Natália Garcia

**Inibidores da via de sinalização do *Sonic hedgehog*: avaliação
de seus efeitos *in vitro* em leiomioma e leiomiossarcoma
uterinos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia, Natália

Inibidores da via de sinalização do Sonic
hedgehog : avaliação de seus efeitos in vitro em
leiomioma e leiomiossarcoma uterinos / Natália
Garcia. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Leiomiossarcoma 2.Leiomioma
3.Neoplasias uterinas 4.Proteínas hedgehog
5.Tratamento farmacológico

USP/FM/DBD-402/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À Deus, pela minha vida, saúde, proteção e sabedoria.
Aos meus pais, Vera Garcia e Jurandir Garcia e a
minha irmã Tatiana Garcia, pelo incentivo e esforços
realizados para que eu concretizasse meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha orientadora **Dra. Kátia Carvalho**, pela orientação, atenção, paciência, dedicação e disposição desde que nos conhecemos, me oportunizou desfrutar de seu conhecimento durante todos os anos desde que nos conhecemos.

Ao **Professor Dr. Edmund Chada Baracat** por todo suporte, orientações e incentivo durante toda a minha jornada na pós-graduação.

Ao **Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel** e ao **Dr. José Maria Soares Junior**, pelo suporte e incentivo na pós-graduação e na execução desta pesquisa.

Ao **Professor Ayman Al-Hendy**, pelo qual tenho grande admiração profissional, e que me aceitou em seu laboratório e contribuiu para a execução dessa tese.

Ao **Dr. Qiwie Yang**, por todo suporte, orientações e incentivo durante a execução do estudo.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Ginecologia – LIM58, obrigada **Marinalva, Thiago, Juciara, Isabela, Dara, Laura, Luisa, Leonardo, Aline, Giulia, Rodrigo, Giovana, Bruna e Anamaria**.

Agradeço também aos meus colegas da Universidade de Illinois, **Hoda, Mohamed, Mara, Rish, Hans, Sahar, Amro, Lale, Shanan, Edson, Harja e Sah**.

A minha querida amiga **Kelly Pedrozo**, agradeço o privilégio de ser sua amiga, obrigada por preencher meus dias com carinho e alegria, sempre tive seu apoio incondicional. Agradeço pela companhia diária, pelo ombro amigo, pela confiança, pelos conselhos e todos os momentos que passamos juntas. Você é um exemplo de generosidade e bondade. Não importa a distância ou o tempo, nossa amizade será eterna.

À **Dra. Mara Hoshida** e os funcionários do laboratório de obstetrícia -LIM57, pela utilização do laboratório de cultura celular.

Ao **Dr. Antônio Augusto Rocha** e a **Dra. Roseli da Silva**, que sempre estiveram à disposição para me ajudar durante os experimentos.

Aos **Professores Jairam Menon e Bindu Menon** por terem me aceitado em seu laboratório e me motivaram a continuar nessa jornada.

A **Carla Maganhin**, por ter me acolhido em sua casa em Michigan permitindo que eu iniciasse uma nova jornada em minha carreira.

Ao **Dr. Nilo Bozzini**, pelas palavras de incentivo durante todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Agradeço pelo suporte financeiro para que este projeto pudesse ser concluído (Processo 2015/21068-8) e pelas bolsas concedidas (Processos 2015/23482-6 e 2017/24448-1).

*“A maior aventura que você pode
ter é viver a vida dos seus sonhos”*

Oprah Winfrey

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese 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. Divisão 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. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1.	Leiomioma uterino (LM)	3
1.2.	Leiomiossarcoma uterino (LMS)	11
1.3.	Via de sinalização do <i>Sonic hedgehog</i> e o desenvolvimento de tumores	16
1.4.	Inibidores da via de sinalização do <i>Sonic hedgehog</i>	23
1.4.1.	Inibidores de <i>SMO</i>	25
1.4.2.	Inibidores de <i>GLI</i>	28
1.5.	Racional	29
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Geral	32
2.2.	Específicos	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1.	Reagentes e linhagens celulares	34
3.2.	Ensaio de Proliferação Celular	35
3.3.	Tratamento celular com os inibidores da via do <i>Hedgehog</i>	35
3.4.	Extração de RNA e Expressão Gênica	36
3.5.	Extração de proteínas e reação de <i>Western Blot</i>	38
3.6.	Ensaio de Migração Celular	39
3.7.	Ensaio de Invasão Celular	40
3.8.	Ensaio de Apoptose	40
3.9.	Silenciamento do gene <i>SMO</i>	41
3.10.	Análise Estatística	41
4.	RESULTADOS	43
5.	DISCUSSÃO	65

6.	CONCLUSÕES	74
7.	ANEXO	76
8.	REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Possíveis localizações anatômicas do LM no útero e suas classificações 5
- Figura 2 -** Classificação dos três tipos de LM submucoso descrito pela Sociedade Europeia de Histeroscopia 6
- Figura 3 -** Mecanismos de ativação da via do *SHH* em câncer 20
- Figura 4 -** Via de sinalização do *SHH* (adaptado, www.qiagen.com). Na presença do ligante *SHH*, *PTCH1* libera *SMO* que interage com *SUFU*, promovendo a ativação e translocação de *GLI* para o núcleo. Essa translocação promove ativação da transcrição de genes alvo da via 22
- Figura 5 -** Expressão basal dos componentes da via de sinalização do *Sonic hedgehog* nas células de MM, LM e LMS. **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de MM como referência; **B.** Expressão proteica dos marcadores *Western Blot*, utilizando β -Actina como controle positivo; **C:** Quantificação da expressão proteica, considerando como proteína endógena, β -Actina. D: Expressão nuclear dos fatores de transcrição *GLI* nas células. As proteínas *RhoGDI* e *PARP* foram utilizadas como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. Os asteriscos indicam significância estatística e as linhas pontilhadas, o valor da expressão da amostra referência (MM=1) 44
- Figura 6 -** Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de MM e LMS. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de MM como amostra referência. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra

- referência (MM=1) e os asteriscos indicam significância estatística 45
- Figura 7 -** Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LMS antes (controle) e depois do tratamento com diferentes doses dos inibidores de SMO (LDE225 e GDC0449) nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** GDC0449 47
- Figura 8 -** Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LMS antes (controle) e depois do tratamento com diferentes doses dos inibidores de GLI (Gant61 e Gant58) nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** Gant61 e **B.** Gant58 48
- Figura 9 -** Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de MM utilizando LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1) em diferentes doses, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** Gant61 49
- Figura 10 -** Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LM utilizando LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1) em diferentes doses, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** Gant61..... 50
- Figura 11 -** Perfis das expressões gênica e proteica dos componentes da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com LDE225 (inibidor de SMO). **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência; **B.**

Expressão proteica dos marcadores por *Western Blot* utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Quantificação da expressão proteica considerando como proteína endógena, β -Actina. **D.** Expressão nuclear dos fatores de transcrição GLI nas células. As proteínas RhoGDI e PARP foram utilizados como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra referência (controle =1) 52

Figura 12 - Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com LDE225 (inibidor de SMO). Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência. Os asteriscos indicam significância estatística e a linha pontilhada, o valor da expressão da amostra referência (controle =1) 53

Figura 13 - Perfis das expressões gênica e proteica dos componentes da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Gant61 (inibidor de GLI1). **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência; **B.** Expressão proteica dos marcadores por *Western Blot* utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Quantificação da expressão proteica considerando como proteína endógena β -Actina. **D.** Expressão nuclear dos fatores de transcrição GLI nas células. As proteínas RhoGDI e PARP foram utilizados como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra referência (controle =1) 54

- Figura 14 -** Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Gant61 (inibidor de GLI1). Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência. Os asteriscos indicam significância estatística e a linha pontilhada, o valor da expressão da amostra referência (controle =1) 55
- Figura 15 -** Perfil de proliferação das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). **A.** Análise quantitativa do perfil de proliferação das células de LMS durante o tratamento com LDE225; **B.** Expressão da proteína PCNA, avaliada por *Western Blot* durante o tratamento com LDE225, utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Análise quantitativa do perfil de proliferação das células de LMS durante o tratamento com Gant61; **D.** Expressão da proteína PCNA, avaliada por *Western Blot* durante o tratamento com Gant61, utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador 56
- Figura 16 -** Perfil de migração das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). As fotomicrografias representam as células no momento inicial do ensaio (0h) e 72 horas após o início. **A.** Controle (LMS não tratado); **B.** Gant61 e **C.** LDE225. A área pontilhada foi mensurada com auxílio do programa *Image J*. O gráfico apresenta os cálculos da área migrada pelas células de LMS, em porcentagem, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados no gráfico como média das réplicas experimentais e os asteriscos indicam significância estatística 58
- Figura 17 -** Perfil de invasão das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1).

- A.** As fotomicrografias representam as células de LMS viáveis, tratadas (LDE225 ou Gant61) ou não (controle), que atravessaram a membrana nos tempos de 24, 48 e 72 horas; **B.** Análise quantitativa do perfil de invasão celular, em porcentagem, baseada nas fotomicrografias e mensurada com auxílio do programa *Image J*. Os asteriscos indicam significância estatística 59
- Figura 18 -** Perfil de morte celular por apoptose das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). Como controle positivo para células apoptóticas foi utilizado o fármaco Estaurosporina. **A.** Representação gráfica do programa para detecção de células apoptóticas das células de LMS tratadas (LDE225 ou Gant61) ou não (controle); **B.** Análise quantitativa do ensaio de apoptose por Anexina V referente ao LMS sem tratamento (não tratado), LMS tratado com Estaurosporina (controle positivo), LDE225 ou Gant61 referente a morte por apoptose em estágio precoce ou tardio 60
- Figura 19 -** Perfil de proliferação das células de LMS tratadas com diferentes combinações (dose e fármaco) dos inibidores LDE225 e Gant61 após 72 horas. Para comparação foram utilizadas as células de LMS sem tratamento (controle). Presença do tratamento (+); Ausência do tratamento (-) 61
- Figura 20 -** Silenciamento (*knockdown*) do gene *SMO* em células de LMS após 72 de transfecção. **A.** Perfil de expressão gênica dos componentes da via do *SHH*. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS não transfectadas com RNAi como referência (controle); **B.** Expressão proteica de SMO por *Western Blot*, utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Perfil da

expressão gênica dos genes alvo da via do *SHH* em células de LMS transfectadas (*KD-SMO*) ou não (controle). Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. Os asteriscos indicam significância estatística 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento do LMS uterino, segundo FIGO 2009/ <i>WHO</i> 2014	13
Tabela 2 -	Classificação histológica dos LMS, segundo <i>WHO</i> 2014	14
Tabela 3 -	Genes alvo da via do <i>SHH</i> , tumores em que foram descritos (ou associados) e suas funções	20
Tabela 4 -	Inibidores da via do <i>Sonic hedgehog</i> em câncer	24
Tabela 5 -	Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real <i>Primer-Blast</i>	37
Tabela 6 -	Condições padronizadas para cada anticorpo utilizado nas reações de <i>Western Blot</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCG2	<i>ATP binding cassette subfamily G member 2</i>
AKT	<i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	<i>ATRX chromatin remodeler</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL-2	<i>BCL2 apoptosis regulator</i>
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
CA125	<i>Cancer antigen 125</i>
CAPPESQ	<i>Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CIT	<i>Citoplasma</i>
CK	<i>Creatine kinase</i>
c-MET	<i>MET proto-oncogene</i>
c-MYC	<i>MYC proto-oncogene</i>
COSMIC	<i>Catalog of Somatic Mutations in Cancer</i>
CYP1A1	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>
CYP1B1	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1</i>
DDCT	<i>Delta-Delta-Ct</i>
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DMSO	<i>dimetilsulfóido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase</i>
DPB	<i>Drug-binding pocket</i>
ECD	<i>Extracellular domain</i>
ECL	<i>Extracelular</i>
FAPESP	<i>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FIGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDC0449	Vismodegib
GLI	<i>Glioma-associated oncogene</i>
GLI_A	<i>Gliona- associated oncogene</i> ativador
GLI_R	<i>Glioma-associated oncogene</i> repressor
GnRH	<i>Preprogonadotropin-releasing hormone-like protein</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HMGA2	<i>High mobility group AT-hook 2</i>
ICL	Intracelular
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
INSM1	<i>Insulinoma-associated 1</i>
KD	<i>Knockdown</i>
Ki67	<i>Antigen KI-67</i>
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LDE225	Sonidegib
LDH	Lactato desidrogenase
LM	Leiomioma
LMS	Leiomiossarcoma
MED12	<i>Mediator complex subunit 12</i>
MEK	<i>MAP kinase-ERK kinase</i>
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MM	Miométrio
MTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MTT	<i>dimethylthiazoldiphenyltetra-zoliumbromide</i>
N-MYC	<i>MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
NUC	<i>C2H2-like zinc finger protein</i>
OCT4	<i>Organic cation/carnitine transporter 4</i>

PARP	<i>Poly-(-ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	<i>cAMP dependent protein kinase</i>
PTCH1	<i>Patched 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>Difluoreto de polivinilideno</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
REN	<i>Renin</i>
RHOGDI	<i>RhoGDI [Drosophila melanogaster (fruit fly)]</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>Ribonucleic acid interference</i>
RQ	<i>Relative quantification</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEER	<i>Suerveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothened, frizzled class receptor</i>
SUFU	<i>SUFU negative regulator of hedgehog signaling</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TM	<i>Transmembrane</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT	<i>Protein Wnt-2</i>
β-ACTINA	<i>Actin beta</i>

Garcia N. *Inibidores da via de sinalização do Sonic hedgehog: avaliação de seus efeitos in vitro em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O leiomioma (LM) e o leiomiossarcoma (LMS) são tumores de origem mesenquimal. O LM uterino é um tumor benigno comumente encontrado nas mulheres em idade reprodutiva, enquanto os LMS são tumores raros que representam 7% de todos os sarcomas de tecidos moles, e cerca de 40% dos sarcomas do útero. Essas neoplasias apresentam comportamento clínico variável e seu diagnóstico definitivo ocorre somente após cirurgia. Estudos demonstram que a ativação aberrante da via de sinalização do *Sonic hedgehog* (*SHH*) se relaciona ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres, uma vez que desempenha papel importante na proliferação e diferenciação celular. Em trabalho anterior do grupo, as proteínas SMO e GLI1 mostraram-se hiperexpressas em LMS, seguido pelos LMs e ausentes no miométrio (MM) adjacente. Com base nesses achados, nosso objetivo aqui foi avaliar, *in vitro*, a ação de inibidores de SMO e GLI1, e consequentemente da via do *SHH*, em LM e LMS. Para tanto, linhagens celulares de MM, LM e LMS foram avaliadas quanto à expressão basal de componentes dessa via e de seus principais alvos. Os efeitos dos tratamentos com inibidores de SMO (GDC0449 e LDE225) e GLI (Gant58 e Gant61) na expressão dos genes e proteínas de interesse foram avaliados por *q-PCR* e *Western Blot*, respectivamente. Enquanto que seus efeitos no comportamento celular foram avaliados por ensaios de proliferação, migração, invasão e apoptose. Nossos resultados mostraram que, dentre os inibidores testados, LDE225 e Gant61 foram os mais promissores. Ambos apresentaram efeito inibitório na proliferação das células de LMS, induziram

perda na expressão de SMO, GLI1, GLI2 e GLI3, e inibiram os mecanismos de migração e invasão, além de aumentar o índice apoptótico. Esses efeitos, em conjunto, sugerem o potencial uso desses fármacos para terapia alvo específica nos LMS, via bloqueio da via do SHH

Descritores: Leiomiossarcoma; Leiomioma; Neoplasias uterinas; Proteínas hedgehog; Tratamento farmacológico.

Garcia N. *Sonic hedgehog signaling pathway inhibitors: evaluation of in vitro effects on uterine leiomyomas and leiomyosarcomas* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Leiomyoma (LM) and leiomyosarcoma (LMS) are uterine mesenchymal tumors. Uterine LM is a benign tumor commonly affecting women at reproductive age whereas LMS are rare tumors represent 7% of all soft tissue sarcomas and 40% of all uterine sarcomas. These neoplasms have variable clinical behavior and their definitive diagnosis occurs only after surgery. Several studies have shown that aberrant activation of the *Sonic hedgehog* (*SHH*) signaling pathway plays an important role in cell proliferation and differentiation. In a previous study of our group, we found a hyperexpression of SMO and GLI1 proteins in LMS, compared to LM and no expression in myometrium (MM). The aim of this work was to evaluate, *in vitro*, inhibitors of the *Sonic hedgehog* signaling pathway in LM and LMS. For this purpose, MM, LM and LMS cell lines were evaluated for basal expressions of *SHH* pathway components and major targets. The effect of SMO (GDC0449 and LDE225) and GLI (Gant58 and Gant61) inhibitors in gene and protein expression levels were determined by q-PCR and Western Blot analysis respectively. Proliferation, migration, invasion and apoptosis assays were also performed. Our results showed that among the inhibitors tested, LDE225 and Gant61 were the most promising. Both had an inhibitory effect on LMS cell proliferation, they induced inhibition of SMO, GLI1, GLI2 and GLI3 expression, inhibited migration and invasion mechanisms, and increased apoptotic index. These effects together suggest the potential use of these drugs for specific target therapy in LMS via SHH blockade.

Descriptors: Leiomyosarcoma; Leiomyoma; Uterine neoplasm; Hedgehog proteins; Drug therapy.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos tumores de musculatura lisa do trato genital feminino são tumores benignos (leiomiomas). Já os malignos, leiomiossarcomas (LMS), são menos comuns e com áreas variáveis de necrose e hemorragia. Além disso, são altamente agressivos e podem apresentar problemas de diagnóstico (Seagle *et al.*, 2017). Os leiomiomas (LM) e os leiomiossarcomas (LMS) uterinos apresentam a mesma diferenciação celular. O LM uterino é o tumor benigno mais frequente do trato genital feminino e geralmente acomete mulheres na idade reprodutiva. Já o LMS é um tumor raro com comportamento agressivo (Devereaux and Schoolmeester, 2019).

Existem controversas sobre a origem dessas neoplasias. Alguns autores acreditam que o desenvolvimento do LM se dá a partir da transformação de células troncos miometriais em células iniciadoras tumorais (Elkafas *et al.*, 2017; Mas *et al.*, 2017). Já o LMS, poucos autores acreditam que ocorra a transformação maligna do LM para o LMS, porém não há evidências que comprovem essa hipótese (Di Luigi *et al.*, 2015). No entanto, para distinguir clinicamente as neoplasias malignas de benignas é necessário a presença de algumas das seguintes características: diferenciação morfológica alternativa (mixóide ou epitelióide), aumento da celularidade, atipia citológica acentuada e necrose (Devereaux and Schoolmeester, 2019).

A acurácia no diagnóstico de LMS na clínica médica é um grande desafio. O LM é um tumor que aparece de modo mais comum do que o LMS, porém as pacientes apresentam sintomatologia semelhante para ambos tumores. Embora o crescimento tumoral rápido após a menopausa possa indicar malignidade,

também podem ser encontrados casos de variantes histológicas dos LM (LM não convencionais). Desse modo, o diagnóstico diferencial entre o LMS e as variantes histológicas dos LM tornou-se um desafio na prática clínica, podendo gerar erros e influenciar o tratamento e prognóstico das pacientes (Lakhman *et al.*, 2017).

Essas neoplasias apresentam terapias específicas. Os LM são comumente tratados com medicamentos hormonais, anti-inflamatórios e suplemento de vitaminas e ferro por conta dos nutrientes perdidos no sangramento (Hajhashemi *et al.*, 2019; Bradley *et al.*, 2019; Archer *et al.*, 2017). Já os LMS, a principal opção terapêutica é a remoção uterina seguida por terapia adjuvante como radioterapia ou quimioterapia, com o objetivo de evitar recidiva e metástase (Momtahan *et al.*, 2019). Tendo em vista as alternativas oferecidas até o presente momento, estudos que possibilitem a identificação de novas opções terapêuticas para ambos tumores, apresentam efeito benéfico para as pacientes.

1.1. Leiomioma uterino (LM)

É a neoplasia monoclonal benigna miometrial mais frequente do sistema reprodutor feminino (Borahay *et al.*, 2015; Drayer and Catherino, 2015; Sparic *et al.*, 2016). Os LMs são tumores dependentes de hormônios que afetam de 60 a 80% das mulheres na idade reprodutiva (Bowden *et al.*, 2009; Brakta *et al.*, 2015). Esses tumores foram descritos pela primeira vez por *Matthew Baillie* no *Hospital St. George's* em Londres em 1793, como sólidos e de aspecto arredondado (Buttram, 1986; Sparic *et al.*, 2016). Os LMs podem ser classificados de acordo com a sua localização no útero (McLucas, 2008; Shwayder and Sakhel, 2014), vide Figura 1.

Os intramurais são aqueles LMs que se originam dentro da camada do miométrio. Apresentam aspecto bem demarcado, devido à compressão no miométrio e há a presença de uma pseudocápsula. Embora os intramurais sejam os LMs mais comuns, seu crescimento para outra camada uterina (endométrio ou perimétrio) pode alterar sua classificação para subseroso ou submucoso (Shwayder and Sakhel, 2014).

Submucoso refere-se ao tumor com proximidade ao endométrio. Estima-se que representem cerca de 5 a 10% de todos os LMs. A sintomatologia clínica inclui sangramento uterino anormal e infertilidade, devido à distorção do endométrio. O LM submucoso pode ser pedunculado, quando esse se projeta para a cavidade uterina ligado ao miométrio por um pedículo. Nos casos pedunculados há o risco de torção ou expulsão do tumor por meio do canal genital. Sabe-se ainda que infecções e necroses são comuns devido à falta de suprimento sanguíneo (McLucas, 2008).

Os LMs subserosos localizam-se abaixo do peritônio uterino, podendo ser pedunculados. Seu crescimento na cavidade peritoneal, faz com que ocorra compressão de órgãos como bexiga e intestino. Assim como nos LMs submucosos pedunculados, os subserosos pedunculados também podem apresentar torção e necrose (McLucas, 2008).

Figura 1: Possíveis localizações anatômicas do LM no útero e suas classificações.

Fonte: <http://www.mdsaude.com/2011/01/mioma-uterino-sintomas.html>.

A Sociedade Europeia de Histeroscopia classifica os LMs que se projetam para a cavidade uterina de acordo com a profundidade de protrusão (Wamsteker *et al.*, 1993; McLucas, 2008). Tipo 0: LM pedunculado localizado inteiramente dentro da cavidade uterina. Tipo 1: Menos de 50% do tumor no miométrio e mais de 50% na cavidade uterina. Tipo 2: Mais de 50% no miométrio e menos de 50% na cavidade uterina (Figura 2) (Wamsteker *et al.*, 1993).

Figura 2: Classificação dos três tipos de LM submucoso descrito pela Sociedade Europeia de Histeroscopia (McLucas, 2008).

O LM tem impacto negativo no sistema reprodutivo feminino, e pode apresentar nódulo único ou múltiplos, gerando morbidade significativa e perda de qualidade de vida das pacientes (Downes *et al.*, 2010). De acordo com a literatura, 40 a 60% de todas as histerectomias realizadas são devido à presença de LM (Sparic *et al.*, 2016). Os sintomas mais comuns são: sangramento uterino anormal com consequente anemia, dor pélvica, pressão abdominal, infertilidade, incontinência urinária, compressão de órgãos adjacentes, entre outros (Commandeur *et al.*, 2015; Drayer and Catherino, 2015; Taylor *et al.*, 2015). Os sintomas podem variar devido à localização, número e tamanho de nódulos (Pansky *et al.*, 2009), porém a maioria dos LMs são assintomáticos (Brakta *et al.*, 2015).

A etiologia do LM não é bem compreendida, porém sabe-se que fatores hormonais, genéticos e fatores de crescimento estão relacionados com o desenvolvimento desses tumores (Parker, 2007). Seu crescimento e desenvolvimento é dependente dos hormônios ovarianos, estrogênio e progesterona. Sendo assim, fatores que aumentam a exposição ao estrogênio, como a obesidade e a menarca precoce aumentam a incidência desse tumor (Parker, 2007). Já o exercício físico e paridade são fatores protetores, pois diminuírem a exposição ao hormônio (Cook and Walker, 2004).

A observação de que os LM se desenvolvem em mulheres na idade reprodutiva, crescem durante a gestação e regredem na menopausa, suporta a hipótese que os esteroides ovarianos estimulam seu crescimento (Moravek *et al.*, 2015). O bloqueio da produção dos hormônios ovarianos pelo tratamento com o agonista de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofina), resulta na diminuição do tamanho do tumor, porém esse efeito é revertido quando o tratamento é interrompido (Bozzini *et al.*, 2003).

O estrogênio e a progesterona são cruciais para o crescimento dos LM (Sato *et al.*, 1998). A atividade ovariana é essencial para o desenvolvimento e crescimento desses tumores, que em grande parte, diminuem de tamanho após a menopausa (Parker, 2007; Chiaffarino *et al.*, 2016). Os LM apresentam expressão aumentada do receptor de progesterona, efeito que está diretamente associado com o número de nódulos e inversamente correlacionado com o sangramento uterino anormal e dismenorrea, sugerindo que a sinalização do receptor de progesterona intensifica os sintomas clínicos (Wechter *et al.*, 2011).

Outro fato importante é o de que os LM não são expostos somente ao estrogênio produzido pelo ovário, mas também pela conversão do androgênio

em estrogênio pela enzima aromatase produzida pelo próprio tumor (Bulun *et al.*, 1994).

A idade é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento do LM (Marshall *et al.*, 1997; Sparic *et al.*, 2016). Sabe-se que durante os anos reprodutivos, o risco aumenta com a idade da paciente (Wise *et al.*, 2004). Mulheres que tiveram menarca precoce apresentam risco aumentado, devido a maior exposição aos esteroides sexuais (Terry *et al.*, 2010). Assim, há uma diminuição na prevalência de LM em mulheres com menarca tardia (Commandeur *et al.*, 2015).

Vários estudos mostraram que a gravidez apresenta um efeito protetor no desenvolvimento desses tumores (Chen *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002). O declínio acentuado do estrogênio e da progesterona no início da gravidez e no período pós-parto, podem causar um efeito redutor dramático no crescimento do LM. Estima-se que 36% dos tumores presentes no primeiro trimestre de gravidez não sejam identificados no ultrassom entre 3 e 6 meses pós-parto (Laughlin *et al.*, 2010), e aqueles que permanecem, apresentam redução do diâmetro de 0,5 cm.

A relação entre alta paridade e baixa prevalência de LM é considerada superestimada, porque a presença do tumor pode levar à infertilidade, reduzindo assim a paridade. O tempo desde o último parto aumenta o risco de desenvolver LM em aproximadamente 2 e 3 vezes em mulheres que pariram há 5 ou mais anos quando comparadas com aquelas que pariram mais recentemente, tanto em mulheres negras quanto brancas (Marshall *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2010).

As mulheres negras representam maior porcentagem no desenvolvimento de LM quando comparadas às caucasianas (Okolo *et al.*, 2005). Mesmo depois

de ajustar por Índice de Massa Corpórea (IMC), paridade, status socioeconômico e outros fatores de risco, as mulheres negras têm maior incidência, tumores maiores no diagnóstico, sintomas mais graves e idade precoce no diagnóstico se comparadas às mulheres brancas (Kjerulff *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 2004). A exemplo disso, sabe-se que a incidência do LM aos 50 anos é maior que 80% entre as mulheres negras, contra 70% em mulheres caucasianas (Parker, 2007). Além disso, mulheres negras apresentam maior probabilidade de apresentar alguns fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento do LM incluindo idade precoce da menarca e maiores chances de serem obesas (Stewart *et al.*, 2013).

A exata razão da variação da incidência dos LM não é clara (Sparic *et al.*, 2016). A literatura apresenta possíveis causas como, a diferença da biossíntese e/ou metabolismo do estrogênio, diferenças nas expressões e/ou funções dos receptores hormonais (Othman and Al-Hendy, 2008) e alteração na expressão de micro RNAs (cuja variação de expressão entre os grupos étnicos já foi demonstrada) (Chuang *et al.*, 2019). Outras causas têm sido estudadas, como hereditariedade, estilo de vida, hábitos alimentares e estresse (Parker, 2007; Othman and Al-Hendy, 2008).

Alterações em genes incluindo *MED12*, *HMGA2*, *CYP1A1* e *CYP1B1*, nos proto-oncogenes *p27* e *p53*, nas vias de sinalização *PI3K-AKT-mTOR* e mecanismos epigenéticos já foram associados à etiologia dos LM (Styer and Rueda, 2016). Aproximadamente 40-50% dos LM possuem anomalias citogenéticas, como a trissomia do cromossomo 12, rearranjos de 12q, 6p, 10q e 13q e deleções de 7q, 3q e 1p. As translocações cromossômicas mais comuns

são: t (12; 14) (q14dq15; q23dq24), resultando no aumento da expressão de *HMGA2* (Mehine *et al.*, 2013).

Além das alterações cromossômicas, as mutações pontuais em genes são frequentes nos LM. O *MED12*, ou subunidade complexa do mediador 12, é o gene mais frequentemente mutado nos LM, (50-85%) (Makinen *et al.*, 2011). Este gene é um regulador de transcrição que liga as sequências regulatórias do DNA ao complexo de iniciação da RNA polimerase II. Sua inativação resulta no aumento da regulação do fator de crescimento *TGFβ*, que tem efeito sobre os genes que codificam proteínas envolvidas na formação do colágeno e na formação excessiva de matriz extracelular, comumente encontrada nos LM (Al-Hendy *et al.*, 2017).

Os pequenos RNAs (22 a 25 bp) não codificadores, micro RNAs (miRNA), regulam a expressão gênica por meio do silenciamento de genes. Os LM apresentam alteração da expressão de miRNAs como, mir-let-7, 200a, 200c, 93, 106b e 21, que estão envolvidos com processos fisiológicos, como proliferação celular, apoptose, matriz extracelular, angiogênese e inflamação, influenciando deste modo, o desenvolvimento do tumor (Klemke *et al.*, 2010; Cardozo *et al.*, 2012; Karmon *et al.*, 2014; Chuang and Khorram, 2019).

A associação entre a incidência de LM e os hábitos de vida, incluindo tabagismo, contraceptivos hormonais, consumo de álcool, cafeína e dieta tem se mostrado inconsistente (Baird *et al.*, 2003). No entanto, evidências demonstram associação entre a deficiência de vitamina D com o desenvolvimento de LM (Ciebiera *et al.*, 2018). O tratamento *in vitro* com vitamina D induziu a inibição da formação de matriz extracelular e proliferação (Gross and Morton, 2001).

1.2. Leiomiossarcoma uterino (LMS)

Sarcomas uterinos são tumores raros que representam 7% de todos os sarcomas de tecidos moles (Toro *et al.*, 2006; D'Angelo and Prat, 2010; Wu *et al.*, 2011). São responsáveis por cerca de 3 a 7% de todas as malignidades uterinas e apresentam incidência de 0,7 por 100.000 mulheres ao ano (Van den Bosch *et al.*, 2012). Além disso, são tumores com prognóstico ruim e média de sobrevida em 5 anos, abrangendo 50-70% dos casos no estadio I, e 20% para os estadios seguintes (Koivisto-Korander *et al.*, 2008). O LMS é o subtipo histológico de sarcoma uterino mais comum (Toro *et al.*, 2006).

Os LMS são tumores raros e agressivos que apresentam resistência à quimioterapia (Seagle *et al.*, 2017). Os LMS são mais comuns no período pós-menopausa, mais especificamente na quinta década de vida (Wu *et al.*, 2011). Os sintomas clínicos assemelham-se aos do LM uterino, incluindo sangramento uterino anormal, dor abdominal e massa pélvica (Wu *et al.*, 2008).

Esse tipo de tumor possui alta taxa de recidiva e mais da metade dos casos acaba por dar origem a metástases para órgãos distantes (em geral pulmões, ossos e cérebro), por via hematogênica. Em casos piores, pode ocorrer disseminação para toda a cavidade abdominal (Collini *et al.*, 2009; Lehnhardt *et al.*, 2009).

Os LMS são diagnosticados em mulheres entre 35-75 anos, com maior incidência durante a perimenopausa (Bartosch *et al.*, 2017; Lakhman *et al.*, 2017; Seagle *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, os sintomas mais comuns incluem, sangramento uterino anormal (56%), massa pélvica (54%) e dor (22%) (Giuntoli li *et al.*, 2003). Devido ao fato dos sintomas apresentados

não serem específicos, os LMS podem ser facilmente confundidos com outros tumores benignos, como os LM (Giuntoli *et al.*, 2003).

Além disso, os LMS são tumores únicos e frequentemente grandes, com 75% dos casos >5 cm no momento do diagnóstico. Tipicamente invadem o miométrio e em alguns casos apresentam crescimento de pólipos na cavidade endometrial. As características histológicas incluem, presença de células fusiformes, atividade mitótica com atipia, núcleos pleomórficos, hiperplasia com fascicular padrão e necrose coagulativa (Matsuo *et al.*, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*) de 2014, a classificação e o estadiamento dos LMS foram atribuídos na tentativa de refletir o comportamento biológico (Tabela 1).

A base de dados *SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results)* mostrou que entre os anos 2000 e 2012, 50% das pacientes com LMS foram diagnosticadas no estágio I, 14% nos estágios II-III e 31% no estágio IV da doença (Hosh *et al.*, 2016). Esses tumores são encontrados em aproximadamente 0,47% das histerectomias realizadas (Zhao *et al.*, 2015).

Microscopicamente, o LMS apresenta atipias citológicas difusas de moderada à severa, alto índice mitótico (≥ 10 por campo) e necrose (Bell *et al.*, 1994). Sua classificação em subtipos é baseada em suas características celulares e nos constituintes do estroma, porém os LMS epitelióides e mixóides além de serem mais difíceis de diagnosticar, possuem comportamento mais agressivo (Tabela 2) (Ip and Cheung, 2011; Mbatani *et al.*, 2018).

Tabela 1: Estadiamento do LMS uterino, segundo FIGO 2009 /WHO 2014.

Estadio	Definição
I	Tumor limitado ao útero
IA	≤5cm
IB	≥5cm
II	Tumor que se estende além do útero, para o interior da pelve
IIA	Envolvimento anexial
IIB	Envolvimento de outros tecidos pélvicos
III	Tumor que invade os tecidos abdominais
IIIA	Um sítio
IIIB	Mais de um sítio
IIIC	Metástase para linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos
IV	
IVA	Tumor que invade a bexiga e/ou reto
IVB	Metástase a distância

*Revisado pela *American Cancer Society, Staging for Uterine Sarcomas* (2017)

Os LMS são tumores que expressam actina de músculo liso, desmina (Watanabe *et al.*, 2000), podem apresentar aumento na expressão de p53 e p16 (O'Neill *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008) e marcação para Ki67, indicando aumento da capacidade proliferativa (O'Neill *et al.*, 2007).

Tabela 2: Classificação histológica dos LMS, segundo *WHO* 2014 (Ip e Cheung, 2011).

Tipos histológicos	Critérios de diagnóstico	Características adicionais
Células fusiformes	Qualquer das características seguintes: - Atipia difusa moderada a grave - ≥ 10 números de mitoses por 10 campos de alcance; necrose tumoral	
Epitelióide	-Atipia moderada a grave - ≥ 5 números de mitoses por 10 campos de alcance ou necrose tumoral	> 50% células devem ser epiteliais
Mixóide	Qualquer uma das seguintes características: - Atipia moderada a grave - ≥ 2 números de mitoses por 10 campos de alcance; necrose tumoral	- Hipocelularidade - Geralmente com fronteiras infiltradas
Morfologia rara	- Células xantamatosas - Rhabdomioblastos - Células gigantes de osteoclastos e lipoblastos	

Outra característica apresentada por esses tumores são os cariótipos complexos (Dal Cin, 2009). O *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* apresenta o perfil genômico de 98 amostras de LMS, no qual os genes normalmente mutados incluem *TP53* (51%), *RB1* (15,3%) e *ATRX* (13,3%). O banco de dados *COSMIC* revelou que em um estudo incluindo 84 amostras de LMS, o *TP53* (24%) é o gene mais comumente mutado, seguido pelo *MED12* (7%) e *KRAS* (7%) (www.sanger.cancer.ac.uk) (Cui *et al.*, 2017). Outros genes relacionados com sobrevivência celular (*BCL-2*), ciclo celular (*p16* e *RB*), angiogênese e fator de crescimento (*PDGFR*, *PDGF* e *VEGF*), têm sido descritos como importantes na carcinogênese do LMS (Lusby *et al.*, 2013).

A maioria das pacientes com LMS não expõem fatores predisponentes claros para o desenvolvimento desse tumor. Por outro lado, pacientes com retinoblastoma hereditário expressam risco aumentado em 13,1% na formação e progressão de qualquer tipo de sarcoma, incluindo os LMS (Venkatraman *et al.*, 2003). Além disso, pacientes com mutações hereditárias em *TP53* (síndrome de *Li-Fraumeni*), também apresentam maior risco para o desenvolvimento dos LMS (Ognjanovic *et al.*, 2012).

Outro fator que pode acarretar um acréscimo no risco da formação de sarcomas é a exposição à radiação, enquanto que o uso de tamoxifeno associa-se com o risco elevado para o desenvolvimento de carcinomas endometriais e LMS (Botsis *et al.*, 2006).

Até o presente momento, nenhum teste laboratorial foi capaz de diagnosticar o LMS em fase pré-operatória. Embora algumas pacientes apresentem elevados níveis de lactato desidrogenase (LDH) e CA125 (Seki *et al.*, 1992), esses marcadores não apresentam especificidade para o diagnóstico desses tumores.

Na atualidade não há nenhum marcador de diagnóstico que possa diferenciar o LM do LMS em fase pré-cirúrgica. Todos os casos, tanto de LM quanto de LMS são diagnósticos depois da cirurgia, após a realização da análise de um patologista. A distinção entre esses dois tumores é baseada nos seguintes critérios: índice mitótico, atipia nuclear e necrose celular (Lim *et al.*, 2013).

Devido ao fato dos LMS serem resistentes à quimioterapia e radioterapia, a intervenção cirúrgica tornou-se a principal opção terapêutica. A descoberta de terapias alternativas adjuvantes eficazes, pode ajudar a melhorar o prognóstico das pacientes com esse tumor. Diversos trabalhos visam compreender a biologia do LMS, uma vez que a descoberta de vias de sinalização relevantes para o

processo de patogênese desse tumor pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, que por sua vez, poderão melhorar o prognóstico das pacientes. Nesse sentido, nosso grupo mostrou, em trabalho anterior, a expressão crescente de duas importantes proteínas da via de sinalização do *Sonic hedgehog* (SMO e GLI1) em amostras (incluídas em parafina) de miométrio (MM), LM e LMS de pacientes (Garcia *et al.*, 2016).

1.3. Via de sinalização do *Sonic hedgehog* e o desenvolvimento de tumores

A via de sinalização do *Sonic hedgehog* (SHH) desempenha papel importante nos desenvolvimentos embrionário e de tecidos normais, no processo de diferenciação de tecidos (Dessaud *et al.*, 2008), além de estar envolvida na formação e progressão de diversos tipos de tumores (Boehme *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2016; Di Mauro *et al.*, 2017; Ghanbari *et al.*, 2019). Evidências demonstram que a embriogênese e a tumorigênese apresentam características comuns, ou seja, ambos processos dependem de mecanismos coordenados de proliferação, diferenciação e migração celular (Ma *et al.*, 2010). Assim sendo, vias de sinalização importantes para o desenvolvimento embrionário e organogênese, incluindo as vias SHH, NOTCH e TGF- β , também são moduladas durante a tumorigênese (Roth *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008; Warmflash *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2016).

Descrito pela primeira vez em 1978, por Nusslein-Volhard e Eric Wieschaus, o gene *hedgehog* (HH) foi descoberto durante um *screening* genético em mosca de fruta (*Drosophila*). As moscas deficientes de HH apresentavam defeitos na

formação da pele, desenvolvendo uma camada de pelos que se assemelhava a um ouriço (Verdelho Machado and Diehl, 2016).

As moléculas sinalizadoras da via do *HH* em vertebrados incluem 3 ligantes, o *Sonic hedgehog* (*SHH*), o *Indian hedgehog* (*IHH*) e o *Desert hedgehog* (*DHH*). Além do receptor *Patched 1* (*PTCH1*), o transdutor de sinal *Smoothed* (*SMO*), a proteína citoplasmática *Suppressor of fused* (*SUFU*) e 3 fatores de transcrição, *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* (*glioma-associated oncogene*) (Echelard et al., 1993).

A sinalização do *Sonic hedgehog* (*SHH*) é essencial para o desenvolvimento embrionário e crucial na manutenção da polaridade tecidual (forma, estrutura e função) (Fan et al., 1997; Oro et al., 1997). Essa via é rigidamente regulada em vários tecidos adultos, e sua desregulação tem sido descrita em diversos tumores (Berman et al., 2002; Tojo et al., 2002; Thayer et al., 2003; Watkins et al., 2003; Kubo et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Yuan et al., 2007; Dierks et al., 2008).

Em 1990, os genes *Sonic hedgehog* (*SHH*), *Indian hedgehog* (*IHH*) e *Desert hedgehog* (*DHH*) foram descobertos em vertebrados. O *IHH* e o *DHH* apresentam papéis importantes no desenvolvimento de tecidos normais, enquanto o *SHH* é o ligante mais importante e expresso em tecidos adultos, além de estar relacionado com a formação de tumores (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Roelink et al., 1994). O receptor celular para o *SHH* é uma proteína transmembrana de 12 passagens, denominada *Patched* (*PTCH1*). Na ausência do ligante, o *PTCH1* exerce efeito repressor sobre a proteína transmembrana *Smoothed* (*SMO*), que por sua vez, apresenta 7 passagens e funciona como um potente ativador da via (Incardona et al., 2000).

O SMO pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) transmembrana, com 7 passagens. Trata-se da maior classe de receptores de superfície celular em vertebrados (Fredriksson *et al.*, 2003). Em humanos, SMO compreende 787 aminoácidos organizados em três domínios principais: domínio extracelular N-terminal (ECD) (resíduos 1 a 220), domínio que abrange a membrana heptahelical (7-TM) (TMD), típico de todos os GPCRs (resíduos 221 a 558) (Wang *et al.*, 2013), e domínio citoplasmáticos C-terminal, menos caracterizado (resíduos 559 a 787) (Malpel *et al.*, 2007). O TMD consiste em 7-TM conectada por três alças extracelulares (ECL1-3) e três intracelulares (ICL1-3) (Wang *et al.*, 2013).

O mecanismo pelo qual PTCH1 inibe SMO não é bem compreendido. No entanto, sabe-se que PTCH1 não interage fisicamente com SMO, mas regula o transporte, a síntese e o acesso de moléculas que afetam sua atividade (Taipale *et al.*, 2002).

A ativação da via do *SHH* pode acontecer de duas maneiras diferentes. A primeira é a sinalização canonical ou canônica, que ocorre de modo ligante-dependente ou através da indução da sinalização pela ativação do receptor. A segunda, sinalização não canônica, sucede quando moléculas jusantes de SMO são ativadas. Tanto a sinalização canônica quanto a não canônica, são dependentes da ativação dos fatores de transcrição GLI (Blotta *et al.*, 2012).

Na presença do ligante *SHH*, a proteína PTCH1 perde sua ação inibitória sobre SMO, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que permite a ativação dos fatores de transcrição GLI ativadores e inibe a formação dos GLI repressores (Stecca and Ruiz, 2010).

A ativação da via de sinalização do *SHH*, como mencionado anteriormente, pode ser canônica ou não canônica, sendo ambas dependentes de GLI. Na ativação canônica há a presença do ligante *SHH*, que inicia a cascata de sinalização conduzindo à translocação de GLI para o núcleo, podendo ocorrer ativação autócrina, parácrina ou parácrina reversa (Shevde and Samant, 2014). A sinalização autócrina ocorre quando o ligante previamente secretado pela célula tumoral age sobre a mesma célula secretora (tumoral). Já na ativação parácrina, a célula tumoral secreta o ligante *SHH*, que por sua vez se liga aos receptores de células no estroma circundante, ativando a via nas células do estroma. Por fim, a ativação parácrina reversa ocorre quando as células do estroma secretam o ligante *SHH*, que agora se liga ao receptor de células tumorais, ativando deste modo, a via (Figura 3) (Hanna and Shevde, 2016).

A ativação da via de sinalização não canônica é independente da presença do ligante *SHH*. Nesse caso, a ativação ocorre pela perda de função do PTCH1 ou ganho da função do SMO devido a presença de mutações (Figura 3) (Hanna and Shevde, 2016).

Os fatores de transcrição GLI1, GLI2 e GLI3 são efetores e regulam a expressão de diversos genes alvo da via *SHH* (Tabela 3) (Sasai and Briscoe, 2012; Habib and O'Shaughnessy, 2016). GLI2 e GLI3 apresentam domínios repressores truncados (GLI_R) e também podem funcionar na forma completa como ativador da transcrição (GLI_A). Já GLI1, não apresenta o domínio repressor, tendo apenas a forma completa como ativador da transcrição (GLI_A) (Habib and O'Shaughnessy, 2016).

Figura 3: Mecanismos de ativação da via do *SHH* em câncer (Tibes and Mesa, 2014).

Tabela 3: Genes alvo da via do *SHH*, tumores em que foram descritos (ou associados) e suas funções.

Função	Gene Alvo	Tipo de tumor	Referência
Resistência à droga	<i>ABCG2</i>	Linfoma, ovário e gástrico	(Singh <i>et al.</i> , 2011b; Yu <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2018)
Proliferação	<i>c-MYC</i> , <i>n-MYC</i>	Meduloblastoma e Gástrico, Pulmão	(Chaturvedi <i>et al.</i> , 2018; Tang <i>et al.</i> , 2018, Chen <i>et al.</i> , 2018)
Ciclo celular	<i>CCND1</i> , <i>P21</i>	Meduloblastoma e esôfago, mama e próstata	(Gonnissen <i>et al.</i> , 2016; Di Mauro <i>et al.</i> , 2017; Gonnissen <i>et al.</i> , 2017; Chaturvedi <i>et al.</i> , 2018; Wang <i>et al.</i> , 2018)
Apoptose	<i>BCL-2</i> , <i>CASPASE 3</i> , <i>BAX</i> , <i>CASPASE 9</i> e <i>BAK</i>	Meduloblastoma, pulmão, gástrico, próstata, mama e sangue	(Lin <i>et al.</i> , 2016; Di Mauro <i>et al.</i> , 2017; Chaturvedi <i>et al.</i> , 2018; Song <i>et al.</i> , 2018; Tang <i>et al.</i> , 2018; Gonnissen <i>et al.</i> , 2016)

continua

Sobrevida	<i>AKT</i>	Meduloblastoma, próstata, esôfago, sangue, tireoide e próstata	(Gonnissen <i>et al.</i> , 2016; Chaturvedi <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2016b; Williamson <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2018)
Morte celular	<i>SURVIVIN</i>	Cabeça e pescoço	(Hehlhans <i>et al.</i> , 2018)
Reparo do DNA	<i>PARP, TP53 e RAD51</i>	Gástrico, próstata e sangue	(Gonnissen <i>et al.</i> , 2016; Tang <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2016)
Adesão	<i>E-CADERINA, SNAIL, N-CADERINA</i>	Colorretal, cérebro e esôfago	(Li <i>et al.</i> , 2016a; Magistri <i>et al.</i> , 2017; Wang <i>et al.</i> , 2018)
Diferenciação	<i>OCT4, SOX2, NANOG, PDGFRα</i>	Próstata e sangue	(Tong <i>et al.</i> , 2018; Kakiuchi <i>et al.</i> , 2017)
Angiogênese	<i>VEGFR2, c-MET</i>	Mama e tireoide	(Di Mauro <i>et al.</i> , 2017; Williamson <i>et al.</i> , 2016)

conclusão

De modo geral, a via é ativada quando o *SHH* secretado se liga ao receptor PTCH1, permitindo a liberação de SMO, que por sua vez age sobre os fatores de transcrição GLI, possibilitando a translocação destes para o núcleo da célula. Esse processo viabiliza a transcrição de genes alvo da via (Hanna and Shevde, 2016) (Figura 4). SUFU, um regulador negativo da via *SHH*, atua entre SMO e GLI. Desse modo, a proteína SUFU interage sequestrando GLI no citoplasma e permitindo sua fosforilação pelas proteínas quinase A (PKA), glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) e membros da família da caseína quinase 1 (CK1) (Merchant and Saqui-Salces, 2014).

Figura 4: Via de sinalização do SHH (adaptado, www.qiagen.com). Na presença do ligante SHH, PTCH1 libera SMO que interage com SUFU, promovendo a ativação e translocação de GLI para o núcleo. Essa translocação promove ativação da transcrição de genes alvo da via.

Durante a embriogênese, GLI2_A e GLI3_R são considerados os principais ativadores e repressores transcricionais da via do *hedgehog*, enquanto que GLI1 é dispensável (Habib and O'Shaughnessy, 2016). Em contraste, GLI1 e GLI2 são considerados efetores oncogênicos da via (Stecca and Ruiz, 2010). Ambos possuem alvos que estão envolvidos com mecanismos de proliferação celular, sobrevivência, invasão, migração, angiogênese, transição epitélio mesênquima, metástase e resistência à drogas (Habib and O'Shaughnessy, 2016).

As proteínas GLI são reguladas por várias vias oncogênicas como *PGF*, *RAS*, *MEK*, *PIK3*, *AKT*, *TGFβ* e *NOTCH1* (Nicolas *et al.*, 2003; Dennler *et al.*, 2007; Riobo and Manning, 2007; Ruiz i Altaba *et al.*, 2007; Stecca *et al.*, 2007;

Ju *et al.*, 2009; Seto *et al.*, 2009). Além disso, existem evidências de que supressores tumorais incluindo *PTEN*, *P53* e *REN* também possam regular essas proteínas (Groszer *et al.*, 2001; Di Marcotullio *et al.*, 2004; Stecca and Ruiz i Altaba, 2009).

A via de sinalização do *SHH* foi sugerida pela primeira vez em tumores, quando perceberam que mutações em *PTCH1* estavam presentes na síndrome de *Gorlin*. Essa síndrome eleva o risco do desenvolvimento dos carcinomas basocelular, meduloblastoma, rabdomiossarcoma e meningioma, além de ser caracterizada por mutações em *PTCH1*, como mencionado, *SMO* e outros componentes (Hahn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996). A ativação da via tem sido observada em vários tipos de tumores e associada com diferentes mecanismos. Desse modo, os componentes da via tornaram-se atrativos para o desenvolvimento de terapias anticâncer (Di Magno *et al.*, 2015).

1.4. Inibidores da via de sinalização do *Sonic hedgehog*

Em consequência ao amplo envolvimento da via de sinalização do *SHH* em vários tipos tumorais, além do fato da via controlar diversos processos celulares, estratégias terapêuticas contra cânceres vêm sendo desenvolvidas através de estudos dos inibidores da via (Chen *et al.*, 2002). A aplicação de inibidores específicos tem se mostrado eficaz na prevenção do crescimento de muitos tumores “*in vitro*” (Gould and Missailidis, 2011; Singh *et al.*, 2011a) e “*in vivo*” (Lauth *et al.*, 2007; Dierks *et al.*, 2008) (Tabela 4).

Tabela 4: Inibidores da via do *Sonic hedgehog* em câncer.

Alvo	Tipo de tumor	Fármaco	Referência
SMO	Meduloblastoma, colorectal	GDC0449	(Chaturvedi <i>et al.</i> , 2018; Magistri <i>et al.</i> , 2017)
GLI	Mama, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, próstata, mama e Meduloblastoma	Gant61	(Riaz <i>et al.</i> , 2018; Matsumoto <i>et al.</i> , 2014; Shao <i>et al.</i> , 2017; Gonnissen <i>et al.</i> , 2017; Koike <i>et al.</i> , 2017; Lin <i>et al.</i> , 2017)
SMO e GLI	Mama	GDC0449 e Gant61	(Benvenuto <i>et al.</i> , 2016)
SMO	Melanoma	LDE 225 e ciclopamina	(Jalili <i>et al.</i> , 2013)
SMO	Ovário	Ciclopamina, IPI-926	(McCann <i>et al.</i> , 2011)
SMO	Leucemia	Ciclopamina e IPI-926	(Lin <i>et al.</i> , 2010)
SMO	Colorectal, mama	Ciclopamina	(Qualtrough <i>et al.</i> , 2015; Che <i>et al.</i> , 2013)
GLI1	Endométrio, gástrico	Itraconazol	(Hu <i>et al.</i> , 2017)
SMO e GLI1	Leucemia	Gant58 e Ciclopamina	(Hou <i>et al.</i> , 2014)
SMO e GLI	Rabdomiossarcoma	Trióxido de arsênico e Ciclopamina	(Boehme <i>et al.</i> , 2016)
SMO	Ostessarcocoma	Purmorphamina, IPI-926, ciclopamina e Gant61	(Lo <i>et al.</i> , 2014)

Ao todo, mais de 200 compostos têm sido descritos apresentando efeitos inibitórios. Contudo, destacam-se três principais, sendo eles: as moléculas *SHH* (anticorpos neutralizantes de *SHH*, pequena molécula Robotnikinin), a proteína SMO (ciclopamina e seus derivados - IPI-926 e Cyc2; e compostos sintéticos - GDC0449, BMS833923, LDE-225, PF044440013 e LY2940680) e a proteína GLI (IPH-1, IPH-2, GANT-56 e GANT-61) (Xie *et al.*, 2013).

1.4.1. Inibidores de SMO

A molécula SMO é o principal alvo do desenvolvimento de inibidores da via do *SHH*. A inibição dessa molécula bloqueia a ativação jusante dos fatores de transcrição GLI, gerando repressão dos genes alvo associados ao crescimento e progressão tumoral (Pietrobono and Stecca, 2018).

O primeiro inibidor de SMO identificado foi a ciclopamina. Seus efeitos foram conhecidos na década de 60, quando ovelhas que se alimentavam da planta lírio de milho selvagem, geravam filhotes com apenas um olho (ciclopia). Posteriormente, entendeu-se que os efeitos da ciclopamina ocorriam devido a capacidade de se ligar e inibir SMO, *in vivo* e *in vitro* (Cooper *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002).

A ciclopamina é um alcaloide esteroidal isolado da planta *veratro liliaceae*, da família das liliáceas (*Veratrum californicum*), que inibe a sinalização da via através da ligação direta com as hélices transmembranas de SMO, impedindo a mudança conformacional necessária para ativar SMO (Chen *et al.*, 2002).

Dentre os inibidores de SMO, o GDC0449 (Vismodegib), um derivado da ciclopamina, foi o primeiro inibidor da via *SHH* a ser aprovado pelo *FDA* (*Food and Drug Administration*) em janeiro de 2012, para o tratamento de carcinoma

basocelular (Dlugosz *et al.*, 2012). A administração de GDC0449 resultou em regressão significativa de tumores em estágio avançado como o carcinoma basocelular (Molckovsky and Siu, 2008; Von Hoff *et al.*, 2009; Sekulic *et al.*, 2017) e o meduloblastoma (Rudin *et al.*, 2009). Apesar disso, alguns casos apresentaram resistência ao tratamento (Atwood *et al.*, 2012; Asklund *et al.*, 2013). Seu uso é indicado para o tratamento de carcinomas basocelular metastáticos, carcinomas basocelular localmente avançados com recorrência após a cirurgia, além de pacientes não elegíveis à cirurgia e à radioterapia (Zito and Scharf, 2019).

O GDC0449 é um inibidor seletivo que se liga na membrana heptahelical e inibe competitivamente SMO. A inibição desta molécula resulta em fatores de transcrição GLI1 e GLI2 inativos, evitando assim a expressão dos genes alvo da via do *SHH* (Belgioia *et al.*, 2019; Carpenter and Ray, 2019; Yan *et al.*, 2019).

A molécula está disponível em cápsulas de uso oral de 150 mg. É dosado em 150 mg, uma vez ao dia até a progressão da doença (Zito and Scharf, 2019). Os pacientes tratados relataram efeitos adversos como espasmos/caibras musculares, alopecia, disgeusia, perda de peso, fadiga, náuseas, perda de apetite e diarreia (Lacouture *et al.*, 2016). A maioria dos efeitos colaterais ocorrem já no início do tratamento, no entanto, a administração prolongada do inibidor não aumenta a frequência nem a gravidade dessas implicações (Basset-Seguin *et al.*, 2015; Sekulic *et al.*, 2017).

Outro inibidor de SMO é o LDE225 (Sonidegib). Trata-se de uma molécula seletiva de SMO, derivada da ciclopamina e estruturalmente distinta do GDC0449 (Burness, 2015). O LDE225 foi aprovado na Suíça, em 30 de junho de

2015 para o tratamento de carcinomas basocelular em estágio avançado. Em julho de 2015, o *FDA* aprovou seu uso nos EUA (Burness, 2015).

O LDE225 foi aprovado pela união europeia para pacientes adultos com carcinoma basocelular que não são passíveis de cirurgia curativa ou radioterapia (Burness, 2015). Nos Estados Unidos, sua administração é utilizada/recomendada para pacientes com carcinoma basocelular com recidiva após cirurgia ou radioterapia e aqueles não elegíveis para cirurgia ou radioterapia (Rodon *et al.*, 2014).

A dose recomendada do fármaco é de 200 mg, via oral, diariamente. O tratamento deve continuar enquanto houver benefício clínico ou até que se desenvolva toxicidade inaceitável. A interrupção temporária da dose e/ou redução pode ser necessária para o gerenciamento dos efeitos adversos (Rodon *et al.*, 2014) que podem se apresentar como náuseas, disgeusia, anorexia, vômitos, mialgias, espasmos musculares, fadiga, alopecia e aumento da creatina quinase sérica (*CK*) (Doan *et al.*, 2016).

A molécula de LDE225 liga-se em SMO e o inibe. Os efeitos anticâncer resultantes dessa inibição têm sido demonstrados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Heller *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013; Nanta *et al.*, 2013; D'Amato *et al.*, 2014). Dentre esses efeitos destacam-se, a diminuição da viabilidade celular e formações de colônias, a diminuição da atividade de GLI e indução do mecanismo de apoptose pela ativação de Caspase 3 (Fu *et al.*, 2013; Nanta *et al.*, 2013).

Como já explicado e exemplificado, os inibidores de SMO apresentam vários efeitos antitumorais promissores em diversos tipos de tumores, contudo, diferentes estudos relataram progressão da doença devido à aquisição de

resistência. Nesse sentido, foram propostos três mecanismos para explicar a resistência adquirida a esses inibidores e são eles, as mutações no *drug-binding pocket* (DBP), a ativação da cascata de sinalização de *SHH* jusante a SMO e a regulação positiva de mecanismos compensatórios não canônicos, responsáveis pela ativação de GLI (Pietrobono and Stecca, 2018). Em alguns casos, a resistência aos inibidores de SMO ocorre devido à amplificação de GLI2 durante o tratamento, ao aumento da regulação não canônica (Dijkgraaf *et al.*, 2011), como por aumento de PI3K (Buonamici *et al.*, 2010), RAS (Rajurkar *et al.*, 2012) e mTOR (Wang *et al.*, 2012) e a presença de mutações em SMO que comprometam a ligação do Vismodegib e do Sonidegib (Atwood *et al.*, 2015; Sharpe *et al.*, 2015).

1.4.2. Inibidores de GLI

Em 2007, um *screening* de pequenas moléculas inibidoras de GLI1 resultou na identificação de Gant58 e Gant61 como os primeiros antagonistas de GLI (Lauth *et al.*, 2007). A resistência aos inibidores de SMO por mutações adquiridas, ativando a via de sinalização do *SHH* jusante a SMO, apoia o uso de inibidores para bloquear a atividade dos fatores de transcrição GLI (Atwood *et al.*, 2015).

Gant58 e Gant61 são pequenas moléculas antagonistas a GLI que interferem na ligação dos fatores de transcrição GLI ao DNA. Esses inibidores bloqueiam a proliferação de células tumorais *in vitro* e suprimem o crescimento de células tumorais *in vivo*. No entanto, se comparados, Gant61 apresenta maior especificidade do que Gant58 no bloqueio da ligação dos GLIs ao DNA (Burness, 2015).

A eficácia dos inibidores de GLI (Gant61 e Gant58) tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* em carcinomas de bexiga (Mechlin *et al.*, 2010), cólon (Mazumdar *et al.*, 2011), pulmão (Huang *et al.*, 2014), neuroblastoma (Wickstrom *et al.*, 2013), ovário (Chen *et al.*, 2014) e osteossarcoma (Nagao-Kitamoto *et al.*, 2015).

Gant61 demonstrou atividade antitumoral específica para GLI em carcinoma pulmonar (Huang *et al.*, 2014), leucemia mieloide aguda (Latuske *et al.*, 2017), rabdmiossarcoma (Srivastava *et al.*, 2014), neuroblastoma (Wickstrom *et al.*, 2013), câncer de mama (Benvenuto *et al.*, 2016) e câncer de pâncreas (Lauth *et al.*, 2007).

Essas pequenas moléculas se ligam ao GLI1 e 2 entre os dedos de zinco 2 e 3. A presença de mutações nessas regiões resultam na inibição da ligação e consequente resistência ao tratamento (Agyeman *et al.*, 2014). O efeito antitumoral dos “Gants” é decorrente de sua ação sobre células tronco cancerígenas (diminuição de *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* e *cMYC*), ciclo celular (aumento de *p21* e diminuição de *CCND1*), apoptose (aumento da sinalização de *Fas* e diminuição de *Bcl-2*) e migração/transição epitélio mesenquima (aumento de E-Caderina e diminuição de *Snail*) (Gonnissen *et al.*, 2015).

1.5. Racional

No exposto, quanto a importância da via do *SHH* em diferentes tipos de tumores, não existem na literatura, estudos que avaliem o papel dos inibidores dessa via em LM e LMS uterinos.

A associação entre a ativação da via de sinalização do *SHH* e a descoberta de seus inibidores específicos, oferece uma oportunidade excelente para o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para os tumores mesenquimais uterinos. Assim, propusemo-nos a avaliar a aplicabilidade desses inibidores, *in vitro*, para o tratamento dessas neoplasias.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar, *in vitro*, a aplicabilidade de inibidores da via de sinalização do *Sonic hedgehog* para o tratamento de leiomiomas e leiomiossarcomas uterinos.

2.2. Específicos

- Avaliar a expressão gênica de *SHH*, *DHH*, *IHH*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, *GLI1-3*, *BMP4*, *BCL-2*, *CCND1*, *ABCG2*, *c-MYC*, *VEGF*, *P21*, *RAD51*, *TP53* e *FOXM* em linhagens celulares de miométrio, leiomioma e leiomiossarcoma uterinos;
- Avaliar a expressão proteica de SMO, SUFU, GLI1-3 nas mesmas linhagens;
- Avaliar o efeito do tratamento com inibidores de SMO (GDC0449 e LDE225) e GLI (Gant58, Gant61) nas linhagens;
- Avaliar o efeito do tratamento com inibidores de SMO e GLI na proliferação, migração, invasão e na morte celular por apoptose nas linhagens
- Analisar o efeito da inibição transiente (RNAi) de SMO nas células em cultura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESQ), sob o parecer 1.310.645 (Anexo) e é financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo: 2015-21068-8).

3.1. Reagentes e linhagens celulares

As células de leiomioma (LM) humano e de musculatura lisa do útero, miométrio (MM), foram imortalizadas e doadas pela Professora Darlene Dixon para o Professor Ayman Al-Hendy (Carney *et al.*, 2002). As células foram mantidas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* livre de *fenol red* com 10% de soro fetal bovino. As células de leiomiossarcoma uterino (LMS) (SK-UT1 HTB-114) foram adquiridas na empresa ATCC (*American Type Culture Collection*), cultivadas e mantidas em meio *Eagle's Minimum Essential Medium* com 10% de soro fetal bovino em esfufas à 37°C com 5% CO₂. Foram utilizadas até 6 passagens celulares para a realização dos experimentos. Os inibidores de SMO, LDE225 e GDC0449, foram adquiridos na empresa *Selleckchem*, e os inibidores de GLI, Gant58 e Gant61, na *Sigma Aldrich*.

3.2. Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi mensurada utilizando ensaios de *MTT* (*dimethylthiazoldiphenyltetra-zoliumbromide*). Para tanto, foram cultivadas 2.000 células por poço em placas para cultivo com 96 poços e os ensaios foram realizados em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). As células foram plaqueadas em triplicata e a média foi utilizada para a apresentação dos resultados. O volume de 100 μ L contendo 0,5 mg/mL de *MTT* reagente em *PBS* (*Phosphate-buffered saline*) foi adicionado em cada poço e encubado a 37°C por 4 horas. Em seguida, a solução foi removida e um total de 100 μ L de *DMSO* (dimetilsulfóido) foi adicionado em cada poço. A absorbância do produto final foi medida utilizando o leitor de placas, *BioTek (Broadview)*, em 570 nm. Foram realizadas três réplicas experimentais.

3.3. Tratamento celular com os inibidores da via do *Hedgehog*

Um total de 8×10^4 células de LMS foram cultivadas em placas de 6 poços durante 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com os inibidores de SMO (LDE225 - 10 μ M) e GLI (Gant61 - 30 μ M), diariamente, por 72 horas. As células foram tripsinizadas e o precipitado celular formado foi utilizado para avaliar as expressões gênica e proteica.

3.4. Extração de RNA e Expressão Gênica

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) e todas as amostras foram tratadas com DNase (Qiagen) para a eliminação do DNA genômico. A concentração do RNA total foi determinada utilizando espectrofotômetro do tipo *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi preparada a partir de 1 µg do RNA total de cada amostra, utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) conforme especificações do fabricante.

A análise da expressão dos genes da via do *Sonic hedgehog* (*SHH*) foi realizada aplicando o sistema de detecção *SYBR Green*. Os iniciadores (*primers*) utilizados estão listados na Tabela 5. As sequências foram confirmadas pelo programa *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

As reações de *q-PCR* (*quantitative polymerase chain reaction*) foram feitas utilizando 2 µg de cDNA de cada amostra, 0,038 pmol de cada *primer* e 7,5 µL do reagente *SYBR green supermix* (Rio-Rad). A ciclagem realizada foi, 95°C/2min, 95°C/5seg, 60°C/30seg e 95°C/5seg por 40 ciclos, seguido pela curva de dissociação, 65°C/5seg +0,5°C para cada ciclo no total de 60 ciclos. A leitura foi realizada em aparelho *CFT96 Touch Real-Time PCT Detection System* (Bio-Rad). Os genes *B2M*, *GAPDH*, *18S* e β -actina foram testados e o gene *B2M* foi selecionado como controle interno das reações. A escolha sucedeu utilizando o programa *NormFinder*. A quantificação dos transcritos foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 5: Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Gene	Sequência Sense (<i>Forward</i>)	Sequência Anti-Sense (<i>Reverse</i>)	Tamanho do fragmento
<i>SHH</i>	TGCTGCTAGTCCTCGTCTCCT	TTTTGGGGTGCCTCCTCTT	90
<i>DHH</i>	TGATGACCGAGCGTTGTAAG	GCCAGCAACCCATACTTG T	196
<i>IHH</i>	CATTGAGACTTGACTGGGCAAC	AGAGCAGGCTGAGTTGGG AGTCGC	152
<i>PTCH</i>	GAGCAGATTTCCAAGGGGAAGG	ATGAGGAGGCCCAACAACC AA	137
<i>SMO</i>	TGAAGGCTGCACGAATGAGG	CTTGGGGTTGTCTGTCCG AA	88
<i>SUFU</i>	CAGCAAACCTGTCCTTCCACCA	CAGATGTACGCTCTCAAG CTGC	157
<i>GLI1</i>	AGCCTTCAGCAATGCCAGTGAC	GTCAGGACC ATGCACTGTCTTG	151
<i>GLI2</i>	CTGTGGGTTAGGGATGGACTG	GTAAAGTGGGTGGACGTT GCA	147
<i>GLI3</i>	GTGCTCCACTCGAACAGA	TCCAGGACTTTCATCCTCA TTAGA	76
<i>BCL-2</i>	TGTGTGTGGAGAGCGTCAAC	GCCAGAGAAATCAAACAG AGG	173
<i>CCND1</i>	CTTCAAATGTGTGCAGAAGG	CTCGCACTTCTGTTCTCTC	91
<i>BMP4</i>	CGTAGCCCTAAGCATCACTCAC A	GCGCCGGCAGTTCTTATT CT	57
<i>ABCG2</i>	CTGAGATCCTGAGCCTTTGG	TGCCCATCACAACATCATC T	461
<i>c-MYC</i>	AATGAAAAGGCCCCCAAGGTAG TTATCC	GTCGTTTCCGCAACAAGT CCTCTTC	112
<i>VEGF</i>	CTACCTCCACCATGCCAAGT	GCAGTAGCTGCGCTGATA GA	109
<i>P21</i>	CCCTTGTCCTTTCCCTTCAGTAC	GTGGGACAGGCACCTCAG A	61
<i>RAD51</i>	AAAGGAAGAGGGGAAACCAG	ATCTCCCACTCCATCTGCA T	99
<i>TP53</i>	TGTAGTGGATGGTGGTACAG	CGTGTGGAGTATTTGGAT GAC	100
<i>FoxM1</i>	GGGCGCACGGCGGAAGATGAA	CCACTCTTCCAAGGGAGG GCTC	379
<i>B2M</i>	CAGCCCAAGATAGTTAAGTG	ACAAGCTTTGAGTGCAAG AG	358

3.5. Extração de proteínas e reação de *Western Blot*

Devido às diferentes localizações das proteínas nas células, foram utilizados protocolos variados para o isolamento das proteínas totais, citoplasmáticas e nucleares.

As células foram coletadas e as proteínas totais foram extraídas utilizando o tampão RIPA (Thermo Scientific), com coquetel de inibidor de protease (Thermo Scientific). Já as proteínas citoplasmáticas e nucleares foram isoladas aplicando o *Ne-Per Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* (Thermo Scientific). O reagente de *Bradford* (Bio-Rad kit) foi utilizado para quantificar as proteínas.

Posteriormente, foram separadas 30 µg de proteínas em géis de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (*SDS-PAGE*), conforme descrito por *Laemmli* (Laemmli, 1970). Ao final das corridas, as moléculas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (*PVDF*) (Bio-Rad). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi obtido com leite desnatado a 5% (Molico) em *PBS* 1X, contendo 0,1% *Tween 20*. Em seguida foi realizada a incubação com os anticorpos primários específicos (Tabela 6), por 16 horas a 4°C. Após esta e entre todas as etapas seguintes, foram realizadas 3 lavagens com *PBS* 1X contendo 0,1% *Tween 20*. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram incubados com as membranas por 2 horas em temperatura ambiente. A detecção foi feita por quimioluminescência utilizando o reagente *SuperSignal Femto* (GeneTex) em equipamento *ChemiDoc XRS* (Bio Rad).

A intensidade apresentada pelas bandas referentes à presença das proteínas foi quantificada aplicando o programa de computador *Image J* (Heidebrecht et al., 2009) e a normalização dos dados foi obtida utilizando a proteína β -Actina.

Tabela 6: Condições padronizadas para cada anticorpo utilizado nas reações de *Western Blot*.

Alvo	Marca	Fonte	Diluição
SMO	GeneTex	Coelho, policlonal	1:500
SUFU	Cell Signaling	Coelho, monoclonal	1:1000
GLI1	Cell Signaling	Coelho, monoclonal	1:1000
GLI2	BioRad	Coelho, monoclonal	1:1000
GLI3	GeneTex	Coelho, policlonal	1:1000
PCNA	Santa Cruz	Coelho, policlonal	1:1000
PARP	Santa Cruz	Coelho, policlonal	1:1000
RHOGDI	Santa Cruz	Coelho, policlonal	1:1000
β-ACTINA	Sigma Aldrich	Camundongo, monoclonal	1:5000

3.6. Ensaio de Migração Celular

Foram cultivadas 5×10^5 células de LMS em placas de 24 poços. Após confluência total, foi feito um risco (ensaio de *Scratch*) com uma ponteira de 200 µL (Liang *et al.*, 2007) sobre a superfície da monocamada. Para o cultivo das células, especificamente neste ensaio, foram utilizados meios para cultivo sem a adição de soro fetal bovino (afim de descartar o efeito da proliferação celular). Fotos foram tiradas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas em microscópio óptico. Posteriormente, as áreas correspondentes ao risco foram avaliadas com o auxílio do programa *Image J*. A seleção das áreas foi realizada de modo manual e os ensaios executados em quadruplicata. Foram feitas duas réplicas experimentais.

3.7. Ensaio de Invasão Celular

A capacidade de invasão das células foi avaliada utilizando insertos contendo reagente *Matrigel* (*BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber*, *BD Biosciences*) de acordo com as instruções do fabricante. A cada 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas e um total de $2,5 \times 10^4$ células foram semeadas em insertos por 24 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, as células que atravessaram o filtro foram fixadas com paraformaldeído a 4%, coradas com Giemsa e analisadas por microscopia de luz (Nakamura *et al.*, 2012). Posteriormente, as membranas foram fotografadas em 5 diferentes campos e as imagens, avaliadas com o auxílio do programa *Image J*. Foram realizadas três réplicas experimentais.

3.8. Ensaio de Apoptose

A porcentagem de células apoptóticas foi determinada utilizando marcação da Anexina V (*APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD*, *BioLegend*) seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 80 mil células de LMS foram semeadas em placas de 6 poços. As células foram tratadas por 72 horas com os inibidores de SMO e GLI. A Estaurosporina foi utilizada como controle positivo para morte celular e a marcação da Anexina V foi avaliada por citometria de fluxo (*Beckman Coulter Gallios*).

3.9. Silenciamento do gene *SMO*

Para os ensaios de transfecção foram cultivadas 5×10^3 células de LMS em placas de 6 poços. O reagente *Lipofectamina RNAiMAX* (Life Technologies) foi utilizado para inserir o RNA de interferência de *SMO* (*esiRNA*, Sigma Aldrich) para o interior das células. As expressões do gene e da proteína de interesse foram avaliadas após 72 horas de incubação com o inserto, conforme as instruções do fabricante.

3.10. Análise Estatística

Após agrupamento dos dados, a homogeneidade de cada grupo de tratamento para cada resultado específico foi avaliada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Os resultados foram analisados através do teste de variância ANOVA ou *Kruskal-Wallis* dependendo da distribuição dos dados, e complementado com o teste *post-hoc* de *Tukey-Kramer* ou *Dunn*. Em todos os testes foi fixado em 0,05 ($p \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade. As análises foram efetuadas com o auxílio do programa *Graph Pad Prism 5*.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

Inicialmente, foram avaliadas as expressões basais dos componentes da via de sinalização do *SHH* em culturas celulares de miométrio (MM), leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS). Não foi detectada expressão gênica dos ligantes da via (*SHH*, *IHH* e *DHH*) em nenhuma das linhagens avaliadas. Por outro lado, *SMO* ($RQ=12,22$), *SUFU* ($RQ=2,36$), e *GLI1* ($RQ=3,19$) apresentaram-se mais expressos em LMS quando comparado ao MM ($p<0,05$) e ao LM. O *PTCH1* ($RQ=0,12$) foi menos expresso em LM, *GLI2* não apresentou diferença de expressão entre as linhagens avaliadas, enquanto que *GLI3* ($RQ=4,77$) foi mais expresso em LM se comparado ao MM e ao LMS (Figura 5A).

Os dados da expressão proteica desses marcadores mostraram *SMO* e *GLI1* hiperexpressos nas células de LMS em comparação com MM e LM. As proteínas *GLI2* e *GLI3* foram mais expressas nos LMs, enquanto que *SUFU* não apresentou diferença de expressão entre as linhagens (Figura 5B e C).

Quanto à localização celular dos fatores de transcrição *GLI1*, *GLI2* e *GLI3*, foi observado que *GLI1* e *GLI2* foram mais expressos no núcleo de todas as linhagens celulares, porém com maior intensidade nas células de LMS. Por outro lado, *GLI3* foi mais expresso no núcleo somente nas células de MM e LM, enquanto que para o LMS, a expressão foi maior no citoplasma (Figura 5D).

Os resultados apresentados indicam que a via do *SHH* está ativa nos LMS devido ao aumento da expressão de *SMO* e *GLI1*, com maior expressão nuclear de *GLI1* e *GLI2*.

Figura 5: Expressão basal dos componentes da via de sinalização do *Sonic hedgehog* nas células de MM, LM e LMS. **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de MM como referência; **B.** Expressão proteica dos marcadores *Western Blot*, utilizando β -Actina como controle positivo; **C:** Quantificação da expressão proteica, considerando como proteína endógena, β -Actina. **D:** Expressão nuclear dos fatores de transcrição GLI nas células. As proteínas RhoGDI e PARP foram utilizadas como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. Os asteriscos indicam significância estatística e as linhas pontilhadas, o valor da expressão da amostra referência (MM=1).

Posteriormente, foi realizada uma extensa revisão da literatura com o intuito de selecionar os genes alvo da via do *SHH*. A seleção foi baseada em genes previamente descritos como alvo em diferentes tipos tumorais (Tabela 3), para que desse modo, pudéssemos avaliá-los em células de LMS, comparando os resultados com as células de MM.

Os resultados mostraram que as expressões dos genes *BCL-2* ($RQ=2,70$), *C-MYC* ($RQ=6,97$), *RAD51* ($RQ=2,09$), *TP53* ($RQ=1,94$) e *FoXM1* ($RQ=2,68$) foram maiores, enquanto que *P21* ($RQ=0,01$) se mostrou menos expresso nas células de LMS se comparados ao MM ($p<0,05$). Por outro lado, *ABCG2*, *BMP4*, *CCND1* e *VEGF* não apresentaram diferença na regulação quando as duas linhagens celulares foram comparadas (Figura 6). Desse modo, os genes *BCL-2*, *C-MYC*, *RAD51*, *TP53*, *FoXM1* e *P21* foram selecionados para futuras análises como possíveis genes alvo da via do *SHH* em LMS.

Figura 6: Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de MM e LMS. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de MM como amostra referência. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra referência ($MM=1$) e os asteriscos indicam significância estatística.

Na sequência, os inibidores de SMO (LDE225 e GDC0449) e GLI (Gant58 e Gant61) foram selecionados para testes em células de LMS. Ensaio de proliferação, utilizando esses inibidores, foram realizados aplicando diferentes concentrações em três tempos variados (24, 48 e 72 horas) (Figuras 7 e 8).

O LDE225, inibidor de SMO, após 72 horas de tratamento, apresentou efeito inibitório dose-dependente na proliferação celular. Nesse caso, 10 μ M foi a dosagem indicada para os experimentos seguintes (Figura 7A). Por outro lado, as células de LMS tratadas com GDC0449, também inibidor de SMO, mesmo após 72 horas de tratamento, não sofreram efeito na proliferação (Figura 7B).

O Gant61, inibidor de GLI, apresentou efeito inibitório na proliferação celular após 72 horas de tratamento, sendo 30 μ M a dose selecionada para a realização dos experimentos subsequentes (Figura 8A). No entanto, Gant58, também inibidor de GLI, não apresentou efeito na proliferação das células (Figura 8B).

As células de LM apresentaram aumento da expressão gênica de *SMO* e *GLI2*. Devido a este fato, os fármacos LDE225 e Gant61 foram utilizados para verificar o efeito do tratamento na proliferação celular das células de LM. Além disso, ensaios de proliferação também foram realizados nas células de MM para avaliar o efeito do tratamento no que se refere ao tecido normal adjacente. Os ensaios de proliferação foram executados mantendo as mesmas condições de dose e tempo utilizadas para as células de LMS (Figuras 9 e 10).

Figura 7: Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LMS antes (controle) e depois do tratamento com diferentes doses dos inibidores de SMO (LDE225 e GDC0449) nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** GDC0449.

Os resultados obtidos para as células de MM indicaram que o tratamento com LDE225 não inibiu a proliferação celular de modo significativo quando utilizamos a mesma dose do tratamento dos LMS (10 μ M) (Figura 9A). Por outro lado, o Gant61 apresentou efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) utilizando a mesma dose aplicada para o LMS (30 μ M), mesmo que a intensidade inibitória observada em MM tenha sido reduzida se comparada ao LMS (Figura 9B).

Quando testadas, as células de LM não apresentaram proliferação inibida (Figuras 10A e B).

Figura 8: Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LMS antes (controle) e depois do tratamento com diferentes doses dos inibidores de GLI (Gant61 e Gant58) nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** Gant61 e **B.** Gant58.

Figura 9: Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de MM utilizando LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1) em diferentes doses, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** Gant61.

Em conjunto, esses resultados revelaram que os inibidores da via de sinalização do *SHH* tiveram efeito significativo para as células de LMS, não afetando a proliferação celular em LM. Por consequência, os experimentos seguintes foram realizados utilizando somente a linhagem de LMS.

Figura 10: Gráficos comparativos dos perfis de proliferação das células de LM utilizando LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1) em diferentes doses, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento. Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. **A.** LDE225; **B.** Gant61.

Logo, as células de LMS foram tratadas com 10 μ M de LDE225 por 72 horas, repondo o fármaco a cada 24 horas. Foram avaliadas as expressões gênica e proteica dos componentes da via do *SHH* em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). A expressão gênica mostrou que *SMO*, *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* foram hiporegulados somente após 72 horas de tratamento ($p < 0,05$), não apresentando diferença da regulação nos demais tempos avaliados (Figura 11A). As análises

proteicas apresentaram diminuição tempo-dependente das proteínas SMO, GLI1, GLI2 e GLI3 nessas células (Figura 11B e C).

As localizações citoplasmática ou nuclear dos fatores de transcrição GLIs foram avaliadas em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) para verificar se a utilização dos inibidores seria capaz de diminuir a expressão dos fatores de transcrição GLIs no núcleo das células de LMS. Em resposta ao tratamento com LDE225, os fatores de transcrição GLI1, GLI2 e GLI3 apresentaram diminuição da expressão nuclear em todos os tempos avaliados (Figura 11D).

Também foi explorado o efeito desses inibidores na expressão gênica dos possíveis genes alvo da via do *SHH*. Durante o tratamento com LDE225, foi observado que os genes *C-MYC* e *P21* sofreram hiper-regulação, enquanto *RAD51*, *TP53* e *FoxM1*, hipo-regulação. Por outro lado, *BCL-2* não apresentou diferença (Figura 12).

O tratamento com o inibidor LDE225 mostrou-se eficiente no bloqueio da via de sinalização do *SHH* em células de LMS. O efeito se deu por meio da redução da expressão de SMO e da translocação nuclear de GLI1, GLI2 e GLI3. Porém, dentre todos os genes alvo verificados, somente o *P21* apresentou mudança do perfil de expressão (hiperexpresso em LMS quando tratado com LDE225).

Em relação à resposta ao tratamento com Gant61, nenhum dos componentes da via apresentou diferença na regulação gênica (Figura 13A). Por outro lado, as análises por *Western Blot* mostraram diminuição da expressão de GLI1, GLI2 e GLI3 quando comparadas ao controle não tratado (Figura 13B e C). Quando avaliamos a localização dos fatores de transcrição GLIs após o tratamento, observamos GLI1, GLI2 e GLI3 com menor expressão nuclear, em relação às células controle (Figura 13D).

Figura 11: Perfis das expressões gênica e proteica dos componentes da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com LDE225 (inibidor de SMO). **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência; **B.** Expressão proteica dos marcadores por *Western Blot* utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Quantificação da expressão proteica considerando como proteína endógena, β -Actina. **D.** Expressão nuclear dos fatores de transcrição GLI nas células. As proteínas RhoGDI e PARP foram utilizados como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra referência (controle =1).

Figura 12: Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com LDE225 (inibidor de SMO). Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência. Os asteriscos indicam significância estatística e a linha pontilhada, o valor da expressão da amostra referência (controle = 1).

Ainda em resposta ao tratamento com Gant61, o gene *FoxM1* apresentou diminuição da expressão, já *P21* e *c-MYC* foram mais expressos com o tratamento. No entanto, *BCL-2*, *RAD51* e *TP23* não indicaram diferença de expressão se comparados ao controle (Figura 14).

Figura 13: Perfis das expressões gênica e proteica dos componentes da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Gant61 (inibidor de GLI1). **A.** Gráfico da expressão gênica dos componentes da via. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência; **B.** Expressão proteica dos marcadores por *Western Blot* utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Quantificação da expressão proteica considerando como proteína endógena β -Actina. **D.** Expressão nuclear dos fatores de transcrição GLI nas células. As proteínas RhoGDI e PARP foram utilizados como controles de expressão citoplasmática e nuclear, respectivamente. A linha pontilhada indica o valor da expressão da amostra referência (controle = 1).

Figura 14: Perfil da expressão gênica dos alvos da via do *SHH* em células de LMS após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Gant61 (inibidor de GLI1). Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS sem tratamento (controle) como referência. Os asteriscos indicam significância estatística e a linha pontilhada, o valor da expressão da amostra referência (controle = 1).

Para avaliar a importância do papel exercido pela via de sinalização do *SHH* na proliferação das células de LMS, foram realizados tratamentos com os inibidores LDE225 e Gant61 por 72 horas. As Figuras 15A e B mostram que houve diminuição na capacidade de proliferação celular durante o tratamento com o inibidor de SMO (LDE225). A expressão de PCNA foi mensurada e utilizada como marcador de proliferação. O tratamento com o inibidor de SMO (LDE225) resultou na diminuição da expressão de PCNA quando os grupos, tratamento e controle foram comparados, enquanto que o tratamento com o

inibidor de GLI (Gant61) não apresentou diferença de expressão (Figuras 15C e D).

Figura 15: Perfil de proliferação das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). **A.** Análise quantitativa do perfil de proliferação das células de LMS durante o tratamento com LDE225; **B.** Expressão da proteína PCNA, avaliada por *Western Blot* durante o tratamento com LDE225, utilizando β-Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Análise quantitativa do perfil de proliferação das células de LMS durante o tratamento com Gant61; **D.** Expressão da proteína PCNA, avaliada por *Western Blot* durante o tratamento com Gant61, utilizando β-Actina como controle positivo/normalizador.

Os efeitos na migração celular exercidos pelos inibidores em células de LMS também foram avaliados (Figura 16). Os resultados revelaram que tanto o inibidor de SMO, quanto o de GLI, induziu significativa redução da capacidade de migração das células nos tempos avaliados (24, 48 e 72 horas) (Figura 16).

Os ensaios de invasão foram realizados com o objetivo de verificar se o tratamento com os inibidores afetaria o comportamento de invasão das células de LMS. Para isso, as células foram tratadas com LDE225 e Gant61 em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Os resultados das análises quantitativas

mostraram significativa diminuição do número de células que atravessaram a membrana após 72 horas de tratamento com o inibidor de SMO ($p < 0,05$) ou de GLI ($p < 0,001$) (Figura 17B). Não foram observadas diferenças nos tratamentos que duraram 24 e 48 horas (Figura 17B).

Com o propósito de esclarecer se os tratamentos com os inibidores interfeririam no mecanismo de morte celular por apoptose nas células de LMS, foram realizados ensaios de apoptose por Anexina V. Como controle positivo para morte celular foi utilizado o fármaco Estaurosporina. Os resultados mostraram que os índices de células de LMS apoptóticas foram elevadas tanto no tratamento com o LDE225, quanto com o Gant61 (Figuras 18A), no entanto, ressalta-se que o inibidor Gant61 apresentou maior taxa de células apoptóticas se comparado ao LDE225 (Figura 18A).

Figura 16: Perfil de migração das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). As fotomicrografias representam as células no momento inicial do ensaio (0h) e 72 horas após o início. **A.** Controle (LMS não tratado); **B.** Gant61 e **C.** LDE225. A área pontilhada foi mensurada com auxílio do programa *Image J*. O gráfico apresenta os cálculos da área migrada pelas células de LMS, em porcentagem, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram plotados no gráfico como média das réplicas experimentais e os asteriscos indicam significância estatística.

Figura 17: Perfil de invasão das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). **A.** As fotomicrografias representam as células de LMS viáveis, tratadas (LDE225 ou Gant61) ou não (controle), que atravessaram a membrana nos tempos de 24, 48 e 72 horas; **B.** Análise quantitativa do perfil de invasão celular, em porcentagem, baseada nas fotomicrografias e mensurada com auxílio do programa *Image J*. Os asteriscos indicam significância estatística.

Figura 18: Perfil de morte celular por apoptose das células de LMS tratadas com LDE225 (inibidor de SMO) ou Gant61 (inibidor de GLI1). Como controle positivo para células apoptóticas foi utilizado o fármaco Estaurosporina. **A.** Representação gráfica do programa para detecção de células apoptóticas das células de LMS tratadas (LDE225 ou Gant61) ou não (controle); **B.** Análise quantitativa do ensaio de apoptose por Anexina V referente ao LMS sem tratamento (não tratado), LMS tratado com Estaurosporina (controle positivo), LDE225 ou Gant61 referente a morte por apoptose em estágio precoce ou tardio.

Após serem testados isoladamente, o efeito sinérgico dos inibidores de SMO e GLI também foi avaliado. Para isso, ensaios de proliferação foram realizados utilizando diferentes combinações das doses dos inibidores. Os resultados mostraram que não houve efeito sinérgico entre os fármacos (Figura 19).

Figura 19: Perfil de proliferação das células de LMS tratadas com diferentes combinações (dose e fármaco) dos inibidores LDE225 e Gant61 após 72 horas. Para comparação foram utilizadas as células de LMS sem tratamento (controle). Presença do tratamento (+); Ausência do tratamento (-).

De modo geral, os resultados obtidos com os tratamentos utilizando os inibidores de SMO e GLI apresentaram efeito significativo nos comportamentos proliferativo, migratório e invasivo das células de LMS. Além disso, ambos foram capazes de induzir, nessas células, morte por apoptose.

Posteriormente, foi realizado o silenciamento do gene *SMO*, com a finalidade de identificar/verificar a possibilidade de alvos inespecíficos no tratamento com fármacos e identificação de genes alvo da via nas células de LMS. Deste modo, foram feitos ensaios para o silenciamento (*knockdown*) do gene *SMO* nas células de LMS pela técnica de RNA interferente (RNAi). A Figura 20A demonstra que houve diminuição significativa da expressão gênica de *SMO*, *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* ($p < 0,05$) nessas células. Para confirmar a eficiência do protocolo de silenciamento, avaliamos a expressão da proteína SMO nas células de LMS, que demonstraram a diminuição na sua expressão (Figura 20B). Os genes previamente selecionados como prováveis alvos da via do *SHH* também foram avaliados, mas somente o *FoxM1* apresentou hipo-regulação após o silenciamento de *SMO* ($p < 0,05$) (Figura 20C).

Figura 20: Silenciamento (*knockdown*) do gene *SMO* em células de LMS após 72 de transfecção. **A.** Perfil de expressão gênica dos componentes da via do *SHH*. Os valores foram obtidos pelo método *DDCT*, considerando *B2M* como gene endógeno e as células de LMS não transfectadas com RNAi como referência (controle); **B.** Expressão proteica de *SMO* por *Western Blot*, utilizando β -Actina como controle positivo/normalizador; **C.** Perfil da expressão gênica dos genes alvo da via do *SHH* em células de LMS transfectadas (*KD-SMO*) ou não (controle). Os resultados foram plotados nos gráficos como média das réplicas experimentais. Os asteriscos indicam significância estatística.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Embora a importância da ativação da via de sinalização do *SHH* na patogênese do LMS ainda seja desconhecida, achados anteriores do nosso grupo (Garcia *et al.*, 2016; Garcia N, 2015) foram promissores, sugerindo a ativação da via do *SHH* nos LMS uterinos. Desse modo, mostrou-se relevante a realização de um estudo experimental utilizando fármacos antagonistas às proteínas ativadoras da via como potenciais alvos terapêuticos.

SMO e GLI foram selecionados e avaliados como alvos terapêuticos para LM e LMS com base nos resultados obtidos em nosso estudo anterior, uma vez que esse apresentou aumento da expressão proteica de SMO e GLI1 em amostras de LMS. Além disso, o aumento da expressão das proteínas SHH e SUFU foram associadas a uma menor sobrevida das pacientes (Garcia *et al.*, 2016).

No presente estudo, a expressão basal dos componentes da via do *SHH* foi avaliada em linhagens celulares de MM, LM e LMS para compreender se o modelo proposto corrobora os resultados encontrados anteriormente no estudo realizado em amostras de pacientes (Garcia *et al.*, 2016). A avaliação gênica basal das linhagens celulares resultou na ausência da expressão dos ligantes da via (*IHH*, *DHH* e *SHH*) e em um aumento da expressão de SMO e GLI. Além disso, nosso estudo viabilizou melhorias na compreensão dos mecanismos de ativação da via do *SHH* em LMS, bem como na influência de fármacos aprovados pelo *FDA*, em processos importantes para a manutenção celular e tumorigênese incluindo, proliferação, migração, invasão e apoptose nesses tumores.

Os fármacos, LDE225 e Gant61, inibidores de SMO e GLI, respectivamente, foram capazes de bloquear a atividade dessas proteínas somente nas células de LMS. O tratamento com LDE225 mostrou-se mais eficiente em diminuir a expressão dos fatores de transcrição GLI nucleares quando comparado ao tratamento com Gant61. No entanto, ambos foram efetivos no bloqueio da proliferação das células de LMS.

Os fármacos que foram capazes de bloquear a atividade dessas proteínas em LMS, também foram testados em células de LM, porém não apresentaram resultados significativos, apesar do aumento da expressão gênica de *SMO* e *GLI1* nas células de LM em comparação com o MM. Sabe-se que a ativação da via de sinalização do *SHH* é pouco encontrada em tumores benignos, e até o momento não há registros de ensaios clínicos em andamento para o uso de inibidores da via do *SHH* nesses tumores.

Estudo anterior realizado pelo grupo, mostrou que pacientes com LM tiveram associação da expressão proteica de SHH com o não uso de contraceptivo oral, o aumento de GLI1 com status menopausal e o aumento GLI2 e GLI3 com história de aborto espontâneo (Garcia *et al.*, 2016; Garcia N, 2015).

Como mencionado anteriormente, a literatura apresenta poucos trabalhos que associam a ativação da via nos tumores benignos. Em cinco casos de fibromixoma plexiforme gástrico avaliados quanto ao perfil de mutações, por sequenciamento de nova geração, mostrou que somente dois casos apresentaram deleção mono-alélica dos exons 15-24 do gene *PTCH1* (Banerjee *et al.*, 2019). Já em hemangioma hepático, notou-se a ativação da via do *SHH* pelo aumento da expressão dos genes *SHH* e *GLI2* (Wendling-Keim *et al.*, 2019).

Em relação aos nossos resultados obtidos para o LMS, esses foram similares a trabalhos apresentados pela literatura, descritos em outros tipos tumorais malignos. Por exemplo, em carcinoma renal, células que foram tratadas com LDE225, assim como em nosso estudo, apresentaram diminuição dose-dependente da expressão de GLI1 e GLI2, além da diminuição na capacidade proliferativa (D'Amato *et al.*, 2014).

No geral, GLI1 é considerado biomarcador para a identificação da ativação da via de sinalização do *SHH*. Em melanomas, GLI1 está mais expresso e nesse caso, o uso do LDE225 em forma de tratamento foi capaz de inibir a ativação da via do *SHH*, além de diminuir o crescimento e a viabilidade celular (Jalili *et al.*, 2013).

Nossos experimentos utilizando LDE225 em células de LMS, apresentaram efetividade no bloqueio da via de sinalização do *SHH* com maior eficiência após 72 horas de tratamento se comparado aos outros tempos avaliados (24 e 48 horas). Casos de leucemia mielóide crônica tratados com LDE225, corroboram nossos resultados, uma vez que mostraram maior eficácia também após 72 horas de tratamento, com significativa redução na expressão de GLI1. Nesses casos, o tratamento em 6 e 24 horas não identificou diferença na expressão dessa proteína (Irvine *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, a utilização de Gant61 como tratamento nas células de LMS resultou em diferenças nas expressões das proteínas GLI1, GLI2 e GLI3, além da diminuição da proliferação celular. Tong e colaboradores 2018 mostraram que células de câncer de próstata expressam, de modo basal, SMO, PTCH1, GLI1, GLI2 e SHH, mas que o tratamento com o inibidor de GLI (Gant61) também diminuiu a expressão dos componentes da via do *SHH*, antes

hiperexpressos, além de ter induzido a diminuição da proliferação, de maneira dose-dependente (Tong *et al.*, 2018). O uso de Gant61 também foi avaliado em linhagens celulares de câncer de mama (Benvenuto *et al.*, 2016). Nesse estudo, o tratamento para bloquear a ativação de GLI1 mostrou-se eficaz, diminuindo o crescimento celular de modo dose e tempo-dependentes, reduzindo a expressão gênica de *GLI1* e *PTCH1* e inibindo a translocação nuclear de *GLI1* (Benvenuto *et al.*, 2016).

O LMS uterino apresenta altas taxas de recidiva e metástase (Cui *et al.*, 2017). Diante disso, a avaliação dos efeitos do uso dos inibidores de SMO e GLI em processos de migração e invasão celular são de extrema importância, uma vez que esses mecanismos estão diretamente envolvidos com metástase e progressão tumoral em pacientes. Referente a isso, nossos resultados mostraram que tanto o LDE225, quanto o Gant61, apresentaram capacidade inibitória dos processos de migração e invasão de células de LMS. Esses efeitos já foram reportados por outros estudos (Mechlin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014; D'Amato *et al.*, 2014; Habib and O'Shaughnessy, 2016). A exemplo disso, inibidores da via do *SHH* têm sido utilizados em células de câncer de próstata. O tratamento dessas células com Gant61 mostrou eficiência inibitória no processo de migração, além de induzir a hipo-expressão das proteínas GLI1 e GLI2 (Nanta *et al.*, 2019), enquanto que, o uso de LDE225 diminuiu os potenciais de migração e invasão (Nanta *et al.*, 2013).

As capacidades de migração e invasão também foram diminuídas com o uso de Gant61, inibindo a atividade de GLI1 em células de ovário (Liu *et al.*, 2018). Em células de glioblastoma, esse tratamento além de diminuir a expressão dos componentes da via do *SHH*, apresentou efeito significativo na inibição da

migração dessas células, quando tratadas por 24 e 48 horas (Sun *et al.*, 2019). Já em gliomas, Gant61 além de afetar a viabilidade celular de modo dose-dependente e regular negativamente as expressões gênica e proteica de GLI1 e GLI2, também diminuiu a capacidade de invasão dessas células (Li *et al.*, 2016a).

Utilizamos a proteína Anexina V como marcador para detectar a presença de células apoptóticas após os tratamentos com os inibidores de SMO e GLI em células de LMS. Os resultados revelaram um aumento nos níveis de células apoptóticas após os tratamentos com ambos inibidores. No entanto, em nossos experimentos, Gant61 apresentou maiores taxas de células de LMS apoptóticas se comparado ao LDE225.

Gant61 e LDE225 são bem descritos na literatura como indutores de apoptose. Esse efeito já foi relatado em câncer pancreático, no qual o tratamento com Gant61 além de induzir apoptose, reduziu as expressões gênica e proteica de GLI1 (Ghanbari *et al.*, 2019). Em câncer de próstata, esse tratamento induziu apoptose já nas primeiras 24 horas, mas o efeito mais potente ocorreu quando realizado durante 72 horas (Tong *et al.*, 2018). Já a aplicação de LDE225 para o tratamento de células de melanoma, além de aumentar a porcentagem de células apoptóticas, inibiu a proliferação celular e a expressão dos componentes da via do *SHH* (O'Reilly *et al.*, 2013). Jalili *et al.*, 2013 e Irvine *et al.*, 2016, complementaram relatando que o tratamento das células de melanoma com o LDE225, também diminui a viabilidade celular (Jalili *et al.*, 2013). Por outro lado, quando avaliados os efeitos do tratamento utilizando o LDE225 em células de leucemia mielóide crônica, não se observou indução da apoptose (Irvine *et al.*, 2016).

Os genes *ABCG2*, *BCL-2*, *BMP4*, *CCND1*, *C-MYC*, *VEGF*, *P21*, *RAD51*, *TP53* e *FoxM1* já foram descritos como genes alvo da via do *SHH* em outros tipos de tumores, e por conta disso foram selecionados para avaliação pós-tratamento nas células utilizadas nesse estudo. Embora tenhamos baseado nossa proposição nos dados da literatura, os resultados obtidos não permitiram a identificação deles como genes alvo da via em LMS.

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a eficácia dos inibidores de SMO e GLI em células de LMS. A inativação da via do *SHH* em células de LMS inibiu proliferação, migração e invasão, e ativou morte celular por apoptose, processos importantes para as células. Consequentemente, o que observamos foi o bloqueio do comportamento agressivo das células tratadas. O uso desses inibidores tem sido amplamente explorado *in vivo* em outros tipos de cânceres.

Em modelo animal de glioblastoma, o tratamento com LDE225 foi capaz de diminuir o peso tumoral, além de inibir a expressão de GLI1, GLI2, PTCH1 e SMO, e dos alvos da via *CCND1* e *BCL-2* (Sun *et al.*, 2019). Em animais com câncer de próstata, o LDE225 bloqueou a ativação da via do *SHH*, diminuindo as expressões gênica e proteica de GLI1, GLI2, PTCH1, BCL-2 e CCND1 (Nanta *et al.*, 2013). Já em melanomas, esse tratamento levou à diminuição do tamanho tumoral com significativa redução da expressão de GLI1 (Jalili *et al.*, 2013). O uso de Gant61 para inibir a ativação da via do *SHH* apresentou capacidade para bloquear o crescimento tumoral em câncer de mama (Benvenuto *et al.*, 2016). Por outro lado, modelos animais com leucemia mielóide tratados com Gant61, não apresentaram diferença na sobrevida quando comparados ao controle (Latuske *et al.*, 2017).

Terapias vêm sendo descritas para os LM e LMS. Em um estudo com pacientes com sarcoma uterino em estágio inicial que receberam quimioterapia combinada com doxorubicina, ifosfamida e cisplatina comparadas com pacientes que receberam somente quimioterapia, o grupo que fez uso da terapia combinada apresentou resultados positivos, melhorando a sobrevida livre de doença, porém a sobrevida global não apresentou alteração entre os dois grupos (Pautier *et al.*, 2013). A eficácia da trabectedina foi testada como agente único para o tratamento em pacientes com LMS, porém os resultados não se mostram promissores em relação à sobrevida das pacientes em comparação ao grupo placebo (Monk *et al.*, 2012). Outro estudo comparou o uso da gemcitabina-docetaxel com o grupo placebo, em pacientes com estágio I de LMS, nesse caso os resultados também não apresentaram diferença na sobrevida global entre os dois grupos (Littell *et al.*, 2017).

Já para os casos de LM, o uso da suplementação da vitamina D vêm mostrando resultados promissores para essas pacientes, diminuindo o tamanho tumoral se comparado ao grupo placebo (Hajhashemi *et al.*, 2019). O uso do vilaprisan em mulheres com LM também apresentou resultados promissores, reduzindo o sangramento uterino anormal e o volume tumoral (Bradley *et al.*, 2019). Já o tratamento utilizando Elagolix em pacientes com LM, mostrou-se eficaz, também para o controle do sangramento uterino anormal (Archer *et al.*, 2017).

Sucintamente, nossos resultados abrem perspectivas para novos estudos em leiomiossarcomas uterinos. A utilização do modelo animal para confirmação da eficácia do uso de inibidores da via de sinalização do *SHH* no tratamento desses tumores pode mudar, de modo positivo, a terapêutica das pacientes.

Além disso, a aplicação desse modelo contribuirá para a amplificação do conhecimento nos mecanismos de ativação da via do *SHH* em LMS.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As expressões gênicas de *SMO*, *GLI1* e *SUFU* foram maiores nas células de LMS em relação as células de MM. *PTCH1* mostrou hipo expressão em LM se comparado ao MM. *SHH*, *GLI2* e *GLI3* não apresentaram diferença de expressão. Quanto aos alvos da via *BCL-2*, *cMYC*, *RAD51*, *TP53* e *FOXM1* apresentaram mais expresso em LMS, enquanto *P21* foi menos expresso, já que os demais não apresentaram diferenças;
- Das proteínas avaliadas, SMO e GLI1 mostraram-se mais expressas em células de LMS, enquanto GLI2, GLI3 e SUFU se apresentaram hiper-reguladas em LM;
- Dentre os inibidores testados para SMO e GLI, LDE225 e Gant61 apresentaram efeito inibitório na proliferação das células de LMS com diminuição da expressão proteica. Os demais inibidores testados não apresentaram diferença. As células de LM tratadas com os inibidores não apresentaram efeito;
- Os tratamentos com LDE225 e Gant61 apresentaram diminuição nas capacidades de migração e invasão celular, além de induzirem morte por apoptose das células de LMS.
- A inibição transiente por RNAi para o gene *SMO*, levou à menor expressão dos genes: *SMO*, *GLI1*, *GLI2* e *GLI3*. Além disso, a redução da expressão da proteína SMO corroborou os dados avaliados anteriormente por mRNA.

7. ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: INIBIDORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO SONIC HEDGEHOG: AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS IN VITRO NOS LEIOMIOMAS E LEIOMIOSSARCOMAS UTERINOS

Pesquisador Responsável: Kátia Cândido Carvalho **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Natalia Garcia **CAAE:** 48580015.8.0000.0068

Co-autores: Prof. Dr. Edmund Chada Baraca; Prof. Dr. Nilo Bozzini

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Dra Kátia Cândido Carvalho

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13684

Número do Parecer: 1.310.645

Data da Relatoria: 04/11/2015

Apresentação do Projeto: Trata-se do segundo relato do protocolo de pesquisa onde será estudado a ação in vitro de inibidores da via de sinalização do Sonic Hedgehog nos leiomiomas e leiomiossarcomas uterinos. O projeto está bem descrito, possui relevância científica e não trará riscos para o sujeito da pesquisa. Os pesquisadores atenderam a solicitação do relator

Objetivo da Pesquisa: Os pesquisadores pretendem avaliar o efeito na viabilidade de células de leiomioma e leiomiossarcoma após o tratamento com os inibidores de SMO (GDC 0449, LD 225 e ciclopatina), GLI 1 (GANT 56, GANT 61, IPH 1e IPH 6) e SHH (Robotinikinin); além de avaliar a expressão das proteínas SHH, PTCH1, SMO, GLI 1-3, SUFU, BMP4, BCL-2 e CCND1 nas culturas celulares, após tratamento com os inibidores, por qRT-PCR e Western Blott. Analisar o efeito do silenciamento de SMO, GLI 1, GLI 2, GLI 3, SHH e HHIP 1 em linhagens celulares de leiomioma e leiomiossarcoma uterinos, por RNA interferente. Os objetivos estão claros e a metodologia adequada para o desenvolvimento do projeto

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa e sua contribuição se dará através de uma resposta positiva para os inibidores testados nestas células.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é relevante para a área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A apresentação dos TCLE está adequada e cumpre as regras estabelecidas pela comissão.

Recomendações: Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não apresenta pendências, recomendamos a aprovação do protocolo de pesquisa.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio de Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 09 de Novembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Marilui
-Coordenador-
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8. REFERÊNCIAS

Agyeman A, Jha BK, Mazumdar T, Houghton JA. Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. *Oncotarget* 2014; 5(12): 4492-503.

Al-Hendy A, Laknaur A, Diamond MP, Ismail N, Boyer TG, Halder SK. Silencing Med12 Gene Reduces Proliferation of Human Leiomyoma Cells Mediated via Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *Endocrinology* 2017; 158(3): 592-603.

Archer DF, Stewart EA, Jain RI, Feldman RA, Lukes AS, North JD, et al. Elagolix for the management of heavy menstrual bleeding associated with uterine fibroids: results from a phase 2a proof-of-concept study. *Fertil Steril*. 2017;108(1):152-60.e4

Asklund T, Henriksson R, Axelsson J, Bergstrom A, Kasper M, Ogren M, *et al*. Early and persisting response to vismodegib in a patient with bone metastasizing medulloblastoma. *Acta Oncol* 2013; 52(4): 862-6.

Atkins KA, Arronte N, Darus CJ, Rice LW. The Use of p16 in enhancing the histologic classification of uterine smooth muscle tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(1): 98-102.

Atwood SX, Chang AL, Oro AE. Hedgehog pathway inhibition and the race against tumor evolution. *J Cell Biol* 2012; 199(2): 193-7.

Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, *et al.* Smoothened variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2015; 27(3): 342-53.

Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *American journal of obstetrics and gynecology* 2003; 188(1): 100-7.

Banerjee S, Corless CL, Miettinen MM, Noh S, Ustoy R, Davis JL, *et al.* Loss of the PTCH1 tumor suppressor defines a new subset of plexiform fibromyxoma. *J Transl Med.* 2019;17(1):246.

Bartosch C, Afonso M, Pires-Luis AS, Galaghar A, Guimaraes M, Antunes L, *et al.* Distant Metastases in Uterine Leiomyosarcomas: The Wide Variety of Body Sites and Time Intervals to Metastatic Relapse. *Int J Gynecol Pathol* 2017; 36(1): 31-41.

Basset-Seguin N, Hauschild A, Grob JJ, Kunstfeld R, Dreno B, Mortier L, *et al.* Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): a pre-planned interim analysis of an international, open-label trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(6): 729-36.

Belgioia L, Desideri I, Errico A, Franzese C, Daidone A, Marino L, *et al.* Safety and efficacy of combined radiotherapy, immunotherapy and targeted agents in elderly patients: A literature review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 133: 163-70.

Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol* 1994; 18(6): 535-58.

Benvenuto M, Masuelli L, De Smaele E, Fantini M, Mattera R, Cucchi D, *et al.* In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget* 2016; 7(8): 9250-70.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, *et al.* Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002; 297(5586): 1559-61.

Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, *et al.* Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2012; 120(25): 5002-13.

Boehme KA, Zaborski JJ, Riester R, Schweiss SK, Hopp U, Traub F, *et al.* Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma. *International journal of oncology* 2016; 48(2): 801-12.

Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Mol Med* 2015; 21: 242-56.

Botsis D, Koliopoulos C, Kondi-Pafitis A, Creatsas G. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus in a patient receiving tamoxifen therapy: a case report. *Int J Gynecol Pathol* 2006; 25(2): 173-5.

Bowden W, Skorupski J, Kovanci E, Rajkovic A. Detection of novel copy number variants in uterine leiomyomas using high-resolution SNP arrays. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(9): 563-8.

Bozzini N, Rodrigues CJ, Petti DA, Bevilacqua RG, Goncalves SP, Pinotti JA. Effects of treatment with gonadotropin releasing hormone agonist on the uterine leiomyomata structure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82(4): 330-4.

Bradley LD, Singh SS, Simon J, Gemzell-Danielsson K, Petersdorf K, Groettrup-Wolfers E, et al. Vilaprisan in women with uterine fibroids: the randomized phase 2b ASTEROID 1 study. *Fertil Steril*. 2019;111(2):240-8.

Brakta S, Diamond JS, Al-Hendy A, Diamond MP, Halder SK. Role of vitamin D in uterine fibroid biology. *Fertil Steril* 2015; 104(3): 698-706.

Bulun SE, Simpson ER, Word RA. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(3): 736-43.

Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, *et al.* Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2010; 2(51): 51ra70.

Burness CB. Sonidegib: First Global Approval. *Drugs* 2015; 75(13): 1559-66.

Buttram VC, Jr. Uterine leiomyomata--aetiology, symptomatology and management. *Prog Clin Biol Res* 1986; 225: 275-96.

Cardozo ER, Clark AD, Banks NK, Henne MB, Stegmann BJ, Segars JH. The estimated annual cost of uterine leiomyomata in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(3): 211.e1-9.

Carney SA, Tahara H, Swartz CD, Risinger JI, He H, Moore AB, *et al.* Immortalization of human uterine leiomyoma and myometrial cell lines after induction of telomerase activity: molecular and phenotypic characteristics. *Lab Invest* 2002; 82(6): 719-28.

Carpenter RL, Ray H. Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Drug Saf* 2019; 42(2): 263-79.

Chaturvedi NK, Kling MJ, Coulter DW, McGuire TR, Ray S, Keshewani V, *et al.* Improved therapy for medulloblastoma: targeting hedgehog and PI3K-mTOR signaling pathways in combination with chemotherapy. *Oncotarget* 2018; 9(24): 16619-33.

Che J, Zhang FZ, Zhao CQ, Hu XD, Fan SJ. Cyclopamine is a novel Hedgehog signaling inhibitor with significant anti-proliferative, anti-invasive and anti-estrogenic potency in human breast cancer cells. *Oncol Lett* 2013; 5(4): 1417-21.

Chen C, Breslin MB, Lan MS. Sonic hedgehog signaling pathway promotes INSM1 transcription factor in neuroendocrine lung cancer. *Cellular signalling* 2018; 46: 83-91.

Chen CR, Buck GM, Courey NG, Perez KM, Wactawski-Wende J. Risk factors for uterine fibroids among women undergoing tubal sterilization. *American journal of epidemiology* 2001; 153(1): 20-6.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 2002; 16(21): 2743-8.

Chen Q, Xu R, Zeng C, Lu Q, Huang D, Shi C, *et al.* Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin beta4-mediated FAK signaling. *PLoS One* 2014; 9(2): e88386.

Chiaffarino F, Ricci E, Cipriani S, Chiantera V, Parazzini F. Cigarette smoking and risk of uterine myoma: systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016; 197: 63-71.

Chuang TD, Khorram O. Regulation of Cell Cycle Regulatory Proteins by MicroRNAs in Uterine Leiomyoma. *Reprod Sci* 2019; 26(2): 250-8.

Ciebiera M, Wlodarczyk M, Zareba K, Lukaszuk K, Jakiel G. Vitamin D and Uterine Fibroids-Review of the Literature and Novel Concepts. *Int J Mol Sci* 2018; 19(7).

Collini P, Sorensen PH, Patel S, Blay JY, Issels RD, Maki RG, *et al.* Sarcomas with spindle cell morphology. *Semin Oncol* 2009; 36(4): 324-37.

Commandeur AE, Styer AK, Teixeira JM. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Hum Reprod Update* 2015; 21(5): 593-615.

Cook JD, Walker CL. Treatment strategies for uterine leiomyoma: the role of hormonal modulation. *Semin Reprod Med* 2004; 22(2): 105-11.

Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 1998; 280(5369): 1603-7.

Cui RR, Wright JD, Hou JY. Uterine leiomyosarcoma: a review of recent advances in molecular biology, clinical management and outcome. *Bjog* 2017; 124(7): 1028-37.

D'Amato C, Rosa R, Marciano R, D'Amato V, Formisano L, Nappi L, *et al.* Inhibition of Hedgehog signalling by NVP-LDE225 (Erismodegib) interferes with growth and invasion of human renal cell carcinoma cells. *Br J Cancer* 2014; 111(6): 1168-79.

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecologic oncology* 2010; 116(1): 131-9.

Dal Cin P. Cytogenetics of Mesenchymal Tumors of the Female Genital Tract. *Surg Pathol Clin* 2009; 2(4): 813-21.

Dennler S, Andre J, Alexaki I, Li A, Magnaldo T, ten Dijke P, *et al.* Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6981-6.

Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development (Cambridge, England)* 2008; 135(15): 2489-503.

Devereaux KA, Schoolmeester JK. Smooth Muscle Tumors of the Female Genital Tract. *Surgical pathology clinics* 2019; 12(2): 397-455.

Di Luigi G, D'Alfonso A, Patacchiola F, Di Stefano L, Palermo P, Carta G. Leiomyosarcoma: a rare malignant transformation of a uterine leiomyoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2015;36(1):84-7.

Di Magno L, Coni S, Di Marcotullio L, Canettieri G. Digging a hole under Hedgehog: downstream inhibition as an emerging anticancer strategy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1): 62-72.

Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Argenti B, Mincione C, Zazzeroni F, *et al*. REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29): 10833-8.

Di Mauro C, Rosa R, D'Amato V, Ciciola P, Servetto A, Marciano R, *et al*. Hedgehog signalling pathway orchestrates angiogenesis in triple-negative breast cancers. *British journal of cancer* 2017; 116(11): 1425-35.

Dierks C, Beigi R, Guo GR, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, *et al*. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* 2008; 14(3): 238-49.

Dijkgraaf GJ, Aliche B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, *et al*. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and

downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer research* 2011; 71(2): 435-44.

Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P. Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov.* England; 2012. p. 437-8.

Doan HQ, Silapunt S, Migden MR. Sonidegib, a novel smoothened inhibitor for the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5671-8.

Downes E, Sikirica V, Gilabert-Estelles J, Bolge SC, Dodd SL, Maroulis C, *et al.* The burden of uterine fibroids in five European countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 152(1): 96-102.

Drayer SM, Catherino WH. Prevalence, morbidity, and current medical management of uterine leiomyomas. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; 131(2): 117-22.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, *et al.* Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993; 75(7): 1417-30.

Elkafas H, Qiwei Y, Al-Hendy A. Origin of Uterine Fibroids: Conversion of Myometrial Stem Cells to Tumor-Initiating Cells. *Semin Reprod Med.* 2017;35(6):481-6.

Fan H, Oro AE, Scott MP, Khavari PA. Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med* 1997; 3(7): 788-92.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63(6): 1256-72.

Fu J, Rodova M, Nanta R, Meeker D, Van Veldhuizen PJ, Srivastava RK, *et al.* NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200. *Neuro Oncol* 2013; 15(6): 691-706.

Garcia N, Bozzini N, Baiocchi G, da Cunha IW, Maciel GA, Soares JMJ, *et al.* May Sonic Hedgehog proteins be markers for malignancy in uterine smooth muscle tumors? *Hum Pathol* 2016; 50: 43-50.

Garcia N. Via de sinalização do Sonic Hedgehog em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: estudo da expressão transcricional e protéica de moléculas envolvidas na via [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015

Ghanbari A, Cheraghzadeh Z, Mahmoudi R, Zibara K, Hosseini E. GLI inhibitors overcome Erlotinib resistance in human pancreatic cancer cells by modulating E-cadherin. *J Chemother* 2019; 31(3): 141-9.

Giuntoli li RL, Metzinger DS, DiMarco CS, Cha SS, Sloan JA, Keeney GL, *et al.* Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy☆. *Gynecologic Oncology* 2003; 89(3): 460-9.

Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget* 2015; 6(16): 13899-913.

Gonnissen A, Isebaert S, McKee CM, Dok R, Haustermans K, Muschel RJ. The hedgehog inhibitor GANT61 sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation both in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016; 7(51): 84286-98.

Gonnissen A, Isebaert S, McKee CM, Muschel RJ, Haustermans K. The Effect of Metformin and GANT61 Combinations on the Radiosensitivity of Prostate Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 2017; 18(2).

Gould A, Missailidis S. Targeting the hedgehog pathway: the development of cyclopamine and the development of anti-cancer drugs targeting the hedgehog pathway. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(3): 200-13.

Gross KL, Morton CC. Genetics and the development of fibroids. *Clinical obstetrics and gynecology* 2001; 44(2): 335-49.

Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, *et al.* Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* 2001; 294(5549): 2186-9.

Habib JG, O'Shaughnessy JA. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med* 2016; 5(10): 2989-3006.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, *et al.* Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85(6): 841-51.

Hajhashemi M, Ansari M, Haghollahi F, Eslami B. The effect of vitamin D supplementation on the size of uterine leiomyoma in women with vitamin D deficiency. *Caspian J Intern Med.* 2019;10(2):125-31.

Hanna A, Shevde LA. Erratum to: 'Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment'. *Mol Cancer.* England; 2016. p. 35.

Hehlhans S, Booms P, Gullulu O, Sader R, Rodel C, Balermipas P, *et al.* Radiation Sensitization of Basal Cell and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by the Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(9).

Heidebrecht F, Heidebrecht A, Schulz I, Behrens SE, Bader A. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. *J Immunol Methods* 2009; 345(1-2): 40-8.

Heller E, Hurchla MA, Xiang J, Su X, Chen S, Schneider J, *et al.* Hedgehog signaling inhibition blocks growth of resistant tumors through effects on tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012; 72(4): 897-907.

Hosh M, Antar S, Nazzal A, Warda M, Gibreel A, Refky B. Uterine Sarcoma: Analysis of 13,089 Cases Based on Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Int J Gynecol Cancer* 2016; 26(6): 1098-104.

Hou X, Chen X, Zhang P, Fan Y, Ma A, Pang T, *et al.* Inhibition of hedgehog signaling by GANT58 induces apoptosis and shows synergistic antitumor activity with AKT inhibitor in acute T cell leukemia cells. *Biochimie* 2014; 101: 50-9.

Hu Q, Hou YC, Huang J, Fang JY, Xiong H. Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2017; 36(1): 50.

Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-Gli signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20(6): 1566-75.

Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H. Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(22): 12044-9.

Inoue K, Tsubamoto H, Sakata K, Sakane R, Hao H, Hirota S, *et al.* Expression of Hedgehog Signals and Growth Inhibition by Itraconazole in Endometrial Cancer. *Anticancer research* 2016; 36(1): 149-53.

Ip PP, Cheung AN. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(6): 691-704.

Irvine DA, Zhang B, Kinstrie R, Tarafdar A, Morrison H, Campbell VL, *et al.* Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothened antagonist LDE225 (Sonidegib) in chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci Rep* 2016; 6: 25476.

Jalili A, Mertz KD, Romanov J, Wagner C, Kalthoff F, Stuetz A, *et al.* NVP-LDE225, a potent and selective SMOOTHENED antagonist reduces melanoma growth in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; 8(7): e69064.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, *et al.* Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272(5268): 1668-71.

Ju B, Spitsbergen J, Eden CJ, Taylor MR, Chen W. Co-activation of hedgehog and AKT pathways promote tumorigenesis in zebrafish. *Mol Cancer* 2009; 8: 40.

Kakiuchi S, Minami Y, Miyata Y, Mizutani Y, Goto H, Kawamoto S, *et al.* NANOG Expression as a Responsive Biomarker during Treatment with Hedgehog Signal Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia. *International journal of molecular sciences* 2017; 18(3).

Karmon AE, Cardozo ER, Rueda BR, Styer AK. MicroRNAs in the development and pathobiology of uterine leiomyomata: does evidence support future strategies for clinical intervention? *Human reproduction update* 2014; 20(5): 670-87.

Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, Stolley PD, Guzinski GM. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *The Journal of reproductive medicine* 1996; 41(7): 483-90.

Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Belge G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of HMGA2 mRNA in uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 196(2): 119-23.

Koike Y, Ohta Y, Saitoh W, Yamashita T, Kanomata N, Moriya T, *et al.* Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activities of the non-canonical hedgehog

inhibitor GANT61 in triple-negative breast cancer cells. *Breast cancer* (Tokyo, Japan) 2017; 24(5): 683-93.

Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto AM, Leminen A. Clinical outcome and prognostic factors in 100 cases of uterine sarcoma: experience in Helsinki University Central Hospital 1990-2001. *Gynecol Oncol* 2008; 111(1): 74-81.

Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 1993; 75(7): 1431-44.

Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, *et al.* Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research* 2004; 64(17): 6071-4.

Lacouture ME, Dreno B, Ascierto PA, Dummer R, Basset-Seguin N, Fife K, *et al.* Characterization and Management of Hedgehog Pathway Inhibitor-Related Adverse Events in Patients With Advanced Basal Cell Carcinoma. *Oncologist* 2016; 21(10): 1218-29.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.

Lakhman Y, Veeraraghavan H, Chaim J, Feier D, Goldman DA, Moskowitz CS, *et al.* Differentiation of Uterine Leiomyosarcoma from Atypical Leiomyoma:

Diagnostic Accuracy of Qualitative MR Imaging Features and Feasibility of Texture Analysis. *Eur Radiol* 2017; 27(7): 2903-15.

Latuske EM, Stamm H, Klokow M, Vohwinkel G, Muschhammer J, Bokemeyer C, *et al.* Combined inhibition of GLI and FLT3 signaling leads to effective anti-leukemic effects in human acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2017; 8(17): 29187-201.

Laughlin SK, Herring AH, Savitz DA, Olshan AF, Fielding JR, Hartmann KE, *et al.* Pregnancy-related fibroid reduction. *Fertil Steril* 2010; 94(6): 2421-3.

Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(20): 8455-60.

Lehnhardt M, Daigeler A, Homann HH, Schwaiberger V, Goertz O, Kuhnen C, *et al.* MFH revisited: outcome after surgical treatment of undifferentiated pleomorphic or not otherwise specified (NOS) sarcomas of the extremities -- an analysis of 140 patients. *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394(2): 313-20.

Li J, Cai J, Zhao S, Yao K, Sun Y, Li Y, *et al.* GANT61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2016a; 35(1): 184.

Li X, Chen F, Zhu Q, Ding B, Zhong Q, Huang K, *et al.* Gli-1/PI3K/AKT/NF-kB pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 2016b; 7(22): 33004-15.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2007; 2(2): 329-33.

Lim D, Alvarez T, Nucci MR, Gilks B, Longacre T, Soslow RA, *et al.* Interobserver variability in the interpretation of tumor cell necrosis in uterine leiomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(5): 650-8.

Lin TL, Wang QH, Brown P, Peacock C, Merchant AA, Brennan S, *et al.* Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926. *PloS one* 2010; 5(12): e15262.

Lin Z, Li S, Sheng H, Cai M, Ma LY, Hu L, *et al.* Suppression of GLI sensitizes medulloblastoma cells to mitochondria-mediated apoptosis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016; 142(12): 2469-78.

Lin Z, Sheng H, You C, Cai M, Zhang Y, Yu LS, *et al.* Inhibition of the CyclinD1 promoter in response to sonic hedgehog signaling pathway transduction is mediated by Gli1. *Experimental and therapeutic medicine* 2017; 13(1): 307-14.

Littell RD, Tucker LY, Raine-Bennett T, Palen TE, Zaritsky E, Neugebauer R, et al. Adjuvant gemcitabine-docetaxel chemotherapy for stage I uterine leiomyosarcoma: Trends and survival outcomes. *Gynecol Oncol*. 2017;147(1):11-7.

Liu Y, Gao S, Zhu J, Zheng Y, Zhang H, Sun H. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway. *Cancer Med* 2018; 7(11): 5704-15.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.

Lo WW, Wunder JS, Dickson BC, Campbell V, McGovern K, Alman BA, et al. Involvement and targeted intervention of dysregulated Hedgehog signaling in osteosarcoma. *Cancer* 2014; 120(4): 537-47.

Lusby K, Savannah KB, Demicco EG, Zhang Y, Ghadimi MP, Young ED, et al. Uterine leiomyosarcoma management, outcome, and associated molecular biomarkers: a single institution's experience. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(7): 2364-72.

Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang Z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumourigenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010; 14(12): 2697-701.

Magistri P, Battistelli C, Strippoli R, Petrucciani N, Pellinen T, Rossi L, *et al.* SMO Inhibition Modulates Cellular Plasticity and Invasiveness in Colorectal Cancer. *Frontiers in pharmacology* 2017; 8: 956.

Makinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ, *et al.* MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science (New York, NY)* 2011; 334(6053): 252-5.

Malpel S, Claret S, Sanial M, Brigui A, Piolot T, Daviet L, *et al.* The last 59 amino acids of Smoothed cytoplasmic tail directly bind the protein kinase Fused and negatively regulate the Hedgehog pathway. *Dev Biol* 2007; 303(1): 121-33.

Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, *et al.* Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstetrics and gynecology* 1997; 90(6): 967-73.

Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Barbieri RL, *et al.* A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998; 70(3): 432-9.

Mas A, Stone L, O'Connor PM, Yang Q, Kleven D, Simon C, et al. Developmental Exposure to Endocrine Disruptors Expands Murine Myometrial Stem Cell Compartment as a Prerequisite to Leiomyoma Tumorigenesis. *Stem Cells*. 2017;35(3):666-78.

Matsumoto T, Tabata K, Suzuki T. The GANT61, a GLI inhibitor, induces caspase-independent apoptosis of SK-N-LO cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2014; 37(4): 633-41.

Matsuo K, Eno ML, Im DD, Rosenshein NB. Pregnancy and genital sarcoma: a systematic review of the literature. *Am J Perinatol* 2009; 26(7): 507-18.

Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, Jones J, Agyeman A, Houghton JA. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; 71(3): 1092-102.

Mbatani N, Olawaiye AB, Prat J. Uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet* 2018; 143 Suppl 2: 51-8.

McCann CK, Growdon WB, Kulkarni-Datar K, Curley MD, Friel AM, Proctor JL, *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling antagonizes serous ovarian cancer growth in a primary xenograft model. *PloS one* 2011; 6(11): e28077.

McLucas B. Diagnosis, imaging and anatomical classification of uterine fibroids. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2008; 22(4): 627-42.

Mechlin CW, Tanner MJ, Chen M, Buttyan R, Levin RM, Mian BM. Gli2 expression and human bladder transitional carcinoma cell invasiveness. *J Urol* 2010; 184(1): 344-51.

Mehine M, Kaasinen E, Makinen N, Katainen R, Kampjarvi K, Pitkanen E, *et al.* Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *The New England journal of medicine* 2013; 369(1): 43-53.

Merchant JL, Saqui-Salces M. Inhibition of Hedgehog signaling in the gastrointestinal tract: targeting the cancer microenvironment. *Cancer Treat Rev* 2014; 40(1): 12-21.

Molckovsky A, Siu LL. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. *J Hematol Oncol*. England; 2008. p. 20.

Momtahan M, Emami F, Sari Aslani F, Akbarzadeh-Jahromi M. Evaluation of treatment results and prognostic factors of uterine sarcoma: A single-center experience. *J Chin Med Assoc*. 2019.

Monk BJ, Blessing JA, Street DG, Muller CY, Burke JJ, Hensley ML. A phase II evaluation of trabectedin in the treatment of advanced, persistent, or recurrent uterine leiomyosarcoma: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):48-52.

Moravek MB, Yin P, Ono M, Coon JSt, Dyson MT, Navarro A, *et al.* Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. *Hum Reprod Update* 2015; 21(1): 1-12.

Nagao-Kitamoto H, Nagata M, Nagano S, Kitamoto S, Ishidou Y, Yamamoto T, *et al.* GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma. *Int J Cancer* 2015; 136(6): 1276-84.

Nakamura A, Aizawa J, Sakayama K, Kidani T, Takata T, Norimatsu Y, *et al.* Genistein inhibits cell invasion and motility by inducing cell differentiation in murine osteosarcoma cell line LM8. *BMC Cell Biol* 2012; 13: 24.

Nanta R, Kumar D, Meeker D, Rodova M, Van Veldhuizen PJ, Shankar S, *et al.* NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2Rgamma null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis* 2013; 2: e42.

Nanta R, Shrivastava A, Sharma J, Shankar S, Srivastava RK. Inhibition of sonic hedgehog and PI3K/Akt/mTOR pathways cooperate in suppressing survival, self-renewal and tumorigenic potential of glioblastoma-initiating cells. *Mol Cell Biochem* 2019; 454(1-2): 11-23.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, *et al.* Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003; 33(3): 416-21.

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.

O'Reilly KE, de Miera EV, Segura MF, Friedman E, Poliseno L, Han SW, *et al.* Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013; 6(11): 1429-50.

Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer* 2012; 118(5): 1387-96.

Okolo SO, Gentry CC, Perrett CW, Maclean AB. Familial prevalence of uterine fibroids is associated with distinct clinical and molecular features. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2321-4.

Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH, Jr., Scott MP. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 1997; 276(5313): 817-21.

Othman EE, Al-Hendy A. Molecular genetics and racial disparities of uterine leiomyomas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008; 22(4): 589-601.

Pansky M, Cowan BD, Frank M, Hampton HL, Zimberg S. Laparoscopically assisted uterine fibroid cryoablation. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(6): 571.e1-7.

Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007; 87(4): 725-36.

Pautier P, Floquet A, Gladiéff L, Bompas E, Ray-Coquard I, Piperno-Neumann S, et al. A randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and cisplatin followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with localized uterine sarcomas (SARCGYN study). A study of the French Sarcoma Group. *Ann Oncol*. 2013;24(4):1099-104.

Pietrobono S, Stecca B. Targeting the Oncoprotein Smoothed by Small Molecules: Focus on Novel Acylguanidine Derivatives as Potent Smoothed Inhibitors. *Cells* 2018; 7(12).

Qualtrough D, Rees P, Speight B, Williams AC, Paraskeva C. The Hedgehog Inhibitor Cyclopamine Reduces beta-Catenin-Tcf Transcriptional Activity, Induces E-Cadherin Expression, and Reduces Invasion in Colorectal Cancer Cells. *Cancers* 2015; 7(3): 1885-99.

Rajurkar M, De Jesus-Monge WE, Driscoll DR, Appleman VA, Huang H, Cotton JL, et al. The activity of Gli transcription factors is essential for Kras-induced pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(17): E1038-47.

Riaz SK, Khan JS, Shah STA, Wang F, Ye L, Jiang WG, *et al.* Involvement of hedgehog pathway in early onset, aggressive molecular subtypes and metastatic potential of breast cancer. *Cell communication and signaling : CCS* 2018; 16(1): 3.

Riobo NA, Manning DR. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* 2007; 403(3): 369-79.

Rodon J, Tawbi HA, Thomas AL, Stoller RG, Turtshi CP, Baselga J, *et al.* A phase I, multicenter, open-label, first-in-human, dose-escalation study of the oral smoothened inhibitor Sonidegib (LDE225) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014; 20(7): 1900-9.

Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V, Norlin S, Ruiz i Altaba A, *et al.* Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 1994; 76(4): 761-75.

Roth W, Wild-Bode C, Platten M, Grimm C, Melkonyan HS, Dichgans J, *et al.* Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene* 2000; 19(37): 4210-20.

Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, *et al.* Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *The New England journal of medicine* 2009; 361(12): 1173-8.

Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology* 2007; 17(9): 438-47.

Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(34): 12561-6.

Sasai N, Briscoe J. Primary cilia and graded Sonic Hedgehog signaling. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2012; 1(5): 753-72.

Sato F, Mori M, Nishi M, Kudo R, Miyake H. Familial aggregation of uterine myomas in Japanese women. *Journal of epidemiology* 2002; 12(3): 249-53.

Sato F, Nishi M, Kudo R, Miyake H. Body fat distribution and uterine leiomyomas. *J Epidemiol* 1998; 8(3): 176-80.

Seagle BL, Sobecki-Rausch J, Strohl AE, Shilpi A, Grace A, Shahabi S. Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol* 2017; 145(1): 61-70.

Seki K, Hoshihara T, Nagata I. Leiomyosarcoma of the uterus: ultrasonography and serum lactate dehydrogenase level. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 33(2): 114-8.

Sekulic A, Migden MR, Basset-Seguin N, Garbe C, Gesierich A, Lao CD, *et al.* Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 332.

Seto M, Ohta M, Asaoka Y, Ikenoue T, Tada M, Miyabayashi K, *et al.* Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol Carcinog* 2009; 48(8): 703-12.

Shao JB, Gao ZM, Huang WY, Lu ZB. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in neuroblastoma cells. *International journal of oncology* 2017; 50(5): 1623-33.

Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguin N, Modrusan Z, Januario T, *et al.* Genomic analysis of smoothened inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2015; 27(3): 327-41.

Shevde LA, Samant RS. Nonclassical hedgehog-GLI signaling and its clinical implications. *Int J Cancer* 2014; 135(1): 1-6.

Shwayder J, Sakhel K. Imaging for uterine myomas and adenomyosis. *J Minim Invasive Gynecol* 2014; 21(3): 362-76.

Singh BN, Fu J, Srivastava RK, Shankar S. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms. *PLoS One* 2011a; 6(11): e27306.

Singh RR, Kunkalla K, Qu C, Schlette E, Neelapu SS, Samaniego F, *et al.* ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2011b; 30(49): 4874-86.

Song K, Zheng G, Zhao Y. Liver kinase B1 suppresses growth of lung cancer cells through sonic hedgehog signaling pathway. *Cell biology international* 2018; 42(8): 994-1005.

Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A, Tinelli A. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review. *Int J Fertil Steril* 2016; 9(4): 424-35.

Srivastava RK, Kaylani SZ, Edrees N, Li C, Talwelkar SS, Xu J, *et al.* GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis. *Oncotarget* 2014; 5(23): 12151-65.

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, *et al.* Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(14): 5895-900.

Stecca B, Ruiz i Altaba A. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *The EMBO journal* 2009; 28(6): 663-76.

Stecca B, Ruiz IAA. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol* 2010; 2(2): 84-95.

Stewart EA, Nicholson WK, Bradley L, Borah BJ. The burden of uterine fibroids for African-American women: results of a national survey. *Journal of women's health (2002)* 2013; 22(10): 807-16.

Styer AK, Rueda BR. The Epidemiology and Genetics of Uterine Leiomyoma. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2016; 34: 3-12.

Sun W, Li L, Du Z, Quan Z, Yuan M, Cheng H, *et al.* Combination of phospholipase Cepsilon knockdown with GANT61 sensitizes castration-resistant prostate cancer cells to enzalutamide by suppressing the androgen receptor signaling pathway. *Oncol Rep* 2019; 41(5): 2689-702.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 2002; 418(6900): 892-7.

Tang CT, Lin XL, Wu S, Liang Q, Yang L, Gao YJ, *et al.* NOX4-driven ROS formation regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells through the GLI1 pathway. *Cellular signalling* 2018; 46: 52-63.

Taylor DK, Holthouser K, Segars JH, Leppert PC. Recent scientific advances in leiomyoma (uterine fibroids) research facilitates better understanding and management. *F1000Res* 2015; 4(F1000 Faculty Rev): 183.

Terry KL, De Vivo I, Hankinson SE, Missmer SA. Reproductive characteristics and risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2010; 94(7): 2703-7.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, *et al.* Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; 425(6960): 851-6.

Tibes R, Mesa RA. Targeting hedgehog signaling in myelofibrosis and other hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2014; 7: 18.

Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Kaneko F. Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2002; 146(1): 69-73.

Tong W, Qiu L, Qi M, Liu J, Hu K, Lin W, *et al.* GANT-61 and GDC-0449 induce apoptosis of prostate cancer stem cells through a GLI-dependent mechanism. *Journal of cellular biochemistry* 2018; 119(4): 3641-52.

Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance,

epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer* 2006; 119(12): 2922-30.

Van den Bosch T, Coosemans A, Morina M, Timmerman D, Amant F. Screening for uterine tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26(2): 257-66.

Venkatraman L, Goepel JR, Steele K, Dobbs SP, Lyness RW, McCluggage WG. Soft tissue, pelvic, and urinary bladder leiomyosarcoma as second neoplasm following hereditary retinoblastoma. *J Clin Pathol* 2003; 56(3): 233-6.

Verdelho Machado M, Diehl AM. Role of Hedgehog Signaling Pathway in NASH. *Int J Mol Sci* 2016; 17(6).

Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, *et al.* Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 2009; 361(12): 1164-72.

Wamsteker K, Emanuel MH, de Kruif JH. Transcervical hysteroscopic resection of submucous fibroids for abnormal uterine bleeding: results regarding the degree of intramural extension. *Obstet Gynecol* 1993; 82(5): 736-40.

Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, *et al.* Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 2013; 497(7449): 338-43.

Wang L, Jin JQ, Zhou Y, Tian Z, Jablons DM, He B. Gli is activated and promotes epithelial-mesenchymal transition in human esophageal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2018; 9(1): 853-65.

Wang Y, Ding Q, Yen CJ, Xia W, Izzo JG, Lang JY, *et al.* The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer cell* 2012; 21(3): 374-87.

Warmflash A, Siggia ED, Brivanlou AH. Signaling dynamics and embryonic development. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2012; 11(19): 3529-30.

Watanabe K, Tajino T, Sekiguchi M, Suzuki T. h-Caldesmon as a specific marker for smooth muscle tumors. Comparison with other smooth muscle markers in bone tumors. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(5): 663-8.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422(6929): 313-7.

Wechter ME, Stewart EA, Myers ER, Kho RM, Wu JM. Leiomyoma-related hospitalization and surgery: prevalence and predicted growth based on population trends. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205(5): 492.e1-5.

Wendling-Keim D, Vokuhl C, Walz C, Rieder L, Grantzow R, D VONS, *et al.* Activation of Hedgehog Signaling in Aggressive Hepatic Hemangioma in Newborns and Infants. *Anticancer Res.* 2019;39(5):2351-60.

Wickstrom M, Dyberg C, Shimokawa T, Milosevic J, Baryawno N, Fuskevåg OM, *et al.* Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2013; 132(7): 1516-24.

Williamson AJ, Doscas ME, Ye J, Heiden KB, Xing M, Li Y, *et al.* The sonic hedgehog signaling pathway stimulates anaplastic thyroid cancer cell motility and invasiveness by activating Akt and c-Met. *Oncotarget* 2016; 7(9): 10472-85.

Wise LA, Palmer JR, Harlow BL, Spiegelman D, Stewart EA, Adams-Campbell LL, *et al.* Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study. *Am J Epidemiol* 2004; 159(2): 113-23.

Wu TI, Hsu KH, Huang HJ, Hsueh S, Chou HH, Tsai CS, *et al.* Prognostic factors and adjuvant therapy in uterine carcinosarcoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008; 29(5): 483-8.

Wu TI, Yen TC, Lai CH. Clinical presentation and diagnosis of uterine sarcoma, including imaging. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(6): 681-9.

Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1425-35.

Yan BY, Hibler BP, Menge T, Dunn L, Ho AL, Rossi AM. Sonic Hedgehog pathway inhibitors: from clinical trials to clinical practice. *Br J Dermatol* 2019; 180(5): 1260-1.

Yu B, Gu D, Zhang X, Li J, Liu B, Xie J. GLI1-mediated regulation of side population is responsible for drug resistance in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; 8(16): 27412-27.

Yu X, Zou J, Ye Z, Hammond H, Chen G, Tokunaga A, *et al.* Notch signaling activation in human embryonic stem cells is required for embryonic, but not trophoblastic, lineage commitment. *Cell stem cell* 2008; 2(5): 461-71.

Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, *et al.* Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2007; 26(7): 1046-55.

Zhang W, Yu F, Wang Y, Zhang Y, Meng L, Chi Y. Rab23 promotes the cisplatin resistance of ovarian cancer via the Shh-Gli-ABCG2 signaling pathway. *Oncol Lett* 2018; 15(4): 5155-60.

Zhao WC, Bi FF, Li D, Yang Q. Incidence and clinical characteristics of unexpected uterine sarcoma after hysterectomy and myomectomy for uterine fibroids: a retrospective study of 10,248 cases. *Onco Targets Ther* 2015; 8: 2943-8.

Zito PM, Scharf R. Vismodegib. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2019.