyath e Nair, 2012; Ali e Rouzbahman, 2015; Ladwig e Garg, 2016).

NEE e SEE-BG possuem morfologias e imunoistoquímicas semelhantes. Além disso, o rearranjo cromossômico t(7;17) (p15;q21) que resulta na fusão *JAZF1-SUZ12* (anteriormente *JAZF1-JJAZ1*) é compartilhado tanto nos casos de SEE-BG quanto nos NEE. Essas duas neoplasias, distinguem-se com base na invasão linfática e padrão de crescimento. Margens não-infiltrativas dos NEE contrastam com margens irregulares dos SEE, sendo esse o critério histológico mais importante na distinção entre essas duas categorias. Havendo invasão vascular, leva a um diagnóstico de SEE-BG (Conklin e Longacre, 2014; Jetley *et al.*, 2014; Ali e Rouzbahman, 2015).

SEE-AG é definido pela translocação t (10; 17) (q22; p13) que envolve a fusão de *YWHAE-FAM22*. São caracterizados por populações atípicas de células neoplásicas e parecem ter prognóstico intermediário entre SEE-BG e SUI. Já os SUI são tumores altamente agressivos, exibem um cariótipo complexo com ausência de translocação específica (podem raramente apresentar a translocação *JAZF1-SUZ12*), além de não apresentarem diferenciação do estroma endometrial (Croce *et al.*, 2013; Conklin e Longacre, 2014).

O tratamento inicial para os SEE é a histerectomia com salpingooforectomia bilateral. O papel da terapia adjuvante, tais como a radioterapia e a quimioterapia não está estabelecido (Dupont e Disaia, 2010; Ryu *et al.*, 2015).

Devido a maioria dos SEE-BG expressar receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), a terapia endócrina é considerada uma opção de tratamento para esse tipo de neoplasia. No entanto, a utilização de progestinas pode causar edemas, ganho de peso, hemorragias vaginais, hipertensão e problemas tromboembólicos. O mecanismo de ação das progestinas se dá através de sua ligação aos receptores de progesterona e regulação negativa da transcrição do gene, que leva à diminuição de glândulas endometriais e proliferação estromal (Dupont e Disaia, 2010; Dizon e Birrer, 2014; Ryu *et al.*, 2015).

O marcador CD10 é evidente em 100% dos casos de SEE, sendo o marcador mais específico encontrado. A expressão nuclear de β -catenina também é predominante em SEE. Sendo assim, esses tumores parecem estar associados a uma hiperexpressão de CD10 e β -catenina, e hipoexpressão de Desmina. Os marcadores Ki-67, p53 e p16 foram menos expressos nas amostras de SEE em comparação com LMS (Bhargava *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2013).

1.5.4. Adenossarcomas (AS)

São variantes de tumores müllerianos mistos do útero, compreendem 5% de todos os sarcomas uterinos. São caracterizados por menor potencial de malignidade, raras metástases e maior incidência em mulheres entre 40 e 65 anos. Os adenossarcomas uterinos possuem componente epitelial benigno e um componente estromal maligno. O tecido epitelial é glandular e apresenta proliferação atípica (Tinar *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2012; Friedlander *et al.*, 2014).

Histologicamente, o componente estromal dos AS demonstra aparência heterogênea com ausência de uma linha específica de diferenciação, embora

haja semelhança com os SEE. A análise do número de mitoses é necessária para o diagnóstico (pelo menos 2 a cada 10 campos) (Pinto e Howitt, 2016).

Essa neoplasia pode estar associada a endometriose, uso de tamoxifeno e uso de anticoncepcional a longo prazo. As pacientes geralmente apresentam sangramento vaginal anormal, dor pélvica, massa abdominal e corrimento vaginal. O tratamento primário consiste em histerectomia total com salpingooforectomia bilateral sendo a dissecação nodal normalmente não realizada. Os dados sobre o uso de terapia adjuvante ainda são escassos (D'Angelo e Prat, 2010; Bernard *et al.*, 2013; Mohit *et al.*, 2014).

Os AS podem apresentar supercrescimento sarcomatoso, definido pela presença desse componente, geralmente de alto grau, ocupando pelo menos 25% do tumor. Quando os tumores apresentam essa característica, tendem a ser maiores, hemorrágicos, com superfície necrosada e geralmente mais invasivos que os convencionais (Prat e Mbatani, 2015; Piscuoglio *et al.*, 2016).

O componente mesenquimal dos AS exibe aumento de expressão de Ki-67 e p53. Nestes tumores, há uma diminuição da expressão de RE e RP e aumento da expressão de CD10. O gene supressor de tumor *WT1* é expresso nos AS convencionais e nos que apresentem supercrescimento sarcomatoso. *WT1* e *CD10* podem ser úteis no diagnóstico de AS. Além disso, estudos mostram que o aumento de expressão do oncogene *HMGA1* pode estar relacionado ao desenvolvimento de AS (Kobayashi *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2014).

De modo geral, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer é um importante aspecto que permite avaliar o tratamento empregado. Um dos mecanismos descritos como envolvidos no processo de carcinogênese é a regulação da transcrição por microRNAs (miRNAs). Porém, poucos trabalhos foram realizados até o momento sobre essas moléculas nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos. Algumas características destas pequenas moléculas reguladoras serão abordadas a seguir.

1.6. Os microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não-codificantes contendo de 20 - 24 nucleotídeos. Estas moléculas desempenham papéis importantes na maioria das vias biológicas em organismos multicelulares, podendo influenciar em numerosos processos como: proliferação, controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação, sinalização celular, resposta ao estresse, migração e metabolismo (Jansson e Lund, 2012; Zhang *et al.*, 2016).

Ambros e colaboradores (1993), identificaram o primeiro miRNA, *lin-4*, em *C. elegans*, há mais de duas décadas. O RNA transcrito do gene *lin-4* não era um codificador de proteínas, mas mesmo assim regulava o crescimento do microrganismo. Foi descoberto então, que o *lin-4* era capaz de inibir a tradução do transcrito do gene *lin-14* por meio de pareamento de bases na região 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA (Lee *et al.*, 1993).

Em 2000, dois grupos de pesquisadores descobriram separadamente um pequeno RNA chamado de *let-7*. Esse miRNA está envolvido em reações de heterocronia em *C.elegans*. A desregulação desse miRNA afeta diretamente eventos específicos do desenvolvimento larval, podendo ser omitidos ou reiterados (Reinhart *et al.*, 2000). Homólogos deste gene foram posteriormente revelados em muitos outros organismos, incluindo humanos. O reconhecimento e a confirmação da existência de miRNAs, levou intensas pesquisas que visam identificar novos membros, resultando na descoberta de várias dessas moléculas em diferentes espécies de plantas e animais (Pasquinelli *et al.*, 2000; Bhaskaran e Mohan, 2014).

A formação de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito chamado de pri-miRNA, sintetizado pela RNA- polimerase II. No núcleo, esses pri-miRNA são clivados em pré-miRNA, por intermedio do complexo microprocessador Drosha, uma enzima RNase III, e um cofator DGCR8 (Lee e Dutta, 2009; Ha e Kim, 2014). Através de sua interação com a exportina-5-Ran-GTP, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma, onde é submetido a um segundo ciclo de processamento catalisado pela Dicer, uma segunda enzima RNase III, em conjunto com os TRBPs (*TAR RNA-binding protein*) (Winter *et*

al., 2009; Romero-Cordoba *et al.*, 2014). O pré-miRNA é clivado em uma fita dupla que dá origem à molécula de miRNA maduro e funcional. A fita funcional do miRNA é transportada em conjunto com a proteína Argonata (ago2) até o complexo de silenciamento (RISC), tornando-se possível o silenciamento de mRNAs alvos através de sua clivagem, repressão traducional ou desadenilação, enquanto a outra fita é degradada (Winter *et al.*, 2009; Melo e Melo, 2014). O processo da biogênese dos miRNAs está representado na Figura 1.

Figura 1- Via de processamento dos miRNAs (Adaptado de Winter *et al.*, 2009).

Embora grande progresso tenha sido feito no entendimento do mecanismo básico da biogênese dos miRNAs, a compreensão dos mecanismos específicos que regulam sua expressão ainda exige futuras investigações (Davis e Hata, 2010; Bronevetsky e Ansel, 2013).

1.7. microRNAs e câncer

Na última década, muitos estudos têm demonstrado a importância dos miRNAs na biologia do câncer pelo controle da expressão de mRNAs alvos, facilitando o crescimento tumoral, invasão, angiogênese e evasão imunológica (Hayes *et al.*, 2014).

A relação entre câncer e miRNAs foi relatada pela primeira vez em 2002, quando um *cluster* contendo *miR-15* e *miR-16* foi identificado na região cromossômica 13q14, que está frequentemente deletada nas células B de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) (Callin, *et al.*, 2002).

A angiogênese, um fenômeno essencial para o crescimento tumoral e metastização, pode estar associado a uma hiporregulação de *miR-15a* e *miR-16-1*. Esse fato leva à uma hiperexpressão do gene-alvo *Bcl-2*, um fator anti-apoptótico que favorece a sobrevivência celular, culminando com o aparecimento e progressão de tumores (Jiang e Li, 2013).

A metástase é outro fator que está relacionado com a desregulação da expressão de miRNAs, sendo altamente associado com a mortalidade de pacientes oncológicos (Aigner, 2011). O *miR-10b* foi o primeiro miRNA a ser relatado como envolvido no processo de metástase. A hiperexpressão de *miR-10b* em células de câncer de mama não metastático, induz a invasão e a metástase à distância, através do controle do mRNA *HOXD10*, um repressor da transcrição de vários genes, incluindo *RHOC*, *integrina $\alpha 3$* e *MMP14* (Chan, Wang, 2015). Além desse miRNA, vários outros possuem envolvimento com metastização tumoral, como por exemplo: a regulação negativa do *miR-126* (Feng *et al.*, 2010) em câncer gástrico e a regulação negativa da família do *miR-138* em câncer de ovário (Yeh *et al.*, 2013).

Estudos sobre a proliferação celular e crescimento tumoral, associados à expressão de miRNAs também têm sido realizados. O *miR-21* é o único miRNA hiperexpresso em nove tipos diferentes de tumores. Este miRNA está altamente relacionado com as funções anteriormente citadas, uma vez que pode regular negativamente genes supressores tumorais como *PTEN*, que é responsável pela regulação da atividade de *AKT* e *p53*, e também *TPM1* (Lu *et al.*, 2008) .

Vários estudos indicam que mais de metade dos genes de miRNA estão localizados em regiões genômicas relacionadas ao desenvolvimento do câncer. Estas regiões têm sido associadas com a instabilidade do DNA, sendo denominados locais frágeis. O envolvimento e o papel desempenhado pelos miRNAs foram relatados em diferentes tipos de cânceres, incluindo mama, cólon, gástrico, pulmão, próstata e tireóide (Reddy, 2015).

Diferentes mecanismos podem levar à desregulação da expressão de miRNAs, como pode ser observado na Figura 2. A anormalidade genômica, fatores epigenéticos e regulação transcricional são alguns dos fatores que podem levar a essas alterações (Lee e Dutta, 2009). As anormalidades genômicas ocorrem devido à localização dos miRNAs, fazendo com que estas moléculas fiquem suscetíveis às mutações. Os tipos de mutações que afetam os miRNAs são variáveis entre os diferentes tipos de cânceres. As mais comuns são: mutações pontuais, transições e transversões, podendo ocorrer, mais raramente, deleções e inserções (Tuna *et al.*, 2016).

As modificações epigenéticas podem resultar na alteração ou inibição de várias vias de sinalização, levando ao desenvolvimento de cânceres. Alguns exemplos de modificações epigenéticas são: metilação do DNA e modificações das histonas. Cerca de metade dos miRNAs estão sujeitos a hipermetilação das ilhas de CpG (na região promotora), resultando no silenciamento do miRNA ou em sua hiporregulação (Kala *et al.*, 2013; Faam *et al.*, 2015; Rusek *et al.*, 2015). As modificações das histonas, também são importantes mecanismos epigenéticos no controle da expressão gênica. Certas modificações das histonas, tais como a acetilação, estão associadas com a transcrição ativa do gene, enquanto outras alterações, como a metilação da histona 3 na lisina 9 (H3K9) é um indicador de cromatina condensada e inativa (Chuang e Jones, 2007).

A transcrição de pri-miRNAs é regulada por fatores de transcrição, muitos dos quais funcionam apenas em ambientes celulares específicos. Sinais intracelulares de estresse, que são indicativos de células cancerosas, podem regular a produção de determinados pri-miRNAs, controlando a funcionalidade de determinados fatores de transcrição. Por exemplo, a proteína *p53* e a proteína oncogênica *c-Myc*, atuam regulando a transcrição de genes de miRNA

com funções conhecidas na carcinogênese (Schanen e Li, 2011; Bajan e Hutvagner, 2014).

Figura 2- Mecanismos de desregulação da expressão ou função do miRNA (Adaptado de Lee e Dutta, 2009).

Além dos fatores desreguladores citados anteriormente, muitos mediadores da biogênese nos miRNAs, incluindo Drosha, Dicer e exportina 5 (Xpo5), podem agir como oncogenes ou supressores tumorais. Uma diminuição no mRNA de Dicer1 ou Drosha, correlaciona-se com uma pior evolução em câncer de pulmão, mama, pele, endométrio e ovário (Lee e Dutta, 2009; Hata e Lieberman, 2015).

Os miRNAs desregulados em cânceres são caracterizados como “oncomiRs” podendo ser considerados como oncogênicos ou supressores de tumor. Os miRNAs oncogênicos exibem expressão aumentada em diversos

tipos de cânceres, estimulando o desenvolvimento tumoral através da inibição de genes apoptóticos e genes supressores tumorais. Por outro lado, os miRNAs supressores de tumor, perdem sua função quando há uma redução na carga gênica ou outro mecanismo, que resulta na regulação positiva de produtos oncogênicos, promovendo o fenótipo maligno (Cowland *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Gartel e Kaandel, 2008; Chan e Wang, 2015).

Alguns exemplos de miRNAs supressores de tumor são: *miR-29b* (leucemia mielóide aguda), *miR-155* (câncer de mama), *let-7* (pulmão, próstata, mama, tireóide e ovário), *miR-494* (câncer de pulmão) e *miR-375* (câncer de mama). Há também inúmeros miRNAs oncogênicos como por exemplo: *miR-9* (leucemia mielóide aguda), *miR-21* (câncer de mama), *miR-196a* (cancer gástrico), *miR-181a/b* (câncer de mama, fígado e cólon) e *miR-30a/c* (carcinomas de células renais) (Romano *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013; Price e Chen, 2014).

Os miRNAs, sejam eles oncogênicos ou supressores tumorais, exercem sua função regulando os mRNAs alvos. A especificidade da interação de um miRNA-mRNA é conferido principalmente pelos oito primeiros nucleotídeos de um miRNA (chamado de região “semente”). Apesar de um número crescente de identificação de pares de miRNA – gene alvo, a validação desses dados ainda é escassa. Alguns exemplos de miRNAs (supressores tumorais ou oncogênicos) e seus genes-alvo diretos são: *let-7/HMGA2*, *miR-21/PTEN* em câncer hepatocelular, *miR-17-5p/AIB1* e *miR-27b/CYP1B1* em câncer de mama, *miR-34a/E2F3* em neuroblastoma, *miR-34a*, *-34b*, *-34c/Bcl-2* em câncer de pulmão de não-pequenas células (Lewis *et al.*, 2003; Lee e Dutta, 2009).

Revisão realizada por Lim e Yang (2015) mostra que os miRNAs podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento de sarcomas, podendo ser utilizados como ferramenta de diagnóstico, além de proporcionar novas possibilidades de estratégias terapêuticas. A terapia baseada em miRNA pode apresentar vantagens em comparação com outras estratégias, devido ao fato de um mesmo miRNA apresentar diversos genes-alvo. Porém, este fator também pode ser desvantajoso, uma vez que pode levar a efeitos secundários como fenótipos tóxicos para as células normais (Rothschild, 2014).

Alterações na expressão dos miRNAs estão claramente ligadas à progressão de inúmeras doenças humanas, especialmente o câncer. Uma compreensão de como miRNAs são regulados sob condições normais pode permitir um estudo mais completo dos processos envolvidos na carcinogênese (Davis e Hata, 2010).

1.8. microRNAs em sarcomas

Nos últimos anos, houve um aumento no número de estudos que avaliam a expressão de miRNAs nos vários tipos de sarcomas. Por volta de 3 mil miRNAs foram identificados até o momento, sendo potenciais novos biomarcadores para essas neoplasias (Lim e Yang, 2015).

Subramanian e colaboradores (2008) mostraram, através da técnica de *microarray*, que há diminuição da expressão de *miR-221* e *miR-222* em tumores do estroma gastrointestinal (GIST). Esses miRNAs regulam *KIT*, gene que se apresenta mutado em cerca de 80% dos GIST. Assim, a hiporregulação desses miRNAs pode elevar o potencial oncogênico por aumento do número de transcritos do gene. Nesse mesmo estudo, foi observada uma diminuição na expressão do *miR-143*. Essa diminuição também já foi descrita em outras neoplasias como por exemplo: neoplasia colorretal e câncer de colo do útero. *MAPK7* é um dos genes-alvo, experimentalmente, identificados para *miR-143*, conhecido por promover o crescimento celular e proliferação em resposta à sinalização da tirosina quinase.

Duan e colaboradores (2011) avaliaram perfis de expressão de miRNAs em osteossarcoma e identificaram o *miR-199a-3p* significativamente diminuído em linhagens celulares. A transfecção do precursor de *miR-199-3p* diminuiu significativamente o crescimento celular e migração, além disso, houve diminuição da expressão de *mTOR* e *Stat3*. Esses dados sugerem que a desregulação do *miR-199-3p* poderia desempenhar um papel crucial no crescimento e proliferação das células de osteossarcoma.

Em rhabdomyosarcoma (RMS), Wang e colaboradores (2008) observaram uma diminuição da expressão de *miR-29*, devido à elevação nos níveis de *NF-*

κB e YY1. A restauração dos níveis de *miR-29* no RMS, estimula a diferenciação miogênica. Sendo assim, a miogênese foi relacionada com *NF- κB* , *YY1* e *miR-29*, cuja disfunção contribuiria com a patogênese do tumor. Esse estudo torna-se relevante uma vez que apresenta potenciais caminhos alternativos para o diagnóstico e tratamento de cânceres musculares.

Shi e colaboradores (2009) encontraram uma correlação significativa entre os níveis de *HMGA2* endógeno e a expressão de *let-7* em LMS uterinos. Foi realizado um ensaio de proliferação celular que comparou o crescimento de células de linhagem de LMS tratadas com inibidor de *let-7* com células tratadas com *let-7* exógeno. Verificou-se que o tratamento com *let-7* exógeno reduziu significativamente a proliferação celular por meio da repressão de *HMGA2*, sendo essa proteína considerada oncogênica. Portanto, a perda de expressão de *let-7* observada em grande parte dos LMS, representaria um fator de pior prognóstico.

Em um estudo que avaliou a expressão de miRNAs em 29 amostras de sarcomas uterinos (incluindo LMS, CS, SEE e AS), foi observado que *miR-23b*, *miR-1*, *let-7f* e *let-7c* apresentaram diferenças de expressão em SEE e *miR-1*, *let-7c*, *miR-133b*, *let-7b*, *miR-143*, *let-7a*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7g*, *miR-222*, *let-7i* e *miR-214* apresentaram diferenças de expressão em CS e AS. Não foram encontrados miRNAs com diferenças significativas de expressão nos LMS. Todos os miRNAs alterados eram hipoexpressos em comparação com o controle (fragmentos uterinos normais) (Kowalewska et al., 2013). Essa análise mostrou evidências de que os miRNAs podem estar associados com a tumorigênese dos sarcomas uterinos.

Outro estudo mais recente envolvendo sarcomas uterinos visou estabelecer uma assinatura molecular para LMS e SEE. Os resultados mostraram que após avaliar a expressão de 381 miRNAs por qRT-PCR, 94 deles foram diferencialmente expressos em SEE e LMS. Desses, 76 foram hiperexpressos em SEE e 18 hiperexpressos em LMS. Quarenta e nove miRNAs foram diferencialmente expressos entre LMS primários e metastáticos, sendo 45 hiperexpressos nos tumores primários e 4 nas metástases. Após o silenciamento de um dos genes-alvo do *miR-31* (*FZD6*), os autores observaram

significativa redução da invasão celular e atividade de MMP – 2 nas células em cultura (Ravid *et al.*, 2016).

Pesquisas com moléculas de miRNA têm aumentado significativamente nas últimas décadas. Porém, pouco se sabe sobre suas funções em processos fisiológicos e patológicos nos sarcomas. Além disso, estudos comparativos que estabeleçam uma assinatura molecular para cada tipo tumoral, bem como associem os dados de expressão aos dados clínicos das pacientes acometidas, ainda são necessários.

As novas tecnologias, incluindo a detecção dos miRNAs por RT-qPCR, que foi utilizada neste estudo, permitem avaliar a expressão de miRNAs sabidamente associados ao desenvolvimento de diversos outros tipos de cânceres. Essas análises podem ajudar a ampliar os avanços terapêuticos e diagnósticos, bem como auxiliar na elucidação dos processos de carcinogênese dos sarcomas e carcinossarcomas uterinos.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a expressão de miRNAs relacionados ao desenvolvimento de cânceres em amostras de carcinossarcomas e sarcomas uterinos.

2.2. Específicos

- Avaliar o perfil de expressão de 84 miRNAs sabidamente envolvidos no desenvolvimento de tumores, em amostras de pacientes com leiomiossarcomas, sarcomas de estroma endometrial, adenossarcomas e carcinossarcomas;
- Comparar os resultados moleculares com os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram selecionados 100 casos com diagnóstico de sarcoma uterino, em seus diversos tipos histológicos e de carcinosarcomas. O número de amostras de pacientes, por tipo histológico de tumor, ficou distribuído da seguinte forma: 56 amostras de leiomiossarcomas (LMS), 24 de carcinosarcomas (CS), 18 de sarcomas do estroma endometrial (SEE) e 2 de adenossarcomas (AS). Os tecidos uterinos embebidos em parafina foram cedidos pelo Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Hospital Santa Marcelina – Unidade Itaquera e A.C. Camargo Cancer Center. As amostras de pacientes foram obtidas através de cirurgia, no período de 2000 a 2012. O presente projeto foi aprovado pelas comissões de ética de todas as instituições envolvidas, incluindo o CEPFMUSP (143/11, ANEXO A).

A revisão do diagnóstico foi realizada por duas patologistas responsáveis (Dra. Isabela da Cunha e Dra. Kátia Picerato) em lâminas coradas por hematoxilina e eosina (H.E.). Cortes representativos de LMS, CS, SEE e AS estão apresentados na Figura 3.

Os prontuários das pacientes foram analisados, as variáveis demográficas e clínicas foram coletadas e categorizadas da seguinte forma: idade ao diagnóstico (≥ 50 anos/ < 50 anos), sintomas principais (dor pélvica e sangramento), uso de contraceptivo oral (sim/não), menopausa (sim/não), terapia de reposição hormonal (sim/não), tabagismo (sim/não), tratamento cirúrgico (sim/não), tratamento adjuvante (radioterapia, quimioterapia e/ ou associação dos dois tipos de tratamentos), presença de metástase (local ou à distância), grau histológico (alto/baixo), recorrência (não/ persistência/ recidiva/ dado ignorado), situação atual (óbito/ vivo com ou sem doença/ perda de seguimento) e estadiamento (grau I/ grau II/ grau III/ grau IV).

O estadiamento foi realizado de acordo com a edição da FIGO, 2009 e a classificação do grau histológico dos tumores, foi baseado no pleomorfismo nuclear e índice mitótico (Prat e Mbatani, 2015).

Figura 3- Fotomicrografias de lâminas de H.E. dos tumores avaliados nesse estudo (40X). **A** – Amostra de leiomiossarcoma, **B** – carcinosarcoma, **C** - sarcoma do estroma endometrial, **D** – adenossarcoma.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de RNA das amostras e eliminação do DNA genômico

A extração de RNA das amostras incluídas em parafina foi realizada utilizando-se 20 cortes, de 3µm cada, de todas as amostras de tecido avaliadas nesse estudo. Os cortes foram colocados diretamente em microtubos de 1,5 mL e foram adicionados 500µl de óleo mineral. Foi realizada uma incubação a 80°C por 2 minutos e as amostras foram agitadas em vortex. Após esse processo, foram adicionados 200µl de tampão de lise, seguindo-se

centrifugação à 10,000 x *g* por 15 segundos, à temperatura ambiente. Duas fases foram formadas, uma aquosa (inferior) e outra oleosa (superior). Foram adicionados 40µl de proteinase K à fase aquosa e a mistura foi homogeneizada levemente com pipeta. As amostras foram incubadas à 56°C por 15 minutos e logo depois a 80°C por mais 15 minutos. Os tubos foram depositados em gelo por 1 minuto e mantidos à temperatura ambiente por mais 2 minutos.

O tratamento com a DNase I (Promega)[®] foi feito utilizando-se uma mistura contendo: 13µl de MnCl₂ 0.09M, 7µl de tampão e 10µl da enzima. Foram adicionados 30µl dessa solução, cuidadosamente com a pipeta, na fase inferior da mistura e seguiu-se nova homogeneização. Uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente foi realizada posteriormente. Após essa etapa adicionou-se 325µl de tampão de ligação ao tubo contendo a amostra e logo depois 200µl de isopropanol 100%. Após agitação manual, seguiu-se nova centrifugação a 10,000 x *g* por 15 segundos à temperatura ambiente.

Para cada amostra processada, foi utilizada uma coluna depositada em um tubo suporte de 2,0 mL. A fase inferior (aquosa) foi transferida para a coluna, sem o precipitado de parafina, para nova centrifugação a 10,000 x *g* por 30 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e adicionou-se 700µl de solução de lavagem 1X (preparado com etanol) à coluna, com nova centrifugação a 10,000 x *g* por 30 segundos à temperatura ambiente. A lavagem e centrifugação foram repetidas e o filtrado novamente descartado. Uma centrifugação adicional foi realizada, agora à velocidade máxima por 4 minutos, para secar bem a coluna. A coluna foi transferida para novo tubo de coleta de 2,0 mL e adicionou-se 30µl de água livre de RNases a 56°C para recuperar o RNA da resina. Seguiu-se nova centrifugação à velocidade máxima por 1 minuto à temperatura ambiente e a coluna foi removida e descartada. O microtubo final contendo o RNA extraído foi armazenado a - 80°C.

Para quantificação do material, submeteu-se 1µl do eluato de RNA, à leitura de concentração em nanogramas (ng) e determinação das razões que indicam sua pureza (260/280 e 260/230), em espectrofotômetro tipo NanoDrop (*Thermo Scientific*). Os valores das razões obtidas estavam acima de 1,8 e as

concentrações acima de 100 ng/μl, indicando desta forma que a maioria das amostras, poderiam ser utilizadas nas próximas etapas dos experimentos.

3.2.2. Reação de transcrição reversa (síntese de DNA complementar)

Após homogeneização e degelo da água livre de RNase, 10x *miScript Nucleics Mix*, tampão 5x *miScript HiSpec* e do RNA total (em gelo), preparou-se a reação de transcrição reversa de acordo com o protocolo apresentado na Tabela 4.

Tabela 4- Componentes, e seus volumes utilizados na reação de transcrição reversa para cada amostra

COMPONENTES	VOLUME
5x <i>miScript HiSpec Buffer</i>	4 μl
10x <i>miScript Nucleics Mix</i>	2 μl
Água livre de RNase	Variável
<i>miScript Reverse Transcriptase Mix</i>	2 μl
Amostra de RNA (250 ng)	Variável
TOTAL	20 μl

Fonte: Qiagen. *miScript™ miRNA PCR Array Handbook*

Adicionou-se o RNA molde a cada tubo contendo a mistura de transcriptase reversa. Misturou-se delicadamente, centrifugou-se brevemente e os tubos permaneceram no gelo. Após esse procedimento, essa mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C, depois por 5 minutos a 95°C (para inativar a *miScript Reverse Transcriptase Mix*) e foi transferida para o gelo.

O cDNA foi então diluído em água livre de RNase (adicionou-se 200 μl de água livre de RNase para cada 20 μl da reação de transcrição reversa) e

procedeu-se a PCR em tempo real, imediatamente. Na Figura 4 podem ser visualizadas as principais etapas do processo.

Figura 4- Esquema representativo da conversão seletiva de miRNAs maduros em cDNAs utilizando o tampão *miScript Hispec* [Fonte: Qiagen].

3.2.3. Reação de PCR em tempo real

O sistema de detecção utilizado, permite avaliar o nível de expressão de miRNAs através do qRT-PCR. Esse sistema que inclui o Kit *miScript SYBR Green PCR* e *miScript miRNA PCR Array*, fornece uma alta sensibilidade e

eficiência de amplificação, permitindo a análise exata de vários miRNAs através do método $\Delta\Delta CT$. O Kit *miScript SYBR Green PCR*, inclui o *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* e o *miScript Universal Primer*, sendo utilizados em combinação com o *miScript miRNA PCR Array*, que contém os primers específicos de miRNAs (QIAGEN, 2013).

A reação de PCR foi iniciada com uma incubação de 15 minutos a 95°C para ativar a *HotStarTaq DNA Polymerase* (incluída no *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*). O volume padrão de reação recomendado para o *miScript miRNA PCR Array* foi de 25 μ l (em placa de 96 poços), segundo o protocolo descrito na Tabela 5.

Descongelou-se e homogeneizou-se o *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, *10x miScript Universal Primer*, cDNA molde e água livre de RNase à temperatura ambiente (15-25°C).

Tabela 5- Componentes da reação de PCR em tempo real

COMPONENTES	VOLUME
<i>2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</i>	1375 μ l
<i>10x miScript Universal Primer</i>	275 μ l
Água livre de RNase	1000 μ l
Amostra de cDNA	100 μ l
TOTAL	2750 μl

Fonte: Qiagen. *miScript™ miRNA PCR Array Handbook*

A placa *miScript miRNA PCR Array* foi removida da embalagem selada e as misturas, contendo o cDNAs, individualmente, foram transferidas para reservatórios *RT2 PCR Array*. Adicionou-se 25 μ l dessa reação para cada poço da placa, com o auxílio de uma pipeta multicanal. O esquema representativo da placa utilizada em nossas análises pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5- Esquema representativo da Placa de 96 poços utilizada nesse estudo. Nos poços A1 ao G12 continha 84 primers relacionados com miRNAs maduros. Dos poços H1 ao H12 continha os controles da reação. H1-H2: *miR-39 miScript Primer Assay* de *C. elegans*. H3-H8: snoRNA/snRNA. H9-H10: miRTC. H11-H12: PPC. [Fonte: Qiagen. *miScript™ miRNA PCR Array Handbook*].

O *miScript miRNA PCR Array* foi fechado cuidadosamente com tiras ópticas, sendo posteriormente realizada uma breve centrifugação à temperatura ambiente, para remover eventuais bolhas. O termociclador foi programado de acordo com a Tabela 6 e a corrida foi realizada no aparelho *7500 Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, USA).

Tabela 6- Condições de ciclagens utilizadas nas reações de PCR em tempo real em aparelho 7500 *Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, USA)

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	COMENTÁRIOS
Ativação inicial de PCR	15 minutos	95°C	<i>HotStarTaq DNA polymerase</i> é ativada por esta etapa de aquecimento.
3 passos de ciclagem			
Desnaturação	15 segundos	94°C	
Anelamento	30 segundos	55°C	
Extensão	34 segundos	70°C	Realizar a coleta de dados de fluorescência.
Número de ciclos	40 ciclos		Número de ciclos depende da quantidade de molde de cDNA e da abundância do alvo.

Fonte: Qiagen. *miScript™ miRNA PCR Array Handbook*

3.2.4. Análise dos resultados da PCR em tempo real

Para comparar a expressão dos miRNAs nos tipos de sarcomas uterinos com a referência (miométrio) foi utilizado o *software miScript miRNA PCR Array Data Analysis*, que utiliza o método de quantificação relativa $\Delta\Delta C_t$. Este

software está disponível no endereço eletrônico: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>.

O cálculo executado pelo *software* considerou o média dos valores de ΔCt dos grupos testes e referência para obtenção do *fold* de expressão. O ΔCt é calculado subtraindo-se o Ct de cada miRNA do grupo teste ou referência pela média do Ct dos controles normalizadores (*snoRNA/snRNA*), ($\Delta Ct = Ct^{miRNA(\text{teste/referência})} - \text{média dos Cts}^{SN1/2/3/4/5/6}$).

A partir daí foi calculado o valor de *fold-change* e *fold regulation*. O *fold-change* foi calculado através da fórmula: $2^{-\Delta Ct(\text{teste})} / 2^{-\Delta Ct(\text{controle})}$, sendo representado por $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

Em casos de hiperexpressão, os valores de *fold-change* e *fold regulation* são iguais e em casos de hipoexpressão, o valor do *fold regulation* é o inverso negativo do *fold-change*, podendo ser calculado pela seguinte fórmula: $(-1/\text{valor do } fold\text{-change})$. Desse modo, quando o *fold-change* e o *fold regulation* forem iguais a 2 significa que o miRNA é duas vezes mais expresso no grupo tumoral quando comparado ao grupo referência (miométrio). Por outro lado, quando o *fold-change* igual a 0,5 e *fold regulation* menor que -2, significa que o miRNA é duas vezes menos expresso no grupo tumoral quando comparado ao grupo referência.

3.2.5. Análise estatística

Para associação dos dados clínicos com a expressão dos miRNAs, os valores de ΔCt foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As associações com variáveis com duas categorias foram feitas pelo Teste T para os valores de ΔCt com distribuição normal e Mann-Whitney para aquelas com distribuição não normal.

O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para variáveis classificadas em três ou mais grupos enquanto o teste ANOVA foi usado para o mesmo propósito, porém, para amostras com distribuição normal. Para aquelas

amostras que continham valores suficientes em cada um dos subgrupos o teste *post-hoc* Tukey foi utilizado para averiguar a associação entre eles.

Para analisar as diferenças nos níveis de expressão dos miRNAs entre os sarcomas e carcinosarcomas uterinos, os valores de *fold regulation* foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo realizado posteriormente o teste ANOVA para amostras com distribuição normal e Kruskal-Wallis para amostras com distribuição não normal.

As associações dos dados de metástase/recidiva com a expressão de miRNAs de pacientes que realizaram tratamento adjuvante, foram feitas através do teste T para amostras com distribuição normal ou Mann-Whitney quando a distribuição era não normal, ressaltando que anteriormente as amostras passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Para a correlação da expressão dos miRNAs com a sobrevida livre de doença- SLD, os valores de *fold regulation* foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido dos testes de coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman, para amostras com distribuição normal ou não normal respectivamente.

As curvas de sobrevida foram obtidas por meio do método de Kaplan-meier e a sua significância foi estabelecida por meio de teste de log-rank. A data da cirurgia das pacientes foi considerada como o momento inicial do seguimento e juntamente com a coleta das datas da última informação, foi dado o tempo de seguimento calculado para cada paciente do estudo.

A SLD consiste no período de tempo, em meses, decorridos entre a data da cirurgia e data do diagnóstico da primeira metástase (local ou à distância) ou último seguimento da paciente. Já, as taxas de sobrevida câncer específica - SCE foram calculadas com base no período de tempo, em meses, decorridos entre o diagnóstico e o último segmento, sendo considerada somente a morte por câncer como evento para o cálculo.

O cálculo para as recidivas, teve como base o período de tempo entre a data do exame anatomopatológico e o diagnóstico da recorrência da doença (local ou distância) num período maior que 6 meses. A ocorrência de metástase foi considerada nos casos que apresentaram doença à distância, ou loco-regional, independente do período. Todos os resultados foram

considerados significantes quando $p < 0.05$. Os resultados foram tabulados nos *softwares* SPSS para Windows versão 2.1 e Graphpad Prism 5.01.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

Dentre as 100 amostras cedidas pelas instituições envolvidas nesse estudo, 84 apresentaram perfis adequados para utilização nas reações de qRT-PCR, ou seja, ao fim da etapa de extração de RNA, suas concentrações (acima de 100 ng/ μ l) e pureza (valores das razões 260/280 e 260/230 acima de 1,8) possibilitavam a continuidade aos experimentos.

Nas reações de qRT-PCR, as amostras também passaram por controles de qualidade. Dos 96 poços da placa, 12 são reservados a esses controles. Assim, era possível que fosse avaliada cada etapa do processo, desde a eficiência da transcriptase reversa e da reação de PCR até a normalização dos dados.

Os poços H1-H2, continham o *miR-39 miScript Primer Assay* de *C.elegans*, utilizado para normalização alternativa dos dados. Em H3-H8, estavam os 6 snoRNA/snRNA *miScript Assays*, essenciais para essa etapa do processo, sendo utilizados para o método de quantificação relativa pelo método do $\Delta\Delta C_t$, como genes endógenos.

Os poços H9-H10 (miRTC), serviram para avaliar o desempenho da transcriptase reversa e por último, através do controle positivo da PCR (PPC), presente nos poços H11-H12, avaliou-se o desempenho da amplificação de cada reação. Dessa forma, após obter-se os valores de C_t de cada controle citado, em cada uma das amostras, 4 delas foram excluídas por não passar nos controles de qualidade. Ao final, foram 80 amostras submetidas à análise estatística (37 LMS, 23 CS, 18 SEE e 2 AS). Na Figura 6, podem ser visualizadas as principais etapas de análise, com o respectivo número de casos viáveis.

Como referência do perfil de expressão em tecido normal, foram utilizadas duas amostras de miométrios obtidas no ambulatório de miomas do Hospital das Clínicas.

Figura 6- Fluxograma das amostras incluídas no estudo.

4.1. Descrição dos dados clínicos e anatomopatológicos

Quanto às características clinicopatológicas das 100 pacientes incluídas nesse estudo, a idade variou de 27 a 91 anos, com média de 58 anos. Quanto ao tipo de queixa relatada, 60% das pacientes tiveram sangramento, seguida de dor pélvica (27%).

A maioria das pacientes eram menopausadas (71%), sendo uma característica esperada, uma vez que a incidência do desenvolvimento dos sarcomas e carcinossarcomas uterinos é maior nessas mulheres.

Analisando os dados de estadiamento clínico (EC), observamos que os estádios mais prevalentes de acordo com os tipos histológicos analisados foram: LMS com EC I (35,8%) e IV (30,2%); CS com EC III (45,5%); SEE com EC I e III (38,9%, ambos) e AS com EC I (100%).

Quanto ao grau histológico, tumores de alto grau (com acentuado pleomorfismo, bem como altos índices mitóticos) representaram a maioria dos casos com 81 (81%), sendo 43 LMS (76,8%), 24 CS (100%), 13 SEE (72,2%) e 1 AS (50%)

O período de seguimento, ou acompanhamento clínico, foi em média 37 meses, variando de 0,1 a 237 meses. A recidiva ocorreu em 33 casos (33%), persistência da doença em 26 (26%), vinte dois (22%) casos não apresentaram recidiva ou persistência e em 19 (19%) casos, não foi possível avaliar.

Em 59% dos casos, as pacientes tiveram metástase, sendo 14 (24%) loco-regionais e 45 (76%) metástase à distância. Os principais sítios de metástases foram: pulmão 27 (45,8%); fígado 13 (22%) e ossos 5 (8,5%), além de casos isolados com metástases no cérebro, na cúpula vaginal e nos linfonodos retroperitoneais.

A cirurgia primária (histerectomia) foi realizada em 98% dos casos, enquanto em 2% dos casos foi realizada apenas biópsia por curetagem uterina. Tratamento adjuvante não foi realizado em 32 casos (32%). Das 68 (68%) pacientes que receberam tratamento adjuvante, 27 (39,7%) realizaram apenas radioterapia; 24 (35,3%) apenas quimioterapia e 17 (25%) realizaram os dois tipos de tratamento mencionados.

Considerando o total de pacientes, observamos que a maioria foi a óbito (70%), sendo 40 (71,4%) delas portadoras de LMS, seguidas pelas pacientes com CS (70,8%).

As demais características clínicas e anatomopatológicas das pacientes podem ser visualizadas na Tabela 7 e os dados de acordo com o tipo histológico do tumor na Tabela 8.

Tabela 7- Características clínicas e anatomopatológicas das pacientes incluídas no estudo (n=100)

Variáveis	Categorias	N(%)
Idade	>50 anos	71 (71)
	≤50 anos	29 (29)
Queixa principal	Sangramento	60 (60)
	Dor pélvica	27 (27)
	Ignorado	13 (13)
Menopausa	Sim	71 (71)
	Não	6 (3)
	Ignorado	23 (23)
Uso de contraceptivo oral	Sim	3 (3)
	Não	43 (43)
	Ignorado	54 (54)
TRH	Sim	2 (2)
	Não	50 (50)
	Ignorado	48 (48)
Tabagismo	Sim	3 (3)
	Não	30 (30)
	Ignorado	67 (67)
Tratamento Cirurgico	Sim	98 (98)
	Não	2 (2)
Seguimento	Média	37 m
	Variação	0,1 a 237 m
Metástase	Sim	59 (59)
	Não	34 (34)
	Ignorado	7 (7)
Óbito	Sim	70 (70)
	Viva	20 (20)
	Ignorado	10 (10)

Tabela 8- Aspectos clínicos e anatomopatológicos de acordo com o tipo histológico de neoplasia avaliada

Variáveis	Categorias	LMS N(%)	CS N(%)	SEE N(%)	AS N(%)
Estadiamento	I	19 (35,8)	4 (18,2)	7 (38,9)	2 (100)
	II	10 (18,9)	2 (9,1)	3 (16,7)	0 (0)
	III	8 (15,1)	10 (45,5)	7 (38,9)	0 (0)
	IV	16 (30,2)	6 (27,3)	1 (5,5)	0 (0)
Grau histológico	Alto	43(76,8)	24 (100)	13 (72,2)	1 (50)
	Baixo	13(23,2)	0 (0)	5 (27,8)	1 (50)
Recorrência	Não	10 (17,9)	8 (33,4)	3 (16,6)	1 (50)
	Persistência	13 (23,2)	6 (25)	7 (38,9)	0
	Recidiva	21 (37,5)	5(20,8)	7 (38,9)	0
	Ignorado	12 (21,4)	5 (20,8)	1 (5,6)	1 (50)
Tipo de metástase	Local	9 (26,5)	2 (18,2)	3 (21,4)	0 (0)
	Distância	25 (73,5)	9 (81,8)	11 (78,6)	0 (0)
Adjuvância	Não	22 (39,3)	5 (20,8)	5 (27,8)	0
	RT	11 (19,6)	8 (33,3)	6 (33,3)	2 (100)
	QT	17(30,4)	3 (12,6)	4 (22,2)	0
	QT+RT	6 (10,7)	8 (33,3)	3 (16,7)	0
Status	Viva	12 (21,4)	3 (12,5)	4 (22,2)	1 (50)
	Óbito	40 (71,4)	17 (70,8)	13 (72,2)	0 (0)
	Perda de seguimento	4 (7,2)	4 (16,7)	1 (5,6)	1 (50)

4.2. Análise da expressão dos miRNAs

Os dados foram analisados com auxílio da plataforma disponibilizada pela SAbioSciences (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>), que gera planilhas contendo os resultados da expressão dos 84 miRNAs nos grupos testes em comparação às amostras referência. Os grupos testes foram compostos por: leiomiossarcomas – LMS, carcinossarcomas – CS, sarcomas do estroma endometrial – SEE e adenossarcoma – AS e o grupo referência foi composto por amostras de miométrio.

Na Tabela 9 podem ser visualizados os valores de expressão (apresentados como *fold regulation*) obtidos nas análises. O *fold regulation*

representa resultados de expressão de uma forma biologicamente significativa, onde os valores maiores que 2 são indicados em vermelho (miRNAs hiperexpressos) e os valores inferiores a -2 estão indicados em azul (miRNAs hipoexpressos).

Nesta análise, foi estabelecido o *cutoff* de *fold* maior que 4 para os miRNAs hiperexpressos e menor que -4 para miRNAs hipoexpressos. Esse *cutoff* foi determinado para aumentar a significância da expressão e as chances de posterior validação, uma vez que efeitos biológicos podem ser resultado de maiores diferenças nos níveis de expressão de um miRNA, além de aumentar a estringência.

Tabela 9- Dados gerados pela plataforma SAbiosciences (QIAGEN), indicando o *fold regulation* dos microRNAs avaliados nos diferentes tipos de tumores, em relação ao grupo referência

microRNA	LMS	CS	SEE	AS
hsa-let-7a-5p	-5.4121	-9.3449	-6.1828	-6.1473
hsa-miR-133b	-1.5586	-1.3566	-1.9721	-1.8894
hsa-miR-122-5p	7.6462	6.8967	4.9305	7.6242
hsa-miR-20b-5p	1.4932	2.6434	1.6825	-2.5537
hsa-miR-335-5p	1.7436	2.6755	2.5467	2.7339
hsa-miR-196a-5p	1.932	1.7713	1.6087	-1.4655
hsa-miR-125a-5p	-3.3873	-2.7519	-2.8089	-1.1837
hsa-miR-142-5p	2.2465	2.5851	1.9256	-1.2977
hsa-miR-96-5p	11.6517	91.7792	58.6514	15.7956
hsa-miR-222-3p	-1.1046	-2.304	-2.5292	-2.0979
hsa-miR-148b-3p	-2.5718	-1.9191	-1.8327	-2.1721
hsa-miR-92a-3p	-1.0469	1.4948	-1.0975	-1.2508
hsa-miR-184	9.2193	4.2653	5.3097	12.7462
hsa-miR-214-3p	-1.389	-1.7136	-1.0964	-1.3017
hsa-miR-15a-5p	1.6488	1.4087	2.1512	-1.2639
hsa-miR-378a-3p	-1.5418	-2.4092	-2.0881	-2.2614
hsa-let-7b-5p	-1.9013	-3.2642	-3.254	1.0015
hsa-miR-205-5p	5.6771	15.9533	2.7047	1.9165
hsa-miR-181a-5p	1.4753	4.7869	2.0629	1.8383
hsa-miR-130a-3p	-1.8002	-1.0512	1.0601	-2.809
hsa-miR-140-5p	-3.0694	-2.4431	-2.3554	-4.6284
hsa-miR-20a-5p	1.1933	2.2485	1.4348	-2.0406
hsa-miR-146b-5p	4.1539	5.4258	6.1876	3.493
hsa-miR-132-3p	1.331	-1.0377	1.6895	1.4352

continua

continuação

microRNA	LMS	CS	SEE	AS
hsa-miR-193b-3p	-3.1091	-7.4334	-6.6866	-7.8885
hsa-miR-183-5p	12.8676	53.8013	35.4848	9.7724
hsa-miR-34c-5p	8.5344	6.7961	7.0479	15.8891
hsa-miR-30c-5p	-1.7943	-2.2386	-1.9042	-3.381
hsa-miR-148a-3p	-1.1333	1.1946	1.1949	1.0061
hsa-miR-134-5p	2.7264	1.9556	1.606	5.9801
hsa-let-7g-5p	-3.1459	-3.7845	-2.9089	-3.1801
hsa-miR-138-5p	4.1038	12.8076	5.2918	1.7098
hsa-miR-373-3p	17.4661	11.086	6.1595	9.8925
hsa-let-7c-5p	-3.4368	-3.8281	-4.9617	-3.0155
hsa-let-7e-5p	-4.5815	-3.6686	-5.6867	-5.1471
hsa-miR-218-5p	-2.6335	-1.3921	-1.1784	-5.3973
hsa-miR-29b-3p	-2.5898	-3.9563	-2.9259	-5.8907
hsa-miR-146a-5p	-1.2317	-2.6057	-1.41	-2.1785
hsa-miR-135b-5p	16.659	53.5235	36.001	11.0579
hsa-miR-206	19.9742	116.0198	35.517	94.6118
hsa-miR-124-3p	37.8574	24.5907	126.5634	6.5326
hsa-miR-21-5p	1.4444	-1.2024	1.2799	-1.5397
hsa-miR-181d-5p	3.156	4.1904	2.7059	3.7035
hsa-miR-301a-3p	3.1008	5.8032	6.768	1.5028
hsa-miR-200c-3p	9.0638	45.2657	7.4508	105.976
hsa-miR-100-5p	-1.6572	-1.6285	-1.1765	-1.5649
hsa-miR-10b-5p	-3.2251	-2.1069	-1.7988	-1.8841
hsa-miR-155-5p	3.586	2.7119	2.9176	3.429
hsa-miR-1-3p	-2.134	-3.6869	-2.7445	-4.05
hsa-miR-150-5p	-4.4575	-4.6484	-3.1453	-3.1589
hsa-let-7i-5p	-1.9397	-3.7147	-2.1005	-2.4927
hsa-miR-27b-3p	-3.4671	-4.0471	-4.6965	-5.1071
hsa-miR-7-5p	4.493	5.3819	4.3985	1.6076
hsa-miR-127-5p	9.4944	6.0941	4.824	5.4305
hsa-miR-29a-3p	-4.5101	-5.0804	-5.4885	-8.1445
hsa-miR-191-5p	-1.1606	-1.6896	-1.2316	-1.8825
hsa-let-7d-5p	-2.7035	-4.0152	-4.0381	-4.2908
hsa-miR-9-5p	2.4898	8.3619	6.906	1.359
hsa-let-7f-5p	-3.1524	-3.7255	-2.6184	-6.3729
hsa-miR-10a-5p	-2.4488	-1.4312	-1.4512	-1.6096
hsa-miR-181b-5p	2.1569	2.8624	2.3475	7.1821
hsa-miR-15b-5p	-1.185	-2.7072	-1.6591	-3.942
hsa-miR-16-5p	1.3111	-1.3511	1.2854	-2.2093
hsa-miR-210-3p	4.9717	3.0542	2.5706	-1.4348
hsa-miR-17-5p	1.4166	2.5516	1.6569	-1.6419
hsa-miR-98-5p	-1.6056	-2.0057	-1.0764	-1.5171
hsa-miR-34a-5p	1.1173	-1.1355	1.1007	1.2298
hsa-miR-25-3p	1.91	2.0043	2.1593	1.447
hsa-miR-144-3p	1.5264	-1.1713	1.7713	-2.5675
hsa-miR-128-3p	1.2561	2.115	1.8574	1.1046
hsa-miR-143-3p	-4.3007	-7.4455	-5.9371	-8.3508
hsa-miR-215-5p	11.395	10.6911	5.8138	7.268

continua

				conclusão
microRNA	LMS	CS	SEE	AS
hsa-miR-19a-3p	1.3992	1.7598	2.2721	-3.2301
hsa-miR-193a-5p	-2.1197	-3.6334	-3.3309	-3.401
hsa-miR-18a-5p	3.7483	6.9446	3.5993	-1.1574
hsa-miR-125b-5p	-2.7944	-2.4329	-2.7544	-1.5373
hsa-miR-126-3p	-3.8886	-5.0872	-3.1183	-6.0691
hsa-miR-27a-3p	-1.8882	-2.0053	-2.1067	-4.4964
hsa-miR-372-3p	22.3015	15.6169	9.3809	13.243
hsa-miR-149-5p	-1.9068	-1.0028	-1.5702	-1.9726
hsa-miR-23b-3p	-5.4141	-4.9075	-5.6038	-4.166
hsa-miR-203a-3p	1.4545	2.6091	3.3133	1.8125
hsa-miR-32-5p	1.9513	3.5322	1.8947	-1.5099
hsa-miR-181c-5p	-1.008	2.9405	1.0818	-1.511

LMS – Leiomiiossarcomas

CS – Carcinossarcomas

SEE – Sarcomas do estroma endometrial

AS – Adenossarcoma

No total, foram observados 18 miRNAs hiperexpressos nos LMS, 22 nos CS, 18 nos SEE e 15 nos AS. Quanto aos miRNAs hipoexpressos, foram encontrados 6 nos LMS, 9 nos CS, 9 nos SEE e 15 nos AS.

Como pôde ser observado na Tabela 9, alguns miRNAs apresentaram valores altos de *fold regulation*, considerando o perfil de hiperexpressão. Tal fato pode ser explicado pela baixa expressão desses marcadores no tecido utilizado como referência (miométrio). Sabemos que todos os miRNAs incluídos nas placas estão descritos na literatura como envolvidos em carcinogênese, assim, era esperado que sua expressão fosse menor (ou até ausente) no tecido normal. A escolha do miométrio como amostra referência para os valores de expressão gênica se deu pela sua localização no mesmo órgão que os tumores avaliados, estando sujeito às mesmas influências biológicas e hormonais que eles.

O perfil global de regulação da expressão dos 84 miRNAs avaliados em todos os tumores pode ser visualizado na Figura 7. O *heatmap* apresenta o perfil de expressão, por grupo, de maneira hierarquizada, agrupando ou separando as amostras de acordo com seu perfil de expressão. A escala de valores indica, variando a intensidade da cor, em vermelho os genes mais expressos e em verde os menos expressos. A cor preta indica que não houve diferença entre o grupo teste e a referência.

Figura 7- Heatmap apresentando o perfil de expressão dos 84 miRNAs nos tumores avaliados em relação às amostras referência (miométrios). SEE, sarcoma do estroma endometrial, MM, grupo referência, AS, adenossarcomas CS, carcinossarcomas e LMS, leiomiossarcoma.

O software também possibilitou a visualização em gráficos de dispersão, permitindo diferentes comparações entre os dados obtidos no PCR em tempo real (Figura 8). Inicialmente, foram avaliados os tumores em comparação com o grupo referência (miométrios).

Na Figura 8A podem ser vistos os miRNAs que apresentaram diferença de expressão entre os LMS e o MM: 1) hiperexpressos - *miR-122-5p*, *miR-96-5p*, *miR-184*, *miR-205-5p*, *miR-146b-5p*, *miR-183-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-206*, *miR-124-3p*, *miR-200c-3p*, *miR-7-5p*, *miR-127-5p*, *miR-210-3p*, *miR-215-5p*, *miR-372-3p*; e 2) hipoexpressos - *hsa-let-7a-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *miR-150-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-143-3p* e *miR-23b-3p*.

Na Figura 8B, são apresentados miRNAs obtidos nas análises entre CS e o MM, os miRNAs que apresentaram diferenças de expressão foram: 1) hiperexpressos - *miR-122-5p*, *miR-96-5p*, *miR-184*, *miR-205-5p*, *miR-181a-5p*, *miR-146b-5p*, *miR-183-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-206*, *miR-124-3p*, *miR-181d-5p*, *miR-301a-3p*, *miR-200c-3p*, *miR-7-5p*, *miR-127-5p*, *miR-9-5p*, *miR-215-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-372-3p*; e 2) hipoexpressos - *hsa-let-7a-5p*, *miR-193b-3p*, *miR-150-5p*, *miR-27b-3p*, *miR-29a-3p*, *hsa-let-7d-5p*, *miR-143-3p*, *miR-126-3p* e *miR-23b-3p*.

Entre os SEE e o MM foram observados : 1) hiperexpressos - *miR-122-5p*, *miR-96-5p*, *miR-184*, *miR-146b-5p*, *miR-183-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-206*, *miR-124-3p*, *miR-301a-3p*, *miR-200c-3p*, *hsa-miR-7-5p*, *miR-127-5p*, *miR-9-5p*, *miR-215-5p*, *miR-372-3p*; e 2) hipoexpressos - *hsa-let-7a-5p*, *miR-193b-3p*, *hsa-let-7c-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *miR-27b-3p*, *miR-29a-3p*, *hsa-let-7d-5p*, *miR-143-3p* e *miR-23b-3p* (Figura 8C).

Por último, os miRNAs que apresentaram diferenças de expressão entre os AS e o MM foram : 1) hiperexpressos- *miR-122-5p*, *miR-96-5p*, *miR-184*, *miR-183-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-134-5p*, *miR-373-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-206*, *miR-124-3p*, *miR-200c-3p*, *miR-127-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-215-5p* e *miR-372-3p*; e 2) hipoexpressos - *hsa-let-7a-5p*, *miR-140-5p*, *miR-193b-3p*, *hsa-let-7e-5p*, *miR-218-5p*, *miR-29b-3p*, *miR-1-3p*, *miR-27b-3p*, *miR-29a-3p*, *hsa-let-7d-5p*, *hsa-let-7f-5p*, *miR-143-3p*, *miR-126-3p*, *miR-27a-3p*, *miR-23b-3p* (Figura 8D).

Figura 8- Gráficos de dispersão apresentando o perfil de expressão dos miRNAs entre as amostras de LMS (8-A), CS (8-B), SEE (8-C), AS (8-D) e o grupo referência (miométrio- MM). Os círculos vermelhos indicam os miRNAs hiperexpressos, e os verdes os hipoeexpressos.

Em seguida, foram analisados os perfis de expressão entre os diferentes tipos histológicos de tumores. Foram observados que os miRNAs com diferença de expressão entre os LMS e CS foram: hiperexpressos - *miR-183-5p*, *miR-96-5p*, *miR-206* e *miR-200c-3p* (Figura 9A). Entre o grupo de LMS e SEE, apenas 1 miRNA apresentou diferença de expressão: *miR-96-5p* (Figura 9B). No grupo de LMS em comparação com os AS, os miRNAs que apresentaram diferenças de expressão foram: 1) hiperexpressos - *miR-200c-3p*, *miR-206*; e 2) hipoeexpressos - *miR-124-3p*; *miR-210-3p*; *miR-19a-3p* (Figura 9C).

Entre os CS e os SEE, os miRNAs que apresentaram diferença de expressão foram: 1) hiperexpressos - *miR-205-5p*, *miR-200c-3p*; e 2) hipoexpresso - *miR-124-3p* (Figura 9D). Na comparação entre os CS e os AS, os miRNAs observados com diferença de expressão foram: hiperexpressos - *miR-20b-5p*, *miR-96-5p*, *miR-205-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-183-5p*, *miR-138-5p*, *miR-135b-5p*, *miR-9-5p*, *miR-210-3p*, *miR-17-5p*, *miR-19a-3p*, *miR-18a-5p*, *miR-32-5p*, *miR-181c-5p* (Figura 9E).

Na análise entre os SEE e AS, os miRNAs que apresentaram diferença de expressão foram: 1) hiperexpressos - *miR-20b-5p*, *miR-218-5p*, *miR-124-3p*, *miR-301a-3p*, *miR-9-5p*, *miR-144-3p*, *miR-19a-3p*, *miR-18a-5p*; e 2) hipoexpresso - *miR-200c-3p* (Figura 9F).

Comparando os dados de *fold regulation* dos 42 miRNAs que apresentaram diferenças de expressão nos sarcomas uterinos (*hsa-let-7a-5p*, *miR-122-5p*, *miR-96-5p*, *miR-184*, *miR-205-5p*, *miR-181a-5p*, *miR-140-5p*, *miR-146b-5p*, *miR-193b-3p*, *miR-183-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-134-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *hsa-let-7c-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *miR-218-5p*, *miR-29b-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-206*, *miR-124-3p*, *miR-181d-5p*, *miR-301a-3p*, *miR-200c-3p*, *miR-1-3p*, *miR-150-5p*, *miR-27b-3p*, *miR-7-5p*, *miR-127-5p*, *miR-29a-3p*, *hsa-let-7d-5p*, *miR-9-5p*, *hsa-let-7f-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-210-3p*, *miR-143-3p*, *miR-215-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-126-3p*, *miR-27a-3p*, *miR-372-3p* e *miR-23b-3p*), observou-se que dentre eles, 6 miRNAs destacaram-se por apresentar diferenças significativas de expressão entre os diferentes tipos histológicos: *miR-96-5p* ($p < 0,001$; LMSxCS), *miR-205-5p* ($p = 0,016$; CSxSEE), *miR-181a-5p* ($p = 0,010$; CSxLMS), *miR-135b-5p* ($p = 0,018$; CSxLMS), *miR-183-5p* ($p = 0,012$; CSxLMS) e *miR-193b-3p* ($p = 0,008$; CSxLMS).

Figura 9- Gráficos de dispersão apresentando o perfil de expressão dos miRNAs entre as amostras de LMS e CS (9-A), LMS e SEE (9-B), LMS e AS (9-C), CS e SEE (9-D), CS e AS (9-E) e SEE e AS (9-F). Os círculos vermelhos indicam os miRNAs hiperexpressos e os verdes hipoexpressos.

Para avaliarmos esses 6 miRNAs, foram feitas análises com base no cálculo de *fold regulation* individualizado para os miRNAs de cada paciente do estudo. Diferentemente das análises realizadas no *software*, onde o *fold* de expressão para cada miRNA é calculado em grupos (nesse caso, LMS – CS – SEE – AS), levando em consideração a média dos valores de Ct e ΔCt para cada um deles, o cálculo individualizado é feito através do cálculo dos ΔCt s, $\Delta\Delta Ct$ s ($\Delta Ct^{\text{miRNA grupo teste}} - \Delta Ct^{\text{miRNA amostra referência}}$), RQs ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e aplicação do logaritmo na base 2 para o *fold* de expressão.

Para o cálculo do *software*, como já citado anteriormente foi utilizado a fórmula $2^{-\Delta Ct}$ tanto para os grupos testes, quanto para o grupo controle e a partir daí, foi calculado o *fold-change* da seguinte forma: $2^{-\Delta Ct (\text{teste})} / 2^{-\Delta Ct (\text{controle})}$. A partir dessa primeira análise, foi possível selecionar os miRNAs que apresentavam maiores diferenças de expressão e então, foram obtidos os gráficos mostrando os grupos com os respectivos desvios-padrão, juntamente com a dispersão na expressão dos miRNAs. Ressaltamos que as diferenças nas análises determinam a variação na diferença de *fold*, porém, o padrão de expressão apresentado deve se manter como ocorreu para os nossos dados.

Nessa análise, foi observada maior expressão do *miR-96-5p* nos CS. Diferenças significativas de expressão foram encontradas entre os CS/LMS e entre LMS/SEE. A diferença mais representativa foi encontrada entre os CS/LMS ($p < 0,001$). Da mesma forma, o *miR-205-5p* apresentou diferença na quantidade de transcrito entre CS/SEE, com maior expressão nos CS ($p = 0,016$).

O *miR-181a-5p* mostrou um aumento de expressão em todos tecidos analisados, com diferença significativa entre os CS/LMS ($p = 0,010$), sendo nos CS a maior expressão encontrada. O *miR-135b-5p* também apresentou-se hiperexpresso em todos os tipos tumorais, com a diferença significativa entre os CS/LMS ($p = 0,018$), sendo observado nos CS os maiores níveis de expressão. O *miR-183-5p* mostrou-se mais expresso nos CS e SEE, sendo a diferença significativa de expressão encontrada entre os CS/LMS ($p = 0,012$).

Já o *miR-193b-3p*, apresentou-se hipoexpresso em todos os tipos tumorais, sendo nos AS onde a hipoexpressão foi mais acentuada. Houve diferença significativa de expressão desse miRNA entre os CS/LMS ($p = 0,008$).

Os gráficos que demonstram as diferenças de expressão podem ser visualizados na Figura 10.

Figura 10- Gráficos mostrando as diferenças nos níveis de expressão do *hsa-miR-96-5p*, *hsa-miR-205-5p*, *hsa-miR-181a-5p*, *hsa-miR-135b-5p*, *hsa-miR-183-5p* e *hsa-miR-193b-3p* entre os sarcomas e carcinosarcomas uterinos.

* Localiza no gráfico onde há diferença de expressão entre os tecidos

** Indica que um mesmo tumor apresentou diferença de expressão em comparação com outros dois tecidos

4.3. Associação da expressão dos miRNAs com os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes

Todos os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes incluídas no estudo foram avaliados quanto à sua associação com a expressão dos miRNAs. No entanto, não foi possível realizar associações com os dados das pacientes com AS, devido ao pequeno número de amostras que permaneceram nas análises (n=2).

Quanto a idade das pacientes, observou-se, para aquelas com idade acima de 50 anos acometidas por LMS, associação entre a hipoeexpressão de *miR-200c-3p* (p=0,049) e hiperexpressão de *miR-29a-3p* (p=0,033).

Nos SEE, cuja queixa principal das pacientes foi sangramento uterino, foi observado menor expressão do *miR-142-5p* (p=0,031), *miR-148b-3p* (p=0,016) e *miR-214-3p* (p=0,016).

Nas amostras de LMS de pacientes menopausadas, houve associação entre a hipoeexpressão do *miR-148a-3p* (p=0,022), *miR-7-5p* (p=0,023) e *miR-32-5p* (p=0,030). Diferentemente das amostras de CS de pacientes menopausadas, nas quais observou-se hiperexpressão do *miR-30c-5p* (p<0,001), *miR-148a-3p* (p=0,004), *miR-100-5p* (p=0,034) e *hsa-let-7i-5p* (p<0,001). Do mesmo modo, foi observado hiperexpressão do *miR-335-5p* (p=0,025) nos casos de SEE para essa variável.

As amostras de SEE de mulheres que faziam uso de contraceptivo oral, apresentaram maior expressão do *miR-132-3p* (p=0,005) e *miR-34c-5p* (p=0,006). Sendo esses os únicos miRNAs associados com essa variável clínica nessa análise.

Pacientes com SEE que fizeram terapia de reposição hormonal (TRH), tiveram amostras tumorais associadas ao aumento de expressão do *miR-125a-5p* (p=0,039), *miR-222-3p* (p=0,039) e *miR-205-5p* (p=0,019).

Quanto ao tabagismo, mulheres fumantes com CS apresentaram hipoeexpressão no tecido tumoral de *miR-125a-5p* (p=0,018), *miR-30c-5p* (p=0,018), *miR-135b-5p* (p=0,011), *let-7i-5p* (p=0,006), *miR-27b-3p* (p=0,011), *miR-29a-3p* (p=0,044), *hsa-let-7f-5p* (p=0,018), *miR-34a-5p* (p=0,011), *miR-25-3p* (p=0,007), *miR-125b-5p* (p=0,028), *miR-23b-3p* (p=0,028), *miR-335-5p*

($p=0,044$) e *miR-21-5p* ($p=0,029$). De modo semelhante, amostras de SEE de mulheres fumantes, apresentaram hipoexpressão de *miR-27b-3p* ($p=0,006$) e *miR-143-3p* ($p=0,038$).

Nesse estudo, as amostras de pacientes que foram a óbito devido às complicações referentes aos CS, apresentaram uma hipoexpressão do *miR-122-5p* ($p=0,025$). Diversamente, houve associação entre a hiperexpressão do *miR-96-5p* ($p=0,023$), *miR-132-3p* ($p=0,026$), *miR-183-5p* ($p<0,001$) e *miR-124-3p* ($p=0,024$) nas amostras de pacientes que foram a óbito devido aos LMS. Da mesma forma, houve associação entre a maior expressão de *miR-29b-3p* ($p=0,027$) e *miR-206* ($p=0,026$) em amostras de mulheres com SEE.

Para a variável recorrência tumoral, foram observadas associações com a expressão de miRNAs em todos os tipos tumorais. O *miR-148a-3p* ($p=0,021$), *miR-29b-3p* ($p=0,008$) e *miR-29a-3p* ($p=0,040$) foram hipoexpressos nas amostras de LMS, enquanto *miR-301a-3p* ($p=0,027$) e *miR-144-3p* ($p=0,020$) foram hiperexpressos. Amostras teciduais de mulheres com CS, que apresentaram recorrência, mostraram hiperexpressão de *miR-335-5p* ($p=0,050$), *miR-96-5p* ($p=0,008$), *miR-378a-3p* ($p=0,028$), *miR-130a-3p* ($p=0,046$), *miR-183-5p* ($p=0,010$), *miR-134-5p* ($p=0,016$), *miR-7-5p* ($p=0,040$), *miR-128-3p* ($p=0,026$), *miR-18a-5p* ($p=0,033$), *miR-203a-3p* ($p=0,020$) e *miR-32-5p* ($p=0,008$). Já nas amostras de SEE, foi observado apenas a hiperexpressão do *miR-301a-3p* ($p=0,041$).

Em amostras de pacientes com LMS que apresentaram recidiva foi observada hiperexpressão do *miR-301a-3p* ($p=0,016$). Nos casos de CS onde ocorreu recidiva houve hiperexpressão do *miR-127-5p* ($p=0,045$).

Quanto a ocorrência de metástase, em amostras de pacientes com LMS, verificou-se menor expressão de *miR-140-5p* ($p=0,002$), *miR-193b-3p* ($p=0,002$), *let-7i-5p* ($p=0,034$), *miR-27b-3p* ($p=0,029$), *miR-143-3p* ($p=0,004$) e *miR-125b-5p* ($p=0,025$). Foi observado aumento de expressão de *miR-193b-3p* ($p=0,015$) e *miR-210-3p* ($p=0,044$) nas amostras de pacientes que desenvolveram metástases a partir de SEE.

Houve associação entre a expressão de 4 miRNAs com o estadiamento clínico (exceto para grau III). No estadiamento grau II houve associação da hipoexpressão de *miR-335-5p* ($p<0,001$) e *miR-218-5p* ($p=0,014$) em amostras

de CS e *miR-23b-3p* ($p=0,017$) nos SEE. Já para o grau IV, houve associação da hiperexpressão do *miR-7-5p* ($p=0,014$) em amostras de SEE.

Os LMS de alto grau histológico mostraram diferença de expressão para 30 miRNAs, sendo *miR-125a-5p* ($p=0,047$), *miR-222-3p* ($p=0,040$), *miR-148b-3p* ($p=0,050$), *miR-92a-3p* ($p=0,029$), *miR-205-5p* ($p=0,010$), *miR-20a-5p* ($p=0,008$), *miR-30c-5p* ($p=0,031$), *hsa-let-7f-5p* ($p=0,045$), *miR-218-5p* ($p<0,001$), *miR-100-5p* ($p=0,044$), *miR-155-5p* ($p=0,012$), *miR-1-3p* ($p=0,011$), *miR-191-5p* ($p=0,024$), *hsa-let-7d-5p* ($p=0,010$), *miR-15b-5p* ($p=0,002$), *miR-98-5p* ($p=0,002$), *miR-25-3p* ($p=0,010$), *miR-128-3p* ($p=0,041$), *miR-143-3p* ($p=0,047$), *miR-19a-3p* ($p=0,031$), *miR-23b-3p* ($p=0,017$), *miR-16-5p* ($p=0,033$), *miR-17-5p* ($p=0,034$), *miR-18a-5p* ($p=0,049$) e *miR-27b-3p* ($p=0,020$) hiperexpressos e *hsa-let-7a-5p* ($p=0,008$), *hsa-let-7b-5p* ($p=0,009$), *hsa-let-7g-5p* ($p=0,005$), *hsa-let-7c-5p* ($p=0,029$) e *hsa-let-7e-5p* ($p=0,014$) hipoexpressos. Nos CS, *miR-184* ($p<0,001$) mostrou hipoexpressão associada ao alto grau histológico.

Adicionalmente, a título de curiosidade, uma análise foi realizada com os dados clínicos das pacientes e de expressão dos miRNAs em LMS juntamente com SEE. Esse agrupamento de dados foi feito uma vez que esses tipos tumorais possuem mesmas características de estadiamento FIGO e classificação histológica, sendo os dois tipos classificados como tumores mesenquimais malignos puros. O resultado dessa análise bem como a descrição dos miRNAs significativamente associados aos dados clínicos nos outros tumores estão representados na Tabela 10.

Tabela 10- Associação entre a expressão dos miRNAs e os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes incluídas nas análises (n=80)

Variável clínica	LMS	CS	SEE	LMS-SEE
Idade (maior que 50 anos)	220c-3p; 29a-3p			21-5p; 200c-3p
Queixa principal - Sangramento			142-5p; 148b-3p; 214-3p	
Menopausa	148a-3p; 7-5p; 32-5p	30c-5p*; 148a-3p; 100-5p; let-7i-5p*	335-5p	193b-3p
Uso de contraceptivo oral			132-3p; 34c-5p	34c-5p; 148a-3p; 15b-5p; 34a-5p
TRH			125a-5p; 222-3p; 205-5p	205-5p; 193b-3p; 155-5p*
Tabagismo		125a-5p; 30c-5p; 135b-5p; let-7i-5p; 27b-3p; 29a-3p; let-7f-5p; 34a-5p; 25-3p; 125b-5p; 23b-3p; 335-5p; 21-5p	27b-3p; 143-3p	let-7i-5p; 27b-3p; let-7d-5p; let-7f-5p; 143-3p; 23b-3p
Pacientes que foram a óbito	96-5p; 132-3p; 183-5p*; 124-3p	122-5p	29b-3p; 206	142-5p; 96-5p; 183-5p; 373-3p; 29b-3p; 206; 146a-5p; 301a-3p; 10a-5p; 210-3p; 144-3p
Recorrência	148a-3p; 29b-3p; 301a-3p; 29a-3p; 144-3p	335-5p; 96-5p; 378a-3p; 130a-3p; 183-5p; 134-5p; 7-5p; 128-3p; 18a-5p; 203a-3p; 32-5p	301a-3p	335-5p; 125a-5p; 206; 301a-3p*; 29a-3p; 144-3p
Recidiva	301a-3p;	127-5p		335-5p; 301a-3p*; 144-3p
Metástase	140-5p; 193b-3p; let-7i-5p; 27b-3p; 143-3p; 125b-5p		193b-3p; 210-3p	200c-3p; 27b-3p; 125b-5p
Estadiamento I				7-5p
Estadiamento II		35-5p*; 218-5p	23b-3p	1-3p; let-7i-5p; let-7d-5p; 27b-3p; 144-3p; 23b-3p
Estadiamento IV			7-5p	

continua

				conclusão
Variável clínica	LMS	CS	SEE	LMS-SEE
Alto grau histológico	let-7a-5p; 125a-5p; 222-3p; 148b-3p; 92a-3p; let-7b-5p; 205-5p; 20a-5p; 30c-5p; let-7g-5p; let-7c-5p; let-7e-5p; let-7f-5p; 218-5p*; 100-5p; 155-5p; 1-3p; 191-5p; let-7d-5p; 15b-5p; 98-5p; 25-3p; 128-3p; 143-3p; 19a-3p; 23b-3p; 16-5p; 17-5p; 18a-5p; 27b-3p	184*		335-5p; 184; 301a-3p

• miRNAs em cor vermelha = hiperexpressão associada com a variável clínica ($p < 0,05$)

● miRNAs em cor verde = hipoexpressão associada com a variável clínica ($p < 0,05$)

* $p < 0,001$

As taxas de sobrevida livre de doença (SLD) e de sobrevida câncer específica (SCE) foram calculadas para cada um dos miRNAs avaliados em associação com os respectivos tipos tumorais. Os gráficos estão apresentados nas Figuras 11-16.

Nos LMS a hiperexpressão (*fold* maior que 4) do *miR-196a-5p* apresentou forte associação com menor SCE, em comparação com *fold* menor que 4 ($p < 0,001$) (Figura 11A). Da mesma forma, houve uma associação da hiperexpressão do *miR-34c* com uma menor SCE das pacientes ($p = 0,002$) (Figura 11B).

Já a hipoexpressão (*fold* menor que -4) do *miR-125a-5p* apresentou associação com menores taxas de SCE nos LMS em comparação com o *fold* maior que -4 ($p = 0,010$) (Figura 11C), seguido do *miR-10a-5p*, onde sua hipoexpressão também foi associada com uma menor SCE nas pacientes ($p = 0,017$) (Figura 11D).

Quanto a SLD das pacientes com LMS, a hiperexpressão do *miR-135b-5p* foi associado com maiores taxas de sobrevida ($p = 0,025$) (Figura 12).

Figura 11- Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE em relação à expressão dos miRNAs *miR-196a-5p* (11-A), *miR-34c-5p* (11-B), *miR-125a-5p* (11-C) e *miR-10a-5p* (11-D) nos LMS.

Figura 12- Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD associada à expressão do *miR-135b-5p* nos LMS.

A hiperexpressão do miRNA *miR-184* apresentou uma associação com uma menor SCE das pacientes com CS ($p=0,016$) (Figura 13A). Já a hipoexpressão do miRNA *hsa-let-7b-5p* está fortemente associada com uma menor SCE ($p<0,001$) (Figura 13B). Valores de *fold* maiores que 4 para *miR-124-3p* foram associados com uma maior SCE das pacientes com CS ($p=0,038$) (Figura 13C). *miR-205-5p* apresentou associação com SLD das mulheres com CS. Sua hiperexpressão foi associada com menores taxas de SLD ($p=0,046$) (Figura 14).

Figura 13- Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE em relação à expressão dos miRNAs *miR-184* (13-A), *let-7b-5p* (13-B) e *miR-124-3p* (13-C) nos CS.

Figura 14- Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD associada à expressão do *miR-205-5p* nos CS.

Foram calculadas as taxas de sobrevida para os casos de SEE-AG, por ser um tumor de pior prognóstico, apresentando menores de taxas de sobrevida global que os demais SEE.

A hiperexpressão e a hipoexpressão do miRNA *hsa-let-7b-5p* apresentaram associação com menores taxas de SCE, sendo a hipoexpressão mais fortemente associada com este fator. *Folds* que variaram do -4 ao 4, representam um melhor prognóstico para as pacientes, uma vez que a sobrevida aumenta proporcionalmente ($p=0,041$) (Figura 15A). *Fold* maior que 4 do miRNA *miR-138-5p*, apresentou uma associação com uma maior SCE nas pacientes com SEE-AG, em comparação com *fold* abaixo de 4 ($p=0,038$) (Figura 15B). A hiperexpressão do miRNA *miR-373-3p* foi fortemente associada com uma menor SCE ($p<0,001$) (Figura 15C). A hiperexpressão do *miR-372-3p* foi fortemente associado a uma menor SCE ($p<0,001$) (Figura 15D).

Já a hipoexpressão do *hsa-let-7f-5p* foi associada a uma menor SCE nas pacientes com SEE-AG ($p=0,012$) (Figura 15E), semelhantemente ao *miR-23b-3p* onde sua hipoexpressão foi associada a uma menor SCE ($p= 0,012$) (Figura 15F). Quanto a SLD, a hiperexpressão (*fold* acima de 4) do miRNA *miR-9-5p* foi associado às maiores taxas nesses tumores (Figura 16).

Figura 15- Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SCE em relação à expressão dos miRNAs *let-7b-5p* (15-A), *miR-138-5p* (15-B), *miR-373-3p* (15-C), *miR-372-3p* (15-D), *let-7f-5f* (15-E) e *miR-23b-3p* (15-F) nos SEE-AG.

Figura 16- Curva de Kaplan-Meier mostrando as taxas de SLD associada à expressão do *miR-9-5p* nos SEE-AG.

4.4. Associação da expressão dos miRNAs em amostras de pacientes que realizaram tratamento adjuvante com os dados de metástase ou recidiva e SLD

Das 68 pacientes que realizaram tratamento adjuvante (quimioterapia, radioterapia e ambos), 60 tiveram a análise do perfil de expressão de miRNAs realizada. Seis pacientes possuíam dados incompletos ou ignorados, sendo assim, excluídas das associações.

Três miRNAs apresentaram diferenças de expressão quando comparadas à pacientes que tiveram (n=41) ou não (n=13) metástase/recidiva: *miR-335-3p*, *miR-301a-3p* e *miR-210-3p* (Figura 17).

A maioria das pacientes com LMS (n=26) 21 tiveram metástase/recidiva e 5 não, com CS (n=14) 9 tiveram metástase/recidiva e 5 não. O mesmo foi observado para as 14 pacientes com SEE (n=13) e AS (n=1). Quando avaliadas as associações entre expressão dos miRNAs citados anteriormente com os dados de metástase/recidiva nos LMS (Figura 18) e CS (Figura 19), individualmente, houve diferença significativa de expressão do *miR-335-5p* (p= 0,015) e do *miR-301a-3p* (p= 0,025) somente nos LMS. Não foi possível realizar análise estatística nos SEE, devido ao número de casos de pacientes

que não tiveram metástase/recidiva (n=2), sendo um grupo muito pequeno para realização das análises.

Figura 17- miRNAs que apresentaram diferença de expressão significativa entre pacientes que realizaram tratamento adjuvante com ou sem metástase/recidiva.

Figura 18- *miR-335-5p* e *miR-301a-3p* apresentaram diferença de expressão entre as pacientes com LMS e foram tratadas, sendo ou não acometidas por metástase/recidiva. *miR-210-3p* não apresentou diferença significativa de expressão.

Figura 19- *miR-335-5p*, *miR-301a-3p* e *miR-210-3p* não apresentaram diferença de expressão significativa entre as pacientes com CS e foram tratadas, sendo ou não acometidas por metástase/recidiva.

A análise de correlação, mostrou uma associação positiva entre 3 miRNAs com SLD (Tabela 11). A correlação mais forte encontrada (*miR-138-5p*, $r=0,534$, $p<0,001$), está representada na Figura 20.

Tabela 11- Análise de correlação entre a expressão do *miR-138-5p*, *miR-146b-5p* e *miR-218-5p* e a SLD das pacientes que realizaram tratamento adjuvante

miRNA	r	p
miR-138-5p	0,534	<0,001
miR-146b-5p	0,358	0,032
miR-218-5p	0,331	0,048

Figura 20- Gráfico de dispersão mostrando a associação entre a expressão do *miR-138-5p* das pacientes que fizeram tratamento adjuvante, com a SLD das mesmas (em meses).

4.5. Rede de interação entre os miRNAs e seus principais alvos moleculares envolvidos com o desenvolvimento de câncer

Cada miRNA pode ter dezenas de alvos. Essas moléculas pareiam-se com mRNAs específicos e regulam sua estabilidade e tradução. Para avaliarmos as redes de interação dos miRNAs e seus potenciais alvos, foram selecionados aqueles que mostraram associação com sobrevida das pacientes com sarcomas e carcinossarcomas uterinos e que apresentaram maior diferença de expressão: *miR-96-5p*, *miR-373-3p*, *miR-9-5p*, *hsa-let-7a-5p*, *miR-205-5p*.

Através de pesquisa bibliográfica dos estudos de validação de miRNAs com seus respectivos genes-alvo e com o auxílio de duas plataformas de dados: *miRTarBase*, disponível no site (<http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) e *Diana Tools*, disponível no site (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>), foram estabelecidas as principais vias de interações desses miRNAs.

— Fortes evidências (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR)

Outras evidências

Adaptado de: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 21- Rede de interação do *miR-96-5p* com seus alvos moleculares. O *miR-96-5p* está representado no centro da figura (*hsa-miR-96-5p*). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR), sendo as linhas azuis clara representadas por interações comprovadas por experimentos menos robustos (microarray, NGS, pSILAC e outros). Os genes associados a esse miRNA que estão destacados em vermelho (*BCL2*, *FOXO1*, *MITF*, *CDKN1A*, *DDIT3*, *HOXA9*, *APPL1*, *GTF2A1*, *KRAS*, *YWHAG*, *RELA* e *SGK3*), são os mais importantes envolvidos com vias de sinalização em câncer.

Adaptado de: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 22- Rede de interação do *miR-373-3p* com seus alvos moleculares. O *miR-373-3p* está representado no centro da figura (*hsa-miR-373-3p*). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR), sendo as linhas azuis clara representadas por interações comprovadas por experimentos menos robustos (microarray, NGS, pSILAC e outros). Os genes associados a esse miRNA que estão destacados em vermelho (*RELA*, *VEGF* e *mTOR*), são os mais importantes envolvidos com vias de sinalização em câncer.

- Fortes evidências (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR)
- Outras evidências

Adaptado de: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 23- Rede de interação do *miR-9-5p* com seus alvos moleculares. O *miR-9-5p* está representado na figura (*hsa-miR-9-5p*). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR), sendo as linhas azuis clara representadas por interações comprovadas por experimentos menos robustos (microarray, NGS, pSILAC e outros). Os genes associados a esse miRNA que estão destacados em vermelho (*NF-κB*, *ETS1*, *CDH1*, *EP300*, *VEGFA* e *FOXO1*), são os mais importantes envolvidos com vias de sinalização em câncer.

- Fortes evidências (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR)
- Outras evidências

Adaptado de: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 24- Rede de interação do *hsa-let-7a-5p* com seus alvos moleculares. O *hsa-let-7a-5p* está representado no centro da figura (*hsa-let-7a-5p*). As linhas azuis escuras representam interações comprovadas por experimentos mais robustos (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR), sendo as linhas azuis clara representadas por interações comprovadas por experimentos menos robustos (microarray, NGS, pSILAC e outros). Os genes associados a esse miRNA que estão destacados em vermelho (*E2F1*, *NF-κB*, *E2F2*, *NRAS*, *BCL2*, *KRAS*, *CASP3*, *MYC*, *CASP9*, *HRAS*, *CASP8*, *CCND2* e *IL6*), são os mais importantes envolvidos com vias de sinalização em câncer.

Adaptado de: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

Figura 25- Rede de interação do miR-205-5p com seus alvos moleculares. O *miR-205-5p* está representado no centro da figura (*hsa-miR-205-5p*). As linhas azuis escuro representam interações comprovadas por experimentos mais robustos (reporter assay, western blot, qRT-PCR ou qPCR), sendo as linhas azuis clara representadas por interações comprovadas por experimentos menos robustos (microarray, NGS, pSILAC e outros). Os genes associados a esse miRNA que estão destacados em vermelho (*E2F1*, *E2F5* e *VEGFA*), são os mais importantes envolvidos com vias de sinalização em câncer.

Como pôde ser observado nas figuras 21-25, os miRNAs estão envolvidos com a regulação de diversas vias de sinalização pró-carcinogênicas, incitando dessa forma, a realização de futuras pesquisas que visem estabelecer os efeitos biológicos dessas interações.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A análise dos dados clínicos e anatomopatológicos das 100 pacientes incluídas nesse estudo mostrou que 71% tinha mais de 50 anos ao diagnóstico, com média de idade de 58 anos. Segundo Ghaemmaghami e colaboradores (2008) os sarcomas uterinos ocorrem principalmente em mulheres com idade entre 40 a 60 anos de idade, de modo que nossos dados corroboram a literatura.

Em nossa casuística, a principal queixa das pacientes foi o sangramento vaginal anormal, dado que também corrobora a literatura ao analisarmos todos os tipos histológicos em conjunto (D'Angelo e Prat, 2010). A maioria das pacientes eram menopausadas, o que era esperado uma vez que os sarcomas e carcinomas uterinos geralmente são diagnosticados em mulheres em idade mais avançada (Vrzic-Petronijevic *et al.*, 2006).

O tratamento de escolha para 98% das pacientes foi a histerectomia, sendo esse o tratamento cirúrgico padrão para os sarcomas e carcinosarcomas uterinos (Kanthan e Senger, 2011; Reichardt, 2012).

Observamos que em 59% dos casos ocorreram metástases, sendo 76% à distância. Já está bem explanado na literatura que os sarcomas uterinos têm um comportamento clínico agressivo, com grande tendência à recorrência local e disseminação à distância (Gadducci *et al.*, 2008). Além disso, verificamos que a maioria das pacientes foram a óbito (70%). Naaman e colaboradores (2011) descrevem que a sobrevida global para os sarcomas uterinos é baixa, 50-70% para pacientes em estágio I e apenas 0-20 % para os demais estádios.

Relevantes associações foram observadas entre a expressão de miRNAs e as variáveis clínicas analisadas. Pacientes com LMS e SEE com idade acima de 50 anos, mostraram associação com a expressão do *miR-220-3p*, *miR-29a-3p*, *miR-21-5p* e *miR-200c-3p*. Conforme já explicitado, o desenvolvimento de sarcomas uterinos é mais comum em mulheres mais velhas e menopausadas, por volta de 57 anos de idade (Sait *et al.*, 2014). Vários miRNAs foram identificados com regulação diferencial de expressão

durante o processo de envelhecimento em mamíferos quando comparado tecido de ratos jovens com ratos mais velhos (Smith-Vikos e Slack, 2012).

A hipoexpressão do *miR-220c* foi associada a células normais CD34(+) em comparação a células da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (Wang *et al.*, 2012). A família *miR-200* é descrita por inibir a angiogênese por meio de mecanismos diretos e indiretos através dos alvos *IL-8* e *CXCL1* secretados pelas células endoteliais do tumor (Pecot *et al.*, 2013).

Evidências da ação do *miR-29a-3p* como um gene supressor de tumor, mostram que essa molécula pode suprimir a proliferação celular e o bloqueio do ciclo celular através da hiporregulação do gene *p42.3*. No entanto esse miRNA também pode atuar como um oncogene sob condições específicas de cada tumor (Yan *et al.*, 2015). Kwekel e colaboradores (2015) caracterizaram o perfil renal de miRNAs de ratos machos e fêmeas ao longo da vida. A família *miR-29* foi um dos exemplos de miRNAs que apresentaram mudanças no perfil de expressão com a idade, exibindo baixos níveis em ratos mais jovens e altos níveis em ratos mais velhos. Esse estudo ainda relaciona a expressão desse miRNA com processos de envelhecimento, como distúrbios do sistema endócrino e câncer.

Um estudo de Hooten e colaboradores (2013) que avaliou mudanças nos níveis de miRNAs no soro de pacientes associadas à idade, indicou que não há diferenças significativas de expressão de *miR-21-5p* entre indivíduos jovens e mais velhos, porém, há indícios que o nível de *miR-21* aumenta com a idade.

A apresentação clínica usual dos SEE é a hemorragia uterina anormal (Puliyath e Nair, 2012). Nessas amostras houve associação da hipoexpressão de *miR-142-5p*, *miR-148b-3p* e *miR-214-3p* com essa variável clínica. O *miR-142* é um dos miRNAs mais predominantemente expresso na linhagem hematopoiética. Redução nos níveis de expressão desse miRNA provoca maturação deficiente de megacariócitos, inibição da poliploidização, formação pró-plaquetária anormal e trombocitopenia (Chapnik *et al.*, 2014). O sangramento é a mais importante complicação relacionada com a presença de trombocitopenia (Knöbl, 2016). O *miR-148b-3p* aparece na literatura como hiperexpresso em sarcoma sinovial em comparação com amostras de LMS,

tumor maligno da bainha do nervo periférico (TMBNP), sarcoma de Ewing e lipossarcoma (Fricke, 2015). Já o *miR-214* aparece na literatura relacionado a sobrevivência celular e resistência à cisplatina através da regulação negativa de *PTEN* e ativação de *Akt* no câncer de ovário (Yang *et al.*, 2008).

A hipoexpressão e a hiperexpressão do *miR-148a-3p* tiveram associação com a menopausa em mulheres que desenvolveram LMS e CS, respectivamente. A desregulação desse miRNA já foi anteriormente observada em osteossarcomas (Bhattacharya *et al.*, 2016). A hiperexpressão do *miR-100-5p* também foi associada à essa variável nos CS. O *miR-100* apresenta-se hiporregulado em amostras de câncer de endométrio estrógeno-dependentes em comparação com amostras estrógeno-independentes (Zhou *et al.*, 2010).

Houve associação entre a hipoexpressão do *miR-7-5p* e menopausa em mulheres com LMS. A literatura mostra que esse miRNA suprime a expressão de *EGFR* em várias neoplasias. Essa expressão mostra-se aumentada em linhagem celular de carcinoma de mama (MCF-7) quando tratadas com estradiol (E2) (Masuda *et al.*, 2012). Mudanças como distúrbios hemostáticos, observados em casos de arterosclerose e neoplasias, são observadas na menopausa. Acredita-se que os miRNAs desempenham papel importante no desenvolvimento e regulação desses processos (Stachowiak *et al.*, 2015).

O *miR-193b-3p* que apresentou hipoexpressão associada à menopausa em pacientes com LMS/SEE, apresenta esse mesmo perfil em lipossarcomas desdiferenciados (Fujiwara *et al.*, 2014). Já a desregulação do *miR-32-5p* associada à essa variável em pacientes com LMS é descrita como um marcador capaz de distinguir sarcomas uterinos e tumores mistos epitelial/mesenquimal de leiomiomas (Kowalewska *et al.*, 2013). A hiperexpressão do *miR-335-5p* foi associada com a menopausa em casos de SEE. Essa molécula está relacionada com a regulação do metabolismo de colesterol/triglicérides (Stachowiak *et al.*, 2015).

Um dos miRNAs que apresentam hiperexpressão associada à menopausa nos CS foi o *miR-30c-5p*. Esse miRNA tem sido relatado como supressor tumoral em câncer de endométrio (Kong *et al.*, 2014). Outro supressor tumoral *let-7i-5p*, que também teve hiperexpressão relacionada à essa variável em pacientes com CS, pode regular ER α sob influência de

estradiol (E2). Esse fato já foi associado ao desenvolvimento de câncer de mama, doença comum em mulheres na pós-menopausa (Kumar *et al.*, 2014).

Sabendo-se que o uso de anticoncepcionais é um dos fatores de risco associado ao desenvolvimento de sarcomas uterinos (Felix *et al.*, 2013), o envolvimento da desregulação da expressão de miRNAs associado à esse fator, torna-se um importante dado, uma vez pode ajudar a elucidar processos relacionados à carcinogênese. Nesse aspecto, houve associação da hiperexpressão de 2 miRNAs nas amostras de SEE, *miR-34c-5p* e *miR-132-3p*. Quando avaliados em conjunto os LMS aos SEE a associação da hipoexpressão do *miR-148a-3p* e da hiperexpressão do *miR-15b-5p* e *miR-34a-5p* também foram reveladas.

O mecanismo pelo qual hormônios esteróides regulam a expressão de miRNAs permanece em grande parte desconhecida. Porém, no estudo de Hsu e colaboradores (2016) foi observado que o tratamento com esteróides hormonais elevou os níveis do *miR-199a-5p* e *miR-34a-5p*, e o tratamento com um inibidor de *miR-34a-5p* foi capaz de reduzir os efeitos de hormônios sintéticos sobre a proliferação de células endometriais.

Dai e colaboradores (2008) mostraram, que o uso de estradiol (E2) aumentou os níveis de *miR-223*, *miR-451*, *miR-486*, *miR-148a*, *miR-18a* e *miR-708* nos linfócitos esplênicos de ratos. Já o estudo de Wu e colaboradores, (2015) mostraram que o *miR-132* está envolvido com a via de sinalização hormonal *AMPC* e promove a síntese de estradiol através da repressão de transcrição de *Nurr1* em células da granulosa dos ovários.

A diminuição dos níveis de estradiol em mulheres na pós-menopausa têm sido implicada no desenvolvimento de várias doenças. O papel dos estrógenos na regulação da expressão de miRNAs e de seus genes-alvo tem ainda muito a ser explorado (Klinge, 2009). He e colaboradores (2015) mostraram que não há correlação entre a expressão do *miR-125* e o status de expressão de receptores hormonais em câncer de mama. Nos sarcomas uterinos foi encontrada associação entre a hiperexpressão desse miRNA com terapia de reposição hormonal - TRH nos SEE, indicando que o perfil hormonal pode ser um fator de alteração da expressão dos miRNAs nessa neoplasia.

A hiperexpressão do *miR-222* foi associada a diminuição do ER α , além de regular as concentrações de estradiol em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (Li *et al.*, 2015). Houve associação desse perfil com a realização de TRH e o desenvolvimento de SEE. De forma semelhante, a hiperexpressão do *miR-205-5p* também foi associada à realização de TRH. A literatura mostra que o nível de expressão do *miR-205* pode estar associado ao status de expressão dos receptores hormonais no câncer de endométrio e com isso, mostra-se envolvido ao prognóstico das pacientes (Dong *et al.*, 2015).

Um estudo de Sang e colaboradores (2013) que avaliou os níveis de miRNAs em fluídos foliculares humanos, associou os níveis de *miR-193b* com a regulação da concentração de progesterona. Altos níveis desse miRNA foi associado à realização de TRH em sarcomas uterinos.

Estudos futuros que estabeleçam o mecanismo de desregulação dos miRNAs por vias hormonais podem ser importantes, principalmente em relação aos SEE, uma vez que são neoplasias hormônio-dependentes.

Outro miRNA que possui associação com a realização de TRH, em sarcomas uterinos, é o *miR-155-5p*. A expressão desse miRNA mostra-se maior no soro de pacientes com câncer de mama RP+ que no soro de pacientes RP- (Mattiske *et al.*, 2012).

As pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterinos foram avaliadas quanto ao hábito tabagista. As amostras de pacientes que fumavam tiveram associação negativa com diversos miRNAs. Aspectos consideráveis podem ser citados quanto a essas desregulações em alguns dos miRNAs. O *miR-125a-5p* possui funções relacionadas com a supressão tumoral em vários tipos de cânceres, incluindo ovário, bexiga, mama, carcinoma hepatocelular, melanoma, carcinoma de células escamosas cutâneas e osteossarcoma. Além disso, foi relatado que o *miR-125a-5p* participa da supressão de metástases em células pulmonares (Sun *et al.*, 2013).

Como já foi citado anteriormente, alguns membros da família *let-7* apresentam sua expressão alterada em sarcomas uterinos. Todos apresentaram-se hipoexpressos nos tecidos malignos, sugerindo seu papel supressor de tumor no trabalho de Kowalewska e colaboradores (2013). Além

disso, recentemente, a exposição ao fumo tem sido implicada na hiporregulação de *let-7*, oferecendo um possível mecanismo para a carcinogênese (Russ e Slack, 2012).

A hipoeexpressão do *miR-27b-3p* foi significativamente associada com tabagismo nos CS e nos LMS-SEE. Esse miRNA já foi relacionado com a supressão de células em câncer gástrico pela regulação da expressão do seu alvo *ROR1*, conhecido por desempenhar papel oncogênico em vários tumores malignos (Tao *et al.*, 2015). O estudo de Huang e colaboradores (2014), mostrou que esse gene (*ROR1*) foi altamente expresso em linhagens celulares de sarcoma, incluindo sarcoma de Ewing, osteossarcoma, rabdomiossarcoma embrionário ou alveolar e fibrossarcoma (Huang *et al.*, 2015).

Observamos em nossas análises que o *miR-29a-3p* também teve a diminuição de expressão associada ao tabagismo em CS. Esse mesmo perfil também foi observado no *miR-29b* em pacientes com câncer de pulmão onde houve histórico de tabagismo, sem que houvesse essa alteração em pacientes que nunca fumaram. Esses dados indicam que o tabagismo pode estar associado à desregulação de miRNAs juntamente com seus genes-alvo (Momi *et al.*, 2014).

O *miR-34a-5p* que também foi associado ao tabagismo, possui uma conexão direta com *p53* e *Wnt*, revelando uma ligação entre a perda da função supressora de tumor e a ativação da sinalização oncogênica (Cha *et al.*, 2012). Assim como o *miR-34a-5p*, *miR-125b-5p* também apresentou associação com *p53*, podendo ser um fator regulatório de vias de sinalização importantes, tais como *PI3K/AKT/mTOR*, uma via conhecida por estar desregulada em diversos tipos de cânceres (Sarver e Subramanian, 2015).

Nos SEE também houve a associação da hipoeexpressão do *miR-143-3p* ao tabagismo. Esse mesmo perfil de expressão já foi encontrado em CS e AS (Kowalewska *et al.*, 2013). A relevância do *miR-143* como um biomarcador vem sendo descrita, devido ao fato de apresentar diminuição de expressão em diferentes neoplasias. Isso poderia suprimir o crescimento de tumores do sistema urogenital, sistema digestivo, sistema respiratório, sistema nervoso, bem como alguns sarcomas e linfomas de células- B (Wu *et al.*, 2013).

A maioria das pacientes que fizeram parte desse estudo foi a óbito, principalmente as pacientes com LMS e CS. Um maior nível de expressão do *miR-96-5p*, *miR-132-3p*, *miR-183-5p* e *miR-124-3p* foram associados a essa variável, individualmente, nas pacientes com LMS. Enquanto a hipoeexpressão do *miR-122-5p* foi associada às pacientes com CS. *miR-96-5p* e *miR-183-5p* foram associados a recorrência tumoral com esse mesmo perfil de expressão, mostrando-se, possíveis marcadores de pior prognóstico em sarcomas e carcinosarcomas uterinos. *miR-132-3p*, já associado anteriormente ao uso de contraceptivo oral, foi descrito como hipoeexpresso no câncer colorretal (Kara *et al.*, 2015).

A hiperexpressão de *miR-124-3p* também foi associada ao óbito nas pacientes com LMS. A maioria dos estudos descrevem esse miRNA como um supressor tumoral, com expressão diminuída em processos carcinogênicos. Porém, Zhao e colaboradores (2010), mostraram sua hiperexpressão em linfoma de células do manto (um tipo raro de linfoma não-Hodgkin). Dessa forma, a identificação do aumento de expressão desse miRNA pode não ser benéfica, dependendo da circunstância. Já o *miR-122-5p* exerce função de supressão tumoral através de diferentes vias moleculares. Esse miRNA já foi descrito como potencial regulador do gene-alvo *ADAM10*, que pode mediar a resistência ao trastuzumab no câncer de mama (Ergün *et al.*, 2015).

Além desses miRNAs citados, *miR-29b-3p* e *miR-206* aparecem associados ao óbito em pacientes com SEE. *miR-206* possui *NOTCH3* como alvo. Os efeitos patogênicos da alteração da via de sinalização do *NOTCH* já foram descritos em osteossarcoma, sarcoma de Ewing e rabdomiossarcoma (Guijarro *et al.*, 2013). Já *miR-29b-3p*, associado também à recorrência tumoral, possui *SP1* como um de seus genes-alvo. Esse gene ativa e suprime a repressão de oncogenes e de supressores de tumor, assim como genes envolvidos em funções celulares essenciais como proliferação, diferenciação, resposta a danos do DNA, apoptose, senescência e angiogênese. A ação de *SP1* também influencia na inflamação, instabilidade genômica e silenciamento epigenético (Beishline e Azizkhan-Clifford, 2015). Outros miRNAs foram associados à essa variável na análise realizada com os LMS e SEE (*miR-142-5p*, *miR-373-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-301a-3p*, *miR-10a-5p*, *miR-210-3p* e *miR-*

144-3p). Esses marcadores podem ajudar a definir o prognóstico de tumores mesenquimais puros.

Os casos de sarcomas e carcinosarcomas uterinos também foram avaliados quanto a associação da expressão dos miRNAs e a presença de recorrência, recidiva e metástase. Os miRNAs podem controlar a metástase tumoral através da regulamentação divergente ou convergente de vias de sinalização. Algumas redes de regulação de miRNAs podem controlar fenótipos de células cancerosas, enquanto outras redes podem modular a composição celular extrínseca do microambiente metastático (Pencheva *et al.*, 2013).

Davidson e colaboradores (2014), realizaram um estudo que comparou os padrões de expressão gênica global entre LMS uterino primário e metastático, sendo os genes validados posteriormente por PCR em tempo real e imunohistoquímica. Os resultados confirmaram a existência de assinaturas gênicas únicas para LMS primário e metastático. Os autores apresentaram os genes *TNNT1*, *FOLR3*, *TDO2*, *CRYM*, *GJA1*, *TSPAN10*, *THBS1*, *SGK1*, *SHMT1*, *EGR2* e *AGT* como hiperexpressos nas metástases. Através de análises de interação dos miRNA com seus genes-alvo pela plataforma miRTarBase, observamos que numerosas moléculas que apresentaram associação com recorrência, recidiva e metástase aparecem regulando os genes citados pelos autores. *miR-29b-3p*, *miR-29a-3p* e *miR-125a-5p* regulam *SGK1*. *miR-335-5p*, *miR-125b-5p* e *miR-193b-3p* regulam *SHMT1*, *miR-130a-3p* e *miR-206* regulam *GJA1*, *miR-18a-5p* e *let-7i-5p* regulam *THBS1*. Essa análise confirma que a desregulação dessas moléculas pode estar relacionada com fenótipos tumorais agressivos.

Além disso, o perfil de hiperexpressão do *miR-96-5p*, que aparece associado a presença de recorrência em CS, está relacionado a estádios avançados de adenocarcinoma colorretal, com risco aumentado de recorrência da doença e baixa sobrevida global (Rapti *et al.*, 2016).

miR-200c, que foi associado à metástase nos LMS e SEE, mostrou-se hipoexpresso em pacientes com câncer epitelial de ovário em estágio I que recidivaram, em comparação às pacientes com o mesmo grau de estadiamento que não tiveram essa complicação. Diante desse resultado foi constatado que esse miRNA pode ser utilizado como um marcador de recidiva para essa

neoplasia (Marchini *et al.*, 2011). Observamos também, ao fazer o levantamento de literatura, que *miR-203* que está associado à presença de recorrência nos CS, constitui-se em um marcador de recidiva e metástases no câncer gástrico (Imaoka *et al.*, 2016).

Uma análise isolada contendo 54 pacientes que realizaram tratamento adjuvante, mostrou que 3 miRNAs foram diferencialmente expressos entre as pacientes que desenvolveram ou não metástases/recidiva. *miR-335-5p*, *miR-301a-3p* e *miR-210-3p* apresentaram maiores níveis de expressão nas pacientes que desenvolveram metástases/recidiva. As primeiras análises que incluem todas as pacientes do estudo, também mostraram essas associações (*miR-301a-3p*, $p=0,016$ /recidiva LMS e $p=0,027$ /recorrência LMS; $p<0,001$ /recorrência LMS-SEE e $p<0,001$ /recidiva LMS-SEE), (*miR-335-5p*, $p=0,050$ /recorrência CS; $p=0,043$ /recidiva LMS-SEE e $p=0,017$ /recorrência LMS-SEE), (*miR-210-3p* $p=0,044$ /metástase SEE). Esses dados nos levam a crer que o tratamento adjuvante não influenciou no ganho ou perda de expressão dessas moléculas.

Os meios específicos pelos quais desenvolvem-se recorrências, recidivas e metástases em sarcomas e carcinosarcomas uterinos permanecem desconhecidos. Alguns miRNAs foram destacados diante esse aspecto, porém, ressaltamos que uma ampla variedade de moléculas podem estar envolvidas com vias de sinalização que regulam esses meios.

O fator prognóstico mais importante para os sarcomas é o estadiamento clínico (Naaman *et al.*, 2011). A desregulação da expressão de miRNAs aparece associada com essa variável nessas neoplasias. Alguns membros da família *let-7* foram associados com o grau II de estadiamento (*let-7i-5p* e *let-7d-5p*) em LMS-SEE. Há uma grande evidência de que a perda de expressão de *let-7* está relacionada com o desenvolvimento de cânceres mais agressivos e pouco diferenciados (Su *et al.*, 2012).

Li e colaboradores (2014), avaliaram a significância da hipoexpressão de miRNAs na tumorigênese de câncer gástrico e constataram que o grupo com diminuição da expressão do *miR-124-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-155-5p* e *miR-335-5p* apresentou extensa metástase linfonodal, invasão venosa e pobre diferenciação em comparação com grupos onde houve hiperexpressão. Por

outro lado, a hipoeexpressão do *miR-335-5p* foi associada ao grau II de estadiamento nos CS.

Dois miRNAs (*miR-23b-3p* e *miR-27b-3p*) que foram associados com o estágio II em SEE e LMS-SEE respectivamente, fazem parte de um mesmo cluster *miR-23b/27b/24-1*, cuja hipoeexpressão já foi observada em câncer de próstata (Goto et al., 2014).

miR-218-5p, também associado ao estágio II em CS, possui efeito anti-tumoral pela supressão de *EGFR* (Zhu et al., 2016). Dessa forma, a perda da expressão desse miRNA pode ser um fator de pior prognóstico nos sarcomas e carcinossarcomas uterinos.

A hiperexpressão do *miR-7-5p* foi associada com os graus de estadiamento I e IV em LMS-SEE e SEE, nesta ordem. Esse miRNA pode apresentar funções oncogênicas como observado nos carcinomas renal e oral. Porém, na maior parte dos estudos, apresenta funções de supressão tumoral como no câncer de ovário, onde inibe a metástase e reverte a transição epitélio-mesenquimal por meio da inativação de *AKT/ERK1/2* pela regulação de *EGFR* (Zhou et al., 2014; Zhao et al., 2015). Outro miRNA associado a essa variável, no grau II de estadiamento, foi o *miR-1-3p*. O perfil de hipoeexpressão dessa molécula pode indicar piores prognósticos para pacientes com sarcomas uterinos, uma vez que possui papel relacionado à supressão tumoral, além de participar da diferenciação de células musculares a partir de células precursoras (Rhao et al., 2010).

Maior nível de expressão do *miR-144-3p* foi associado ao grau II de estadiamento nos LMS-SEE. Esse miRNA apresenta-se hipoeexpresso em linhagens de células de osteossarcoma e pode controlar a proliferação e invasão de células dessa neoplasia pela regulação do seu gene alvo *TAGLN* (Zhao et al., 2014).

A escolha do melhor tratamento para os casos de sarcomas e carcinossarcomas uterinos exige criteriosa avaliação histológica dos espécimes (Hensley, 2000). De forma insólita, a expressão de múltiplos miRNAs apresentaram associação com o grau histológico, sendo citados posteriormente aqueles com dados relevantes presentes na literatura.

Walter e colaboradores (2013), avaliaram a importância dos miRNAs no câncer de próstata. Trinta e sete amostras foram microdissecadas manualmente para obtenção de populações de células tumorais, epitélio normal e estroma adjacente. Os miRNAs foram extraídos para a realização da reação de PCR e posteriormente foi realizada a análise das moléculas diferencialmente expressas. Foram feitas comparações entre o tumor e o epitélio normal e o estroma adjacente. Uma assinatura diferenciada foi encontrada entre tumores de alto e baixo grau. *miR-335*, *miR-184*, *miR-222*, *miR-148*, *miR-27* e *miR-125* foram uns dos miRNAs desregulados associados a tumores de alto grau nesse estudo. Apesar de serem tumores molecularmente distintos, esses miRNAs também foram associadas ao grau histológico nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos.

Particularmente, cada membro da família *let-7*, possui diferentes funções dependendo do tipo celular em que se localiza. A hiperexpressão do *let-7b* e *let-7i* mostraram-se associadas com alto grau de transformação em linfomas, indicando, dessa forma, que o aumento de *let-7* pode ser utilizado como marcador de risco de transformação de alto grau (Boyerinas et al., 2010). Vários membros desse grupo de miRNAs foram relacionados ao alto grau histológico nos LMS, dentre eles o *let-7b* citado anteriormente.

O perfil de hiperexpressão do *miR-25-3p* foi associado ao alto grau histológico nas paciente com LMS. Kumar e colaboradores (2011), verificaram que essa molécula juntamente com o *miR-30d* possuem o *TP53* como alvo, mostrando dessa forma capacidade de afetar processos como apoptose, parada do ciclo celular e senescência no câncer de cólon.

Nas análises realizadas, observamos um grande número de miRNAs hiperexpressos (25) e hipoexpressos (17) entre todos os tipos de sarcomas e carcinosarcomas uterinos. Os miRNAs com maior diferença de expressão foram: *hsa-let-7a-5p*, *miR-29a-3p* e *miR-143-3p* (hipoexpressos) e *miR-96-5p*, *miR-206* e *miR-200c-3p* (hiperexpressos) como foi observado pela variação do *fold regulation*.

Apesar da escassa literatura sobre essas moléculas nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos, alguns desses miRNAs já foram estudados nesses tumores, como é o caso do *let-7a-5p* e *miR-143*, que de forma semelhante,

apresentaram perfil de hipoexpressão em amostras de CS e AS no estudo de Kowalewsca e colaboradores (2013).

Já em estudo recente de Ravid e colaboradores (2016), que como citado anteriormente, tinha como propósito estabelecer uma assinatura molecular para os LMS e SEE, foram observados *miR-21*, *miR-23b* e *miR-148* como moléculas capazes de distinguir o LMS primário de SEE. Nossas análises, mostraram que esses três miRNAs não exibiam hiperexpressão nos SEE em comparação com LMS como foi mencionado no estudo. Essa discrepância de resultados pode ter ocorrido devido à variação nos métodos de conservação das amostras, pelo tamanho amostral utilizado ou até mesmo por diferenças populacionais (geográfica).

Ratner e colaboradores (2010) mostraram que o carcinossarcoma uterino possui uma assinatura de miRNAs que pode facilmente distinguir-se de neoplasia epitelial endometrial. A hiperexpressão do *miR-20b* e *miR-301* distinguiram esses tumores de tumores epiteliais. De forma análoga, o *miR-20b* apresentou-se hiperexpresso nos CS em comparação aos outros tipos de sarcomas uterinos e o *miR-301* apresentou-se com maiores níveis de expressão nos CS e SEE. Esses aspectos são importantes, uma vez que pode ajudar a caracterizar biologicamente esses tumores, e dessa forma, contribuir com os parâmetros terapêuticos adotados.

Diferentes níveis de expressão de *miR-96-5p*, *miR-205-5p*, *miR-181a-5p*, *miR-135b-5p*, *miR-183-5p* e *miR-193b-3p* encontrados entre os sarcomas e carcinossarcoma uterinos podem ser atribuídos às características moleculares específicas a cada tipo de neoplasia. Estudos relatam que alterações nos níveis de expressão de miRNAs, seja por desregulação na via da biogênese, metilação ou alterações transcricionais, podem ser consequências de peculiaridades do microambiente tumoral em que se encontram, como hipóxia, fatores imunológicos e alterações de pH (Suzuki, *et al.*, 2015). Dessa forma, era esperado que essas alterações fossem observadas. De modo geral, há uma oscilação na expressão dos miRNAs mencionados entre os sarcomas e carcinossarcomas uterinos, no entanto, não foram observadas mudanças de perfis, ou seja, independente do tipo histológico o *miR-96-5p*, *miR-205-5p*, *miR-*

miR-181a-5p, *miR-135b-5p* e *miR-183-5p* apresentaram-se mais expressos e o *miR-193b-3p* apresentou-se menos expresso.

Além de fatores como idade da paciente, estadiamento clínico, tamanho tumoral, presença ou ausência de necrose e índice mitótico (D'Angelo e Prat, 2010), a expressão diferencial de miRNAs pode ser determinante de prognóstico para pacientes com sarcomas e carcinossarcomas uterinos, dado a significância da associação da expressão dos miRNAs com a SCE e SLD das pacientes.

Nos LMS a expressão do *miR-196a-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-125a-5p* e *miR-10a-5p* apresentaram associações com a SCE das pacientes. A hiperexpressão do *miR-196-5p* foi associada com um extenso grau de metástase linfonodal e o estadiamento clínico em câncer gástrico (Li *et al.*, 2015). Esse mesmo perfil aparece associado à menores taxas de SCE. As análises de predição de alvos, indicam um possível papel desse miRNA como biomarcador oncogênico. O *miR-34c-5p*, segundo a literatura, possui funções relacionadas com a supressão tumoral, sendo observada em câncer de mama, glioblastoma entre outros (Wu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Porém, a SCE das pacientes com hiperexpressão dessa molécula apresentou-se significativamente menor, mostrando dessa forma que mecanismos alternativos associados a carcinogênese podem estar ocorrendo, visto que alvos moleculares podem ser indiretamente controlados e levar à efeitos diferenciados diante da complexidade genética de cada tumor.

A hipoexpressão do *miR-125a-5p* foi associada com a menor SCE nos LMS. A desregulação dessa molécula foi associada com variáveis como tabagismo, presença de recorrência e alto grau histológico, destacando-se como um marcador significativo de prognóstico. Além dos resultados apresentados, a literatura mostra que a hipoexpressão desse miRNA foi associada com o potencial de malignidade em questão ao tamanho tumoral, invasão e metástase em câncer de gástrico (Nishida *et al.*, 2011).

Com base no *cutoff* estabelecido (+4 ou -4), as análises de sobrevivência de Kaplan-Meier mostraram que a hipoexpressão do *miR-10a-5p* está associada a uma menor SCE nos LMS. Essa molécula foi revelada como um preditor de recorrência em tumor de mama nas pacientes pós-menopausadas

tratadas anteriormente com tamoxifeno, tendo a hiperexpressão relacionada com a ausência de recidivas por um período de tempo maior (Hoppe *et al.*, 2013). A junção desses dados, revela que a hipoexpressão desse miRNA compreende desfavoráveis prognósticos para pacientes acometidas por LMS e tumores de mama,

Aparentemente, a hiperexpressão do *miR-135b-5p* apresenta-se como um fator protetor para as pacientes com LMS, uma vez que esteve associada com maior SLD. Um dado descrito que corrobora com essa afirmação é o fato da perda de expressão desse miRNA estar associada ao tabagismo nas pacientes com CS. Esses dados contrastam com vários estudos que demonstram que a hiperexpressão desse miRNA está associada a progressão do câncer. Pode-se afirmar diante dos resultados observados que múltiplas funções podem ser executadas a partir de uma mesma molécula, dependendo da neoplasia avaliada.

Nos CS a expressão de *miR-184*, *let-7b-5p* e *miR-124-3p* demonstraram associações com SCE das pacientes. A associação entre o aumento de expressão do *miR-184* e menor SCE foi verificada. De forma semelhante, um estudo de Wong e colaboradores (2008) que avaliou os padrões de expressão de miRNAs em carcinoma espinocelular da língua, constatou que níveis de expressão mais robustos dessa molécula promove oncogenicidade aos processos anti-apotóticos e proliferativos, portanto, pior prognóstico para os pacientes acometidos. A perda de expressão dos membros da família *let-7* já foi descrita como um fator de pior prognóstico para diversas neoplasias, inclusive para LMS (Shi *et al.*, 2009). Pacientes com hipoexpressão do *let-7b-5p*, apresentaram menor SCE em comparação com aquelas com valores de *fold regulation* menores que -4. Esse miRNA exerce sua atividade de supressão tumoral e antiproliferativa reprimindo múltiplos oncogenes e regulando vias relacionadas ao ciclo celular, diferenciação e apoptose. O *let-7* apresenta-se como um biomarcador em uma ampla variedade de cânceres, além de representar um potencial alvo terapêutico. No entanto, estratégias eficientes necessitam ser desenvolvidas (Barh *et al.*, 2010).

A hiperexpressão do *miR-124-3p* mostrou-se associada à maiores taxas de SCE em CS. A desregulação da expressão desse miRNA tem sido descrita

em câncer de mama, glioma, linfoma e câncer de pulmão de pequenas células. A patogenicidade exercida por essa molécula é mediada pela interação com múltiplos genes-chave, incluindo *STAT3*, *ROCK1*, *NOTCH1*, *CDK4* e entre outros (Lin *et al.*, 2016).

Pacientes com CS que exibiram maiores níveis de expressão do *miR-205-5p*, tiveram uma menor SLD. Resultados semelhantes foram observados em câncer endometrial, onde as análises demonstraram que a hiperexpressão desse miRNA está associado à uma baixa sobrevida global. Além disso, foi observado envolvimento do *miR-205* no processo tumorigênico pela modulação da via de sinalização do *PTEN* (Xin *et al.*, 2015).

Quanto aos SEE-AG, a expressão do *let-7b-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *miR-372-3p*, *let-7f-5p* e *miR-23b-3p* apresentaram associação com a SCE. Como já citado anteriormente, a hipoexpressão dos membros da família *let-7* é um fator de pior prognóstico para pacientes oncológicos. Porém nesse caso, a hiperexpressão do *let-7b-5p* também mostrou-se um fator negativo. Um estudo de Wu e colaboradores (2015) apontou através da análise de modelos de camundongos que tanto a hipoexpressão quanto a hiperexpressão desse miRNA resulta em proteção comprometida contra o câncer ou até mesmo em danos teciduais. Especula-se que a dose total de *let-7* é evolutivamente determinada através da regulação dos níveis de expressão de cada membro individualmente, sendo mantida a um nível que pode suprimir o desenvolvimento de cânceres. Claramente os níveis de *let-7* não são estáticos durante a vida, uma vez que podem sofrer alterações por influência ambiental. Quando essa molécula sofre alterações por meios genéticos há comprometimento da função supressora de tumor ou de regeneração tecidual. Esse estudo ressalta que níveis balanceados desse miRNA medeia fenótipos desejáveis.

A análise de sobrevida mostrou que a hiperexpressão do *miR-138-5p* foi associada com maior SCE em SEE-AG. Vários estudos mostram essa molécula como um importante supressor tumoral (Liu *et al.*, 2016). Zhao e colaboradores (2016) identificaram que a perda de expressão desse miRNA em câncer colorectal, implica em estádios clínicos avançados, metástases linfonodais e baixa sobrevida global.

Altos níveis de expressão do *miR-373-3p* e do *miR-372-3p*, apresentaram relação com menor SCE em SEE-AG. O *miR-373-3p* pode atuar como um oncogene ou supressor de tumor dependendo das condições que em se encontra. Seu papel é implicado na regulação da proliferação celular, apoptose, migração, invasão, senescência, além de reparo do DNA após estresse hipóxico (Wei *et al.*, 2015). Resultados similares foram observados no carcinoma hepatocelular quanto a expressão do *miR-372-3p*. Nas pacientes em que maiores níveis de expressão era constatado, menor SLD e sobrevida global eram observadas, destacando dessa forma, esse miRNA como um preditor independente de mau prognóstico (Gu *et al.*, 2013).

A hipoexpressão do *miR-23b-3p* foi relacionada a uma menor SCE em SEE-AG. A desregulação do *miR-23b-3p* têm sido relatada em muitos tipos de cânceres. Esse miRNA é hipoexpresso no câncer de cólon, regulando *FZD7* ou *MAP3K1*, sendo mediador de várias etapas relacionadas à metastização *in vivo* (An *et al.*, 2015).

Os nossos resultados demonstraram que a hiperexpressão do *miR-9-5p* foi associada a maior SLD em SEE-AG. Lu e colaboradores (2014) demonstraram que baixos níveis plasmáticos dessa molécula correlacionaram-se com invasão linfática e estágio tumoral avançado em carcinoma de nasofaringe. Além disso, os autores revelaram que o *miR-9* poderia distinguir neoplasias loco-regionais de metástases com alta sensibilidade e especificidade.

Além das análises de sobrevida realizadas de acordo com tipo tumoral, uma análise posterior mostrou que a expressão do *miR-138-5p*, *miR-146b-5p* e *miR-218-5p* foram correlacionadas à SLD das pacientes que realizaram tratamento adjuvante, sendo a correlação do *miR-138-5p* ($r=0,534$, $p<0,001$) a mais forte encontrada. Esses resultados demonstram possíveis impactos do tratamento sobre a SLD das pacientes.

Em conjunto, nossos resultados abrem uma nova perspectiva para o estudo dos sarcomas e carcinosarcomas. Embora os achados precisem ser validados em número maior de amostras e por diferentes métodos, acreditamos que a caracterização dos miRNAs nesses tumores tenha papel

promissor para fins diagnóstico, prognóstico e até para o tratamento dessas neoplasias.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Por meio da avaliação da expressão de miRNAs, por PCR em tempo real, observou-se uma maior expressão de 18 miRNAs nos LMS, 22 nos CS, 18 nos SEE, 15 nos AS e uma menor expressão de 6 miRNAs nos LMS, 9 nos CS, 9 nos SEE e 15 nos AS.
- Entre os miRNAs diferencialmente expressos nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos, o *miR-96-5p*, *miR-205-5p*, *miR-181a-5p*, *miR-135b-5p*, *miR-183-5p* e *miR-193b-3p* apresentaram significativas variações nos níveis de expressão de acordo com o tipo histológico (LMS/CS/SEE/AS).
- Com relação aos dados clínicos, houve significância estatística na associação da expressão dos miRNAs com a idade das pacientes (>50 anos) (*miR-220c-3p*, *miR-29a-3p*, *miR-21-5p* e *miR-200c-3p*), queixa de sangramento anormal (*miR-142-5p*, *miR-148b-3p*, *miR-214-3p*), menopausa (*miR-148a-3p*, *miR-7-5p*, *miR-32-5p*, *miR-30c-5p*, *miR-100-5p*, *let-7i-5p*, *miR-335-5p* e *miR-193b-3p*), uso de contraceptivo (*miR-132-3p*, *miR-34c-5p*, *miR-148a-3p*, *miR-15b-5p* e *miR-34a-5p*), realização de TRH (*miR-125a-5p*, *miR-222-3p*, *miR-205-5p*, *miR-193b-3p* e *miR-155-5p*), hábito tabagista (*miR-125a-5p*, *miR-30c-5p*, *miR-135b-5p*, *let-7i-5p*, *miR-27b-3p*, *miR-29a-3p*, *hsa-let-7f-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-25-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-23b-3p*, *miR-335-5p*, *miR-21-5p*, *miR-143-3* e *let-7d-5p*), óbito (*miR-96-5p*, *miR-132-3p*, *miR-183-5p*, *miR-124-3p*, *miR-122-5p*, *miR-29b-3p*, *miR-206*, *miR-142-5p*, *miR-373-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-301a-3p*, *miR-10a-5p*, *miR-210-3p* e *miR-144-3p*), presença de recorrência (*miR-148a-3p*, *miR-29b-3p*, *miR-29a-3p*, *miR-301a-3p*, *miR-144-3p*, *miR-335-5p*, *miR-378a-3p*, *miR-130a-3p*, *miR-183-5p*, *miR-134-5p*, *miR-7-5p*, *miR-128-3p*, *miR-18a-5p*, *miR-203a-3p*, *miR-32-5p*, *miR-125a-5p*, *miR-206* e *miR-144-3p*), recidiva (*miR-301a-3p*, *miR-127-5p*, *miR-335-5p* e *miR-*

144-3p), metástase (miR-140-5p, *miR-193b-3p*, *let-7i-5p*, *miR-27b-3p*, *miR-143-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-210-3p* e *miR-200c-3p*), estadiamento grau I/II e IV (*miR-335-5p*, *miR-218-5p*, *miR-23b-3p*, *miR-1-3p*, *let-7i-5p*, *let-7d-5p*, *27b-3p* e *miR-144-3p*), alto grau histológico (*miR-125a-5p*, *miR-222-3p*, *miR-148b-3p*, *miR-92a-3p*, *miR-205-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-30c-5p*, *hsa-let-7f-5p*, *miR-218-5p*, *miR-100-5p*, *miR-155-5p*, *miR-1-3p*, *miR-191-5p*, *hsa-let-7d-5p*, *miR-15b-5p*, *miR-98-5p*, *miR-25-3p*, *miR-128-3p*, *miR-143-3p*, *miR-19a-3p*, *miR-23b-3p*, *miR-16-5p*, *miR-17-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-27b-3p*, *hsa-let-7a-5p*, *hsa-let-7b-5p*, *hsa-let-7g-5p*, *hsa-let-7c-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *miR-184*, *miR-335-5p* e *miR-301a-3p*) e sobrevida (*miR-196a-5p*, *miR-34c-5p*, *miR-125a-5p*, *miR-10a-5p*, *miR-135b-5p*, *miR-184*, *let-7b-5p*, *miR-124-3p* e *miR-205-5p*, *miR-138-5p*, *miR-373-3p*, *miR-372-3p*, *let-7f-5p*, *miR-23b-3p* e *miR-9-5p*).

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

À

Dra. Kátia Cândido Carvalho

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **28.10.2014** tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **143/11**, intitulado: **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO EGF, VEGF, HER2 E DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXO 3 EM SARCOMAS UTERINOS”**, contempla o **sub-projeto** intitulado: **“Avaliação da expressão de miRNAs envolvidos no desenvolvimento de tumores em amostras de sarcomas uterinos”** que será **Dissertação de Mestrado** da(o) aluna(o) **Laura Gonzales**, tendo como **orientador(a) Dra. Kátia Cândido Carvalho**.

CEP-FMUSP, 28 de Outubro de 2014.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8 REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology*. 2009;54(3):355-64.

Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(5):445-57.

Ali RH, Rouzbahman M. Endometrial stromal tumours revisited: an update based on the 2014 WHO classification. *J Clin Pathol*. 2015;68(5):325-32.

Almeida TG, Cunha IW, Maciel GA, Baracat EC, Carvalho KC. Clinical and molecular features of uterine sarcomas. *Med Expr*. 2014;1(6):291-297.

Amant F, Mirza MR, Creutzberg CL. Cancer of the corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;119 Suppl 2:S110-7.

Amant F, Lorusso D, Mustea A, Duffaud F, Pautier P. Management Strategies in Advanced Uterine Leiomyosarcoma: Focus on Trabectedin. *Sarcoma*. 2015;2015:704124.

Amant F, Steenkiste E, Schurmans K, Verbist L, Abeler VM, Tulunay G, et al. Immunohistochemical expression of CD10 antigen in uterine adenosarcoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14(6):1118-21.

American Cancer Society [Internet]. Cancer Facts and Figures 2016. 2016 [21 mar 2016]. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>

An Y, Zhang Z, Shang Y, Jiang X, Dong J, Yu P, Nie Y, Zhao Q. miR-23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1766.000

Artioli G, Wabersich J, Ludwig K, Gardiman MP, Borgato L, Garbin F. Rare uterine cancer: carcinosarcomas. Review from histology to treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;94(1):98-104.

Bajan S, Hutvagner G. Regulation of miRNA Processing and miRNA Mediated Gene Repression in Cancer. *Microna (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2014;3(1):10-17.

Banik T, Halder D, Gupta N, Dey P. Malignant mixed Mullerian tumor of the uterus: diagnosis of a case by fine-needle aspiration cytology and review of literature. *Diagnostic Cytopathology*. 2011;40(7):565-657.

Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Current Oncology*. 2010;17(1):70-80.

Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J*. 2015;282(2):224-58.

Bernard B, Clarke BA, Malowany JI, McAlpine J, Lee CH, Atenafu EG, Ferguson S, Mackay H. Uterine adenosarcomas: a dual-institution update on staging, prognosis and survival. *Gynecol Oncol*. 2013;131(3):634-9.

Bhargava R, Shia J, Hummer AJ, Thaler HT, Tornos C, Soslow RA. Distinction of endometrial stromal sarcomas from 'hemangiopericytomatous' tumors using a panel of immunohistochemical stains. *Mod Pathol*. 2005;18(1):40-7.

Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol*. 2014;51(4):759-774.

Bhattacharya S, Chalk AM, Ng AJ, Martin TJ, Zannettino AC, Purton LE, Lu J, Baker EK, Walkley CR. Increased miR-155-5p and reduced miR-148a-3p contribute to the suppression of osteosarcoma cell death. *Oncogene*. 2016 Apr 4.

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(1):F19-36.

Bronevetsky Y, Ansel KM. Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunological reviews*. 2013;253(1):304-316.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15524–15529.

Cantrell LA, Blank SV, Duska LR. Uterine carcinosarcoma: A review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2015;137(3):581-8.

Cha YH, Kim NH, Park C, Lee I, Kim HS, Yook JI. MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell Cycle*. 2012;11(7):1273-81.

Chan JK, Kavar NM, Shin JY, *et al*. Endometrial stromal sarcoma: a population-based analysis. *Brit J of Cancer*. 2008;99(8):1210-1215.

Chan SH, Wang LH. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J Biomed Sci*. 2015; 23;22:9.

Chapnik E, Rivkin N, Mildner A, Beck G, Pasvolsky R, Metzl-Raz E, Birger Y, Amir G, Tirosh I, Porat Z, Israel LL, Lellouche E, Michaeli S, Lellouche JP, Izraeli S, Jung S, Hornstein E. miR-142 orchestrates a network of actin cytoskeleton regulators during megakaryopoiesis. *Elife*. 2014;3:e01964.

- Chiang S, Oliva E. Recent developments in uterine mesenchymal neoplasms. *Histopathology*. 2013;62(1):124-37.
- Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007;61(5Pt2):24R-29R.
- Conklin CMJ, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification. *Adv Anat Pathol*. 2014;21(6):383-93.
- Cowland JB, Hother C, Grønbæk K. MicroRNAs and cancer. *APMIS*. 2007;115:1090-1106.
- Croce S, Hostein I, Ribeiro A, Garbay D, Velasco V, Stoeckle E, Guyon F, Floquet A, Neuville A, Coindre JM, MacGrogan G, Chibon F. YWHAE rearrangements identified by FISH and RT-PCR in endometrial stromal sarcomas: genetic and pathological correlations. *Mod Pathol*. 2013;26(10):1390-400.
- Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA. Suppression of LPS-induced Interferon- γ and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood*. 2008;112(12):4591-4597.
- D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: A review. *Gynecol Oncol*. 2010;116(1):131-9.
- Davidson B, Abeler VM, Førsund M, et al. Gene expression signatures of primary and metastatic uterine leiomyosarcoma. *Human Pathology*. 2014;45(4):691-700.
- Davis-Dusenbery BN, Hata A. MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes Cancer*. 2010;1(11):1100-14.
- Denschlag D, Thiel FC, Ackermann S, et al. Sarcoma of the Uterus. Guideline of the DGGG (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/074, August 2015). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2015;75(10):1028-1042.
- Dizon DS, Birrer MJ. Advances in the diagnosis and treatment of uterine sarcomas. *Discov Med*. 2014;17(96):339-45.
- Dong Y, Si J-W, Li W-T, et al. miR-200a/miR-141 and miR-205 upregulation might be associated with hormone receptor status and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J of Clin and Exp Pat*. 2015;8(3):2864-2875.
- Duan, Z., Choy, E., Harmon, D., Liu, X., Susa, M., Mankin, H., Hornicek, F. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. *Mol. Cancer Ther*. 2011;10(8)1337–1345.
- Dupont NC, Disaia PJ. Recurrent endometrial stromal sarcoma: treatment with a progestin and gonadotropin releasing hormone agonist. *Sarcoma*. 2010;2010:353679.

- Ergün S, Ulasli M, Igci YZ, Igci M, Kirkbes S, Borazan E, Balik A, Yumrutaş Ö, Camci C, Cakmak EA, Arslan A, Oztuzcu S. The association of the expression of miR-122-5p and its target ADAM10 with human breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2015;42(2):497-505.
- Faam B, Ghaffari MA, Ghadiri A, Azizi F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. *Biomed Rep.* 2015;3(1):3-8.
- Felix AS, Cook LS, Gaudet MM, *et al.* The etiology of uterine sarcomas: a pooled analysis of the epidemiology of endometrial cancer consortium. *British Journal of Cancer.* 2013;108(3):727-734.
- Feng R, Chen X, Yu Y, Su L, Yu B, Li J, *et al.* miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 2010;298:50–63.
- Fricke A, Ullrich PV, Heinz J, *et al.* Identification of a blood-borne miRNA signature of synovial sarcoma. *Molecular Cancer.* 2015;14:151.
- Friedlander ML, Covens A, Glasspool RM, Hilpert F, Kristensen G, Kwon S, Selle F, Small W, Witteveen E, Russell P. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for mullerian adenosarcoma of the female genital tract. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(9 Suppl 3):S78-82.
- Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:592868.
- Gadducci A, Cosio S, Romanini A, Genazzani AR. The management of patients with uterine sarcoma: A debated clinical challenge. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;65(2):129-42.
- Gartel AL, Kandel ES. miRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2008;18:103-110.
- Ghaemmaghami F, Karimi-Zarchi M, Gilani MM, Mousavi A, Behtash N, Ghasemi M. Uterine sarcoma: clinicopathological characteristics, treatment and outcome in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008;9(3):421-6.
- Gockley AA, Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Uterine leiomyosarcoma: a review article. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(9):1538-42.
- Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, *et al.* The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget.* 2014;5(17):7748-7759.
- Gu H, Guo X, Zou L, Zhu H, Zhang J. Upregulation of microRNA-372 associates with tumor progression and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2013;375(1-2):23-30.

- Guijarro MV, Dahiya S, Danielson LS, et al. Dual Pten/Tp53 Suppression Promotes Sarcoma Progression by Activating Notch Signaling. *The American Journal of Pathology*. 2013;182(6):2015-2027.
- Guo R, Abdelmohsen K, Morin PJ, Gorospe M. Novel MicroRNA Reporter Uncovers Repression of Let-7 by GSK-3 β . *PLoS One*. 2013;8(6):e66330.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
- Harry VN, Narayansingh GV, Parkin DE. Uterine leiomyosarcomas: a review of the diagnostic and therapeutic pitfalls. *The Obstetrician & Gynaecologist* 2007;9:88–94.
- Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Sci Signal*. 2015;17;8(368):re3.
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460-9.
- He H, Xu F, Huang W, Luo SY, Lin YT, Zhang GH, Du Q, Duan RH. miR-125a-5p expression is associated with the age of breast cancer patients. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):17927-33.
- Hensley ML. Uterine sarcomas: histology and its implications on therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2012;356-61.
- Hensley ML. Uterine/female genital sarcomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2000;1(2):161-8.
- Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, Fritz P, Lo WY, Schroth W, Brauch H. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *Eur J Cancer*. 2013;49(17):3598-608.
- Hsu CY, Hsieh TH, Tsai CF, Chen HS, Liang PI, Hsu YL, Tsai EM. Synthetic Steroid Hormones Regulated Cell Proliferation Through MicroRNA-34a-5p in Human Ovarian Endometrioma. *Biol Reprod*. 2016;94(3):60.
- Huang X, Park H, Greene J, Pao J, Mulvey E, Zhou SX, Albert CM, Moy F, Sachdev D, Yee D, Rader C, Hamby CV, Loeb DM, Cairo MS, Zhou X. IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133152.
- Imaoka H, Toiyama Y, Okigami M, Yasuda H, Saigusa S, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2016;19(3):744-53.
- Jabeen S, Anwar S, Fatima N. Endometrial stromal sarcoma: a rare entity. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015;25(3):216-7.

Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*. 2012; 6(6):590-610.

Jetley S, Rana S, Jairajpuri ZS. Low grade endometrial stromal sarcoma in a premenopausal woman. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2014;5(1):214-217.

Jiang R, Li Y. Regulation of miRNA pathway and roles of micrornas in tumorigenesis and metastasis. *Human Genetics & Embryology*. 2013; 27;2012. Jong RA, Nijman HW, Wijbrandi TF, Reyners AK, Boezen HM, Hollema H. Molecular markers and clinical behavior of uterine carcinosarcomas: focus on the epithelial tumor component. *Mod Pathol*. 2011;24(10):1368-79.

Jung CK, Jung JH, Lee A, Lee YS, Choi YJ, Yoon SK, Lee KY. Diagnostic use of nuclear beta-catenin expression for the assessment of endometrial stromal tumors. *Mod Pathol*. 2008;21(6):756-63.

Kala R, Peek GW, Hardy TM, Tollefsbol TO. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *J Clin Bioinforma*. 2013;16(1):6.

Kanthan R, Senger J-L. Uterine Carcinosarcomas (Malignant Mixed Müllerian Tumours): A Review with Special Emphasis on the Controversies in Management. *Obste and Gynec Inter*. 2011;2011:470795.

Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer*. 2008;112(4):820-30.

Kara M, Yumrutas O, Ozcan O, Celik OI, Bozgeyik E, Bozgeyik I, Tasdemir S. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma. *Gene*. 2015;567(1):81-6.

Klinge CM. Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Current Genomics*. 2009;10(3):169-183.

Knöbl P. Thrombocytopenia in the intensive care unit : Diagnosis, differential diagnosis, and treatment. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2016;111(5):425-33.

Kobayashi H, Uekuri C, Akasaka J, Ito F, Shigemitsu A, Koike N, Shigetomi H. The biology of uterine sarcomas: A review and update. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):599–609.

Kong X, Xu X, Yan Y, *et al*. Estrogen Regulates the Tumour Suppressor MiRNA-30c and Its Target Gene, MTA-1, in Endometrial Cancer. Campbell M, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90810.

Kowalewska M, Bakula-Zalewska E, Chechlinska M, Goryca K, Nasierowska-Guttmejer A, Danska-Bidzinska A, Bidzinski M. microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. *Tumour Biol*. 2013;34(4):2153-60.

- Kumar M, Lu Z, Takwi AA, Chen W, Callander NS, Ramos KS, Young KH, Li Y. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*. 2011;30(7):843-53.
- Kumar R, Jin X, Zhen Y, Hu P. MicroRNA Regulates Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Metastasis. *J Cancer Res Therap Oncol*. 2014;2:1-6.
- Ladwig N, Garg K. Endometrial Stromal Neoplasms: Updates in Classification and Common Diagnostic Dilemmas. *AJSP: Reviews and Reports*. 2016;21(2):73–81.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
- Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199-227.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
- Li H, Xie S, Liu M, Chen Z, Liu X, Wang L, Li D, Zhou Y. The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2014;45(1):197-208.
- Li HL, Xie SP, Yang YL, Cheng YX, Zhang Y, Wang J, Wang Y, Liu DL, Chen ZF, Zhou YN, Wu HY. Clinical significance of upregulation of mir-196a-5p in gastric cancer and enriched KEGG pathway analysis of target genes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(5):1781-7.
- Li Y, Fang Y, Liu Y, Yang X. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *J Ovarian Res*. 2015;8:51.
- Lim HJ, Yang JL. Regulatory roles and therapeutic potential of microRNA in sarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:118-30.
- Lin J, Xu K, Wei J, Heimberger AB, Roth JA, Ji L. MicroRNA-124 suppresses tumor cell proliferation and invasion by targeting CD164 signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Gene Ther*. 2016;2(1).
- Liu Y, Zhang W, Liu K, Liu S, Ji B, Wang Y. miR-138 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting SOX9 in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):2159-68.
- Livi L, Paiar F, Shah N, Blake P, Villanucci A, Amunni G, *et al*. Uterine sarcoma: Twenty-seven years of experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(5):1366-73.
- Lu J, Xu X, Liu X, Peng Y, Zhang B, Wang L, Luo H, Peng X, Li G, Tian W, He M, Li X. Predictive value of miR-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Br J Cancer*. 2014;110(2):392-8.

Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008;27(31):4373-9.

Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, Calura E, Garavaglia D, Fuso Nerini I, Mangioni C, Cattoretti G, Clivio L, Beltrame L, Katsaros D, Scarampi L, Menato G, Perego P, Chiorino G, Buda A, Romualdi C, D'Incalci M. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol*. 2011;12(3):273-85.

Masuda M, Miki Y, Hata S, Takagi K, Sakurai M, Ono K, Suzuki K, Yang Y, Abe E, Hirakawa H, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. An induction of microRNA, miR-7 through estrogen treatment in breast carcinoma. *J Transl Med*. 2012;10 Suppl 1:S2.

Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(8):1236-43.

McCluggage WG. Malignant biphasic uterine tumours: carcinosarcomas or metaplastic carcinomas? *J Clin Pathol*. 2002;55(5):321-5.

McCluggage WG. Uterine carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) are metaplastic carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12(6):687-90.

Melo CA, Melo SA. Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. In: Fabbri M. *Non-coding RNAs and Cancer*. New York: Springer; 2014. Chap 2, p 5-24.

Menczer J. Review of Recommended Treatment of Uterine Carcinosarcoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16(11):53.

miScript miRNA PCR Array. QIAGEN [Internet]. 2013–15. [03 abr 2016]. Available from: <https://www.qiagen.com/br/shop/pcr/primer-sets/miscript-mirna-pcr-arrays?catno=MIHS-102Z#productdetails>.

Mohit M, Saatian M, Sarmadi S. A Rare Case of Mullerian Adenosarcoma of Uterus in a 14-year-old Girl. *Gal Med J*. 2014;3(4):256-9.

Momi N, Kaur S, Rachgani S, Ganti AK, Batra SK. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. *Tren Mol Med*. 2014;20(1):10.1016

Naaman Y, Shveiky D, Ben-Shachar I, Shushan A, Gomez JM, Benshushan A. Uterine sarcoma: Prognostic Factors and treatment evaluation. *Israel J Med Sci*. 2011;13(2):76-9.

Nagai T, Takai Y, Akahori T, Ishida H, Hanaoka T, Uotani T, Sato S, Matsunaga S, Baba K, Seiki H. Novel uterine sarcoma preoperative diagnosis score predicts the need for surgery in patients presenting with a uterine mass. *Springerplus*. 2014;3:678.

Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2725-33.

Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH 3rd, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging* (Albany NY). 2013;5(10):725-40.

Norris HJ, Taylor HB. Mesenchymal tumors of the uterus. I. A clinical and pathological study of 53 endometrial stromal tumors. *Cancer*. 1966;19:755–766

Novetsky AP, Powell MA. Management of sarcomas of the uterus. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(5):546-52.

Oliva E, Carcangiu ML, Carinelli SG, Ip P, Loening T, Longacre TA, *et al*. Mesenchymal tumours. (Chapter 5: Tumours of the uterine corpus), In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. Lyon: IARC; 2014. p. 135–47

O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, McCluggage WG. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Histopathology*. 2007;50(7):851-8.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, *et al*. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408:86–89.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Uterine Sarcoma Treatment (PDQ®) [Internet]: HealthnProfessional Version. 2015 Jul 15. PDQ Cancer Information Summaries [05 abr 2016]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65888/>.

Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, Wu S, Han HD, Shah MY, Rodriguez-Aguayo C, Bottsford-Miller J, Liu Y, Kim SB, Unruh A, Gonzalez-Villasana V, Huang L, Zand B, Moreno-Smith M, Mangala LS, Taylor M, Dalton HJ, Sehgal V, Wen Y, Kang Y, Baggerly KA, Lee JS, Ram PT, Ravoori MK, Kundra V, Zhang X, Ali-Fehmi R, Gonzalez-Angulo AM, Massion PP, Calin GA, Lopez-Berestein G, Zhang W, Sood AK. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun*. 2013;4:2427.

Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):546-54.

Pinto A, Howitt B. Uterine Adenosarcoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(3):286-90.

Piscuoglio S, Burke KA, Ng CK, Papanastasiou AD, Geyer FC, Macedo GS, Martelotto LG, de Bruijn I, De Filippo MR, Schultheis AM, Ioris RA, Levine

DA, Soslow RA, Rubin BP, Reis-Filho JS, Weigelt B. Uterine adenosarcomas are mesenchymal neoplasms. *J Pathol*. 2016;238(3):381-8.

Piura B. Uterine sarcoma--a challenging entity. *Isr Med Assoc J*. 2011;13(2):104-5.

Prat J, Mbatani '. Uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;131 Suppl 2:S105-10.

Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104(3):177-8.

Price C, Chen J. MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives. *Genes & Diseases*. 2014;1(1):53–63.

Puliyath G, Nair MK. Endometrial stromal sarcoma: A review of the literature. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2012; 33(1):1–6.

Puliyath G, Nair VR, Singh S. Endometrial stromal sarcoma. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology : Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*. 2010;31(1):21-23.

Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, Shipley J, Lodish HF. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J*. 2010;24(9):3427-37.

Rapti SM, Kontos CK, Papadopoulos IN, Scorilas A. High miR-96 levels in colorectal adenocarcinoma predict poor prognosis, particularly in patients without distant metastasis at the time of initial diagnosis. *Tumour Biol*. 2016 Apr 4.

Ratner ES, Tuck D, Richter C, *et al*. MicroRNA Signatures Differentiate Uterine Cancer Tumor Subtypes. *Gynecologic oncology*. 2010;118(3):251-257.

Ravid Y, Formanski M, Smith Y, Reich R, Davidson B. Uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma have unique miRNA signatures. *Gynecol Oncol*. 2016;140(3):512-7.

Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*. 2015; 15:38:1-6.

Reed N. A review of treatment of uterine leiomyosarcomas. *Curr Oncol Rep*. 2013;15(6):581-7.

Reichardt P. The treatment of uterine sarcomas. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 10:x151-7.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, *et al*. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901–906.

- Romano G, Acunzo M, Garofalo M, Di Leva G, Cascione L, Zanca C, Bolon B, Condorelli G, Croce CM. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(41):16570-5.
- Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of câncer. *Cancer Biology & Therapy*. 2014;15(11):1444-55.
- Rothschild SI. MicroRNA therapies in cancer. *Mol Cell Ther*. 2014;2:7.
- Rusek AM, Abba M, Eljaszewicz A, Moniuszko M, Niklinski J, Allgayer H. MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Mol Cancer*. 2014;14:34.
- Russ R, Slack FJ. Cigarette-Smoke-Induced Dysregulation of MicroRNA Expression and Its Role in Lung Carcinogenesis. *Pulm Med*. 2012;2012:791234.
- Ryu H, Choi YS, Song IC, Yun HJ, Jo DY, Kim S, Lee HJ. Long-term treatment of residual or recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma with aromatase inhibitors: A report of two cases and a review of the literature. *Oncol Lett*. 2015;10(5):3310-3314.
- Sait HK, Anfinan NM, Sayed MEE, et al. Uterine sarcoma: Clinico-pathological characteristics and outcome. *Saudi Medical Journal*. 2014;35(10):1215-1222.
- Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L, Wang L. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):3068-79.
- Santos P, Cunha TM. Uterine sarcomas: clinical presentation and MRI features. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21(1):4-9.
- Sarver AE, Subramanian S. MicroRNAs in the pathobiology of sarcomas. *Lab Invest*. 2015;95(9):987-94.
- Schanen BC, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics*. 2011;97(1):1-6.
- Seddon BM, Davda R. Uterine sarcomas--recent progress and future challenges. *Eur J Radiol*. 2011;78(1):30-40.
- Shah JP, Bryant CS, Kumar S, Ali-Fehmi R, Malone JM Jr, Morris RT. Lymphadenectomy and ovarian preservation in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Obstet Gynecol*. 2008;112(5):1102-8.

Shi G, Perle MA, Mittal K, Chen H, Zou X, Narita M, Hernando E, Lee P, Wei JJ. Let-7 repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3898-905.

Singh R. Review literature on uterine carcinosarcoma. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(3):461-8.

Sinha A, Phukan JP, Sengupta S, Guha P. Mullerian adenosarcoma of uterus with sarcomatous overgrowth and heterologous component associated with stromal deposit in omentum: a case report and review of the literature. *Case Rep Med*. 2012;2012:820378.

Sivakumari S, Rajaraman R, Subbiah, S. Uterine Sarcoma: The Indian Scenario. *Indian J Surg Oncol*. 2010;6(3):232–236.

Sleijfer S, Ray-Coquard I, Papai Z, Le Cesne A, Scurr M, Schöffski P, Collin F, Pandite L, Marreaud S, De Brauwier A, van Glabbeke M, Verweij J, Blay JY. Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043). *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3126-32.

Smith-Vikos T, Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 1):7-17.

Stachowiak G, Zajac A, Nowak M, Stetkiewicz T, Wilczyński JR. Hemostatic disorders of the menopausal period: the role of microRNA. *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review*. 2015;14(2):144-148.

Su JL, Chen PS, Johansson G, Kuo ML. Function and regulation of let-7 family microRNAs. *Microna*. 2012;1(1):34-9.

Subramanian, S., Lui, W.O., Lee, C.H., Espinosa, I., Nielsen, T.O., Heinrich, M.C., van de Rijn, M. MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene*. 2008; 27(14),2015–2026.

Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*. 2013;6:6.

Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumormicroenvironment. *Oncogene*. 2015;34(24):3085-94.

Tao J, Zhi X, Zhang X, Fu M, Huang H, Fan Y, Guan W, Zou C. miR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;14;34:139.

Tinar S, Sehirali S, Inal MM, Yildirim Y, Celik E, Yiğit S. Adenosarcoma of the Uterus: A Case Report. *Med Gen Med*. 2004;6(1):51.

Toledo G, Oliva E. Smooth muscle tumors of the uterus: a practical approach. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:595–605

Tropé CG, Abeler VM, Kristensen GB. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus. A review. *Acta Oncol.* 2012;51(6):694-705.

Tuna M, Machado AS, Calin GA. Genetic and epigenetic alterations of microRNAs and implications for human cancers and other diseases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(3):193-214.

Vrzic-Petronijevic S, Likic-Ladjevic I, Petronijevic M, Argirovic R, Ladjevic N. Diagnosis and surgical therapy of uterine sarcoma. *Acta Chir Iugosl.* 2006;53(3):67-72.

Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer.* 2013;4(5):350-357.

Wang GP, Zhang SQ, Zhu P, Peng MY, Tan SQ, Yin H, Xu YJ, Chen Y, Chen FP. Screening and expression of CD34(+) cell-specific microRNA in acute myelogenous leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2012;33(7):541-5.

Wang, H., Garzon, R., Sun, H., Ladner, K.J., Singh, R., Dahlman, J., Guttridge, D.C. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008;14(5),369–381.

Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Küblbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, Wiemann S, Sahin Ö. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene.* 2013;32(9):1173-82.

Wei F, Cao C, Xu X, Wang J. Diverse functions of miR-373 in cancer. *J of Transl Med.* 2015;13:162.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228-34.

Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2588-92.

Wu L, Nguyen LH, Zhou K, de Soysa TY, Li L, Miller JB, Tian J, Locker J, Zhang S, Shinoda G, Seligson MT, Zeitels LR, Acharya A, Wang SC, Mendell JT, He X, Nishino J, Morrison SJ, Siegwart DJ, Daley GQ, Shyh-Chang N, Zhu H. Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *Elife.* 2015;4:e09431.

Wu S, Sun H, Zhang Q, Jiang Y, Fang T, Cui I, Yan G, Hu Y. MicroRNA-132 promotes estradiol synthesis in ovarian granulosa cells via translational repression of Nurr1. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:94.

Wu X-L, Cheng B, Li P-Y, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2. *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2013;19(43):7758-7765.

- Wu Z, Wu Y, Tian Y, et al. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. *Oncology Letters*. 2013;6(5):1447-1452.
- Xin W, Liu X, Ding J, Zhao J, Zhou Y, Wu Q, Hua K. Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN. *Am J Transl Res*. 2015;7(11):2433-41.
- Yan B, Guo Q, Fu F, et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:539-548.
- Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*. 2008;68(2):425-33.
- Yang S, Li Y, Gao J, Zhang T, Li S, Luo A, Chen H, Ding F, Wang X, Liu Z. MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. *Oncogene*. 2013;32(36):4294-303.
- Yeh YM, Chuang CM, Chao KC, Wang LH. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1 α . *Int J Cancer*. 2013;133:867-78.
- Yim GW, Nam EJ, Kim SW, Kim YT. FIGO Staging for Uterine Sarcomas: Can the Revised 2008 Staging System Predict Survival Outcome Better? *Yon Med J* 2014;55(3):563-569.
- Zelamanowicz A, Hildesheim A, Hermann ME, Sturgeon SR, Kurman RJ, Baret R, et al. Evidence for a common aetiology for endometrial carcinoma and malignant mixed Mullerian tumours. *Gynecol Oncol* 1998;69:253-7.
- Zhang J, Duy Le T, Liu L, He J, Li J. Identifying miRNA synergistic regulatory networks in heterogeneous human data via network motifs. *Mol Biosyst*. 2016;12(2):454-63.
- Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*, 2007;171:728-738.
- Zhao J, Tao Y, Zhou Y, Qin N, Chen C, Tian D, Xu L. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2015;15:103.
- Zhao J-J, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(13):2630-2639.
- Zhao L, Yu H, Yi S, Peng X, Su P, Xiao Z, Liu R, Tang A, Li X, Liu F, Shen S. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 May 27.

Zhao M, Huang J, Gui K, Xiong M, Cai G, Xu J, Wang K, Liu D, Zhang X, Yin W. The downregulation of miR-144 is associated with the growth and invasion of osteosarcoma cells through the regulation of TAGLN expression. *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1565-72.

Zhou J, Song T, Gong S, Zhong M, Su G. microRNA regulation of the expression of the estrogen receptor in endometrial cancer. *Mol Med Rep*. 2010;3(3):387-92.

Zhou X, Hu Y, Dai L, Wang Y, Zhou J, Wang W, *et al*. MicroRNA-7 inhibits tumor metastasis and reverses epithelial-mesenchymal transition through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting EGFR in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2014;9(5):e96718.

Zhu K, Ding H, Wang W, Liao Z, Fu Z, Hong Y, Zhou Y, Zhang CY, Chen X. Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 4.

9 APÊNDICE

9. APÊNDICE

APRESENTAÇÃO DE PÔSTERES

- miRNAs in uterine mesenchymal tumors and carcinosarcomas: A preliminary study.

Laura G. dos Anjos, Beatriz N. Schiavon, Natalia Garcia, Nilo Bozzini, Thais G. de Almeida, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado no XXI FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, em Vancouver, Canadá, 2015.

- Differential expression of *miR-206*, *miR-1-3p* and *miR-143-3p* in uterine leiomyosarcoma.

Beatriz N. Schiavon, **Laura G.dos Anjos**, Natalia Garcia, Edmund C.Baracat, Fernando Soares, Kátia C. Carvalho, Isabela da Cunha.

Apresentado no XXI FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, em Vancouver, Canadá, 2015.

- miRNAs em sarcomas e carcinossarcomas uterinos: uma perspectiva de novos alvos terapêuticos.

Laura G. dos Anjos, Gustavo A.R. Maciel, Natalia Garcia, Thais G. de Almeida, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado no XX Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, em São Paulo, 2015.

- *hsa-miR-214-3p*, *miR-378a-3p* and *miR-34a-5p* as biomarkers for uterine mesenchymal neoplasms.

Laura G.dos Anjos, Natalia Garcia, Nilo Bozzini, Glauco Baiocchi, Isabela da Cunha, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado na AACR Annual Meeting, em Luisiana, USA, 2016.

- O perfil de expressão de miRNAs como determinante de pior prognóstico em leiomiossarcomas e sarcomas do estroma endometrial.

Laura G. dos Anjos, Natalia Garcia, Glauco Baiocchi, Nilo Bozzini, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado no XXI Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, em São Paulo, 2016.

APRESENTAÇÕES ORAIS

- PRL and PRLR expression in uterine mesenchymal tumors depends on miRNAs regulation.

Laura G. dos Anjos, Natalia Garcia, Nilo Bozzini, Thais G. de Almeida, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado no 17º World Congress of Gynecological Endocrinology, em Florença, Itália, 2016.

- GLI transcription factors involvement in leiomyoma genesis.

Natalia Garcia, **Laura G. dos Anjos**, Nilo Bozzini, Gustavo Maciel, Edmund C. Baracat, Kátia C. Carvalho.

Apresentado no 17º World Congress of Gynecological Endocrinology, em Florença, Itália, 2016.