Divisão de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo

Autorizo a divulgação desta Dissertação na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP

.....

São Paulo
2014

Nome completo – Dissertação - SP - Ano

NATALIA GARCIA

Via de sinalização do *Sonic hedgehog* em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos:
estudo da expressão transcricional e protéica de moléculas envolvidas na via

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

Programa Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dra Kátia Cândido Carvalho

São Paulo
2014

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

Via de sinalização do *Sonic Hedgehog* em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos : estudo de expressão transcricional e protéica de moléculas envolvidos na via / Natália Garcia. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Leiomiossarcoma 2.Leiomioma 3.Proteínas Hedgehog 4.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 5.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-420/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Vera Lúcia Siqueira Garcia** e **Jurandir Ronaldo Garcia**, e minha irmã **Tatiana Garcia**, pelo amor, dedicação e incentivo. Sempre foram os maiores motivadores na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me iluminar em todas as decisões e não permitir que eu desanimasse nessa longa caminhada.

A minha orientadora **Dra Kátia Cândido Carvalho**, pela paciência, motivação nos momentos difíceis, por ter acreditado na minha capacidade e permitido que desenvolvesse esse projeto com liberdade de pensar, criar e tomar decisões, e acima de tudo por transmitir conhecimentos práticos e teóricos, de vida e formação humana. Foi extremamente importante para meu crescimento científico.

Ao **Prof Dr. Edmund Chada Baracat** e o **Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel**, pelo suporte e incentivo na pós graduação e na execução desta pesquisa.

Ao **Dr. Nilo Bozzini**, pela confiança, dedicação, palavras de incentivo e por acreditar na minha capacidade.

A **Dra Isabela Werneck da Cunha** e o **Dr. Fernando Augusto Soares**, pela colaboração desde a execução do projeto de pesquisa até a conclusão do trabalho.

Aos técnicos do Hospital AC Camargo Cancer Center **Severino Ferreira** e **Carlos Ferreira de Jesus**, por toda a ajuda e ensinamento durante esses anos. Ao **André Lavorato** pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus amigos do LIM 58, **Daniele Calvano**, **Carlos Calvano**, **Juciara Costa**, **Marinalva de Almeida**, **Giulia Araujo**, **Thiago Hideki**, **Rodrigo Marcondes**, **Luciana Damous**, **Luiz Fernando Portugal**, **Vinicius Cestari**, **Cecília Ferreira** e **Laura dos Anjos** que me apoiaram e ajudaram a desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Vytor Hugo Mendes** ao **Dr. Alexandre da Costa Pereira** do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do INCOR pela colaboração e ajuda nas reações de PCR em tempo real.

A minha família e meus amigos, apoiando e torcendo, cada um a sua maneira. Em especial aos meus tios **Jussane, José Carlos, Nena e Alcides**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pós graduação concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dessa pesquisa (2012/10098-5).

“Seu trabalho vai preencher boa parte da sua vida e a única maneira de ser verdadeiramente satisfeito é fazer o que acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é amar o que você faz”

Steve Jobs

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações. 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.

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Anatomia do útero	6
3.2. Tumores uterinos	6
3.2.1. Leiomioma uterino	8
3.2.2. Leiomiossarcoma uterino	15
3.3. Via de Sinalização do Sonic Hedgehog	19
3.4. Via de Sinalização do Sonic Hedgehog e o desenvolvimento de tumores	22
4. CASUÍSTICA E METODOS	28
4.1. Pacientes e espécimes anatomopatológicos	29
4.2. Processamento histológico	30
4.3. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	30
4.3.1. Extração de RNA das amostras congeladas	30
4.3.2. Extração de RNA das amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE)	31
4.3.3. Síntese de cDNA (DNA complementar)	32
4.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	32

4.5.	Construção do microarranjo de tecido (TMA)	33
4.6.	Reações de imunoistoquímica (IIQ)	34
4.7.	Análise estatística	36
5.	RESULTADOS	37
5.1.	Dados clínicos e anatomopatológicos	38
5.2.	Histomorfologia dos tecidos	40
5.3.	Expressão de genes relacionados à via do SHH	41
5.4.	Expressão das proteínas da via do Sonic Hedgehog	49
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÃO	68
8.	ANEXOS	71
9.	REFERENCIAS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação e possíveis localizações anatômicas do leiomioma no útero	9
Figura 2: Mecanismo de ação do estrogênio e da progesterona sobre os fatores de crescimento na gênese do LMU	11
Figura 3: Via de Sinalização do HH	21
Figura 4: Caracterização da via de sinalização do HH em câncer	24
Figura 5: Diferentes mecanismos que resultam na ativação constitutiva aberrante da via do HH em câncer	25
Figura 6: Três modelos de ativação da via do HH em câncer	26
Figura 7: Gel representativo do perfil eletroforético das amostras de RNA total em gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídeo	31
Figura 8: Gel representativo do perfil eletroforético das amostras de cDNA amplificadas para o gene β -actina em gel de agarose 2% impregnado com brometo de etídeo	32
Figura 9: Fotomicrografia dos tecidos corados por HE (40x)	41
Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida livre de doença (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão gênica de <i>AXIN 2</i> , <i>FZD 2</i> , <i>CCND 1</i> , <i>FZD 6</i> , <i>ESR 1</i> e <i>IFT 52</i>	48
Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida câncer específica (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão gênica de <i>FZD 3</i> , <i>FZD 8</i> e <i>WISP 1</i>	49

Figura 12: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de miométrio	51
Figura 13: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomioma uterino	52
Figura 14: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomioma não convencional	53
Figura 15: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomiossarcoma	54
Figura 16: Representações gráficas dos escores semiquantitativos de intensidade (I) e frequência (F) da marcação imunoistoquímica de SMO, SUFU, HHIP 1 e GLI 1-3 nos tecidos avaliados	56
Figura 17: Curvas de Kaplan – Meier mostrando as taxas de sobrevidas livre de doença (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão protéica de SHH e SUFU	57

Tabela 1: Possíveis apresentações clínicas, sintomas e complicações do LMU	13
Tabela 2: Classificação dos leiomiomas não convencionais de acordo com seu comportamento clínico	14
Tabela 3: Estadiamento do leiomiossarcoma uterino	16
Tabela 4: Classificação histológica do leiomiossarcoma	18
Tabela 5: Condições padronizadas para casa um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica	35
Tabela 6: Características clínicas e achados operatórios das pacientes com leiomiossarcoma LMSU	39
Tabela 7: <i>Fold</i> de regulação (FR) e quantificação relativa (RQ) dos genes	44
Tabela 8: Correlação entre a expressão gênica e os dados clínico patológicos	46
Tabela 9: Frequência de expressão das proteínas nos tecidos avaliados	50
Tabela 10: Correlação entre a expressão das protéica com os dados clínicos patológicos	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	β -actina
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral</i>
AXIN1	Axina 1
AXIN2	Axina 2
B2M	Beta 2 microglobulina
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BOC	<i>BOC cell adhesion associated</i>
CAPPesq	Comitê de ética e pesquisa
CBC	Carcinoma basocelular
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDON	<i>Cell Adhesion associated</i>
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
DAB	Diaminobenzidina
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DVL1	<i>Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)</i>
DVL2	<i>Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de Estrogênio
ESR1	Estrogen receptor α
FFPE	Fixadas em formol e embebidas em parafina

FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOX E1	<i>Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)</i>
FR	<i>Fold</i> de regulação
FU	<i>FUSED</i>
FZD1	<i>Frizzled family receptor 1</i>
FZD2	<i>Frizzled family receptor 2</i>
FZD4	<i>Frizzled family receptor 4</i>
FZD5	<i>Frizzled family receptor 5</i>
FZD6	<i>Frizzled family receptor 6</i>
FZD8	<i>Frizzled family receptor 8</i>
FZD9	<i>Frizzled family receptor 9</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GAS 1	<i>Growth arrest – specific 1</i>
GLI1	<i>GLI family zinc finger 1</i>
GLI2	<i>GLI family zinc finger 2</i>
GLI3	<i>GLI family zinc finger 3</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GREM1	<i>Gremlin 1</i>
GSK3A	<i>Glycogen synthase kinase 3 alpha</i>
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GUSB	Beta glucuronidase
H.E	Hematoxilina e Eosina
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HH	<i>Hedgehog</i>
HHAT	<i>Hedgehog acyltransferase</i>
HHIP 1	Proteína de interação com <i>hedgehog</i>
HMGA2	<i>High mobility group AT-hook 2</i>
HPRT1	<i>Hipoxantina fosforibosil transferase 1</i>
IFT52	<i>Intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)</i>
IGFI	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IIQ	Imunoistoquímica
IMC	Índice de massa corporal
Kcl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LATS1	<i>LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LMAU	Leiomioma uterino não convencional
LMSU	Leiomiossarcoma uterino
LMU	Leiomioma uterino
MAP3k10	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10</i>
MAPK8	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MED12	<i>Mediator complex subunit 12</i>
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MM	Miométrio
MMP7	<i>Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)</i>
MTSS1	<i>Metastasis suppressor 1</i>

MYC-N	<i>V-Myc Myelocytomatosis Viral Related</i>
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>Natinal Center for Biotechnology Information</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor of kappa B</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGR	<i>Progesterone receptor</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PRL	<i>Prolaction</i>
PRLR	<i>Prolactin receptor</i>
PTCH 1	<i>Patched 1</i>
PTCH 2	<i>Patched 2</i>
PTCH1	<i>Patched 1</i>
PTCH2	<i>Patched 2</i>
PTEN	<i>Protein tensin homologue</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RAB23	<i>RAB23, member RAS oncogene family</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RHOA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPLP0	Proteína ribossomal p0
RQ	Quantificação relativa

SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>
SFRP4	<i>Secreted frizzled-related protein 4</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SLC2A1	<i>Facilitated glucose transporter member 1</i>
SLC2A3	<i>Facilitated glucose transporter member 3</i>
SLC2A4	<i>Facilitated glucose transporter member 4</i>
SMO	<i>Smoothened, frizzled family receptor</i>
SNBC	Síndrome do nervo basocelular
SSD	Domínio sensível ao esteroide
STUMP	Potencial maligno incerto
SUFU	<i>Suppressor of fused homolog (Drosophila)</i>
TCF7L1	<i>Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)</i>
TGFβ3	Fator de crescimento beta 3
TLE1	<i>Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)</i>
TMA	Microarranjo de tecido
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta
WIF1	<i>WNT inhibitory factor 1</i>
WISP1	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 1</i>
WNT	<i>Wingless type</i>
WNT2B	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 2B</i>
WNT3	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 3</i>

WNT6 *Wingless-type MMTV integration site family, member 6*

WNT7B *Wingless-type MMTV integration site family, member 7B*

Garcia N. *Via de sinalização do Sonic Hedgehog em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: estudo da expressão transcricional e protéica de moléculas envolvidas na via* [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

Leiomioma (LMU) e leiomiossarcoma (LMSU) são tumores mesenquimais que se desenvolvem no útero e apresentam comportamento clínico variável. Ambos são neoplasias do miométrio (MM), com mesmo padrão de diferenciação celular, porém com progressão clínica completamente diferente. Até o momento, existe grande controvérsia quanto aos fatores relacionados ao surgimento dessas neoplasias e uma possível malignização de um leiomioma pré-existente. Foi demonstrado que a ativação da via de sinalização do Sonic hedgehog (SHH) está relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de tumor, uma vez que a mesma desempenha importante papel na proliferação e diferenciação celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar o padrão de expressão transcricional e protéica de moléculas envolvidas na via do SHH em LMU e LMSU. Foram avaliados a expressão de 106 genes, por PCR em tempo real, e de sete proteínas (SHH, PTCH 1, SMO, SUFU, GLI 1-3 e HHIP 1), por imunoistoquímica, em 176 amostras (20 MM, 103 LMU - incluindo 16 leiomiomas não convencionais/LMA e 37 LMSU). Os resultados mostraram que a expressão gênica e protéica foram similares nas amostras de LMAU e LMSU. A expressão de *AXIN 2*, *FZD 2*, *CCND 1*, *FZD 6*, *ESR 1* e *IFT 52* foi associada com a sobrevida livre de doença; *FZD3*, *FZD 8* e *WISP1* com sobrevida cancer específica nas pacientes com LMSU. As proteínas SMO, SUFU, GLI 1 e GLI 3 não foram expressas nas amostras de MM. SHH e SUFU mostraram correlação com sobrevida livre de doença nas pacientes com LMSU. De modo

geral, o perfil de expressão das proteínas (exceto HHIP 1 e GLI 2), foi crescente entre as amostras de MM, LMU, LMAU e LMSU. Esse dado corrobora a hipótese de malignização dos leiomiomas. Adicionalmente, algumas das proteínas avaliadas têm sido alvos terapêuticos em pacientes com câncer. Assim, no futuro, novos tratamentos podem ser propostos para as mulheres com esse tipo de neoplasias

Descritores: Leiomiossarcoma, leiomioma, Proteínas Hedgehog, Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real e Imuno- Histoquímica.

ABSTRACT

Garcia N. *Sonic Hedgehog signaling pathway in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma: Protein and transcriptional expression study [dissertation]*. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014

Leiomyoma (LMU) and leiomyosarcoma (LMSU) are uterine mesenchymal tumors with variable clinical behavior. Both are myometrial (MM) neoplasms that show the same pattern of cell differentiation, but with completely different clinical progression. To date, there are controversies about these neoplasias development-related factors and a possible malignant transformation of a pre-existing leiomyoma. It was demonstrated that activation of the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway is related to the development of several tumors, due to its activity in the cell proliferation and differentiation. The aim of this study was to evaluate the transcriptional and protein expression profile of the SHH pathway molecules in LMU and LMSU. It was evaluated 106 genes, by quantitative real time PCR, and seven proteins (SHH, PTCH 1, SMO, SUFU, GLI 1-3 and HHIP 1), by immunohistochemistry, in 176 samples (20 MM, 103 LMU - including 16 unconventional leiomyoma /LMAU and 37 LMSU). The results show that the gene and protein expression were similar for LMAU and LMSU samples. The gene expression of *AXIN 2*, *FZD 2*, *CCND 1*, *FZD 6*, *ESR 1* and *IFT 52* was associated with disease free survival; and *FZD3*, *FZD 8* and *WISP1* with cancer specific survival in patient with LMSU. No SMO, SUFU, GLI 1 and GLI 3 protein expression was observed in the MM samples. SHH and SUFU proteins were correlated with disease-free survival in patients with LMS. LMU, LMAU and LMSU samples displayed increased expression of all SHH proteins (except HHIP 1 and GLI 2). These data corroborate with the leiomyoma malignant transformation hypothesis. Moreover, some proteins evaluated have

been used as therapeutic target for cancer patients. In the near future, new treatment strategies might be proposed for women with these neoplasias.

Descriptors: Leiomyosarcoma, Leiomyoma, Hedgehog proteins , Real Time Polymerase chain reaction and Immunohistochemistry

1. INTRODUÇÃO

Leiomioma e leiomiossarcoma são tumores uterinos que se apresentam com mesma diferenciação celular e são descritos como tumores de musculatura lisa. Ambos causam desconforto, sangramento, dor e podem comprometer o desejo reprodutivo das pacientes.

Existem controvérsias sobre a causa e origem dessas neoplasias. Alguns pesquisadores acreditam que o leiomiossarcoma possa surgir a partir de um leiomioma pré-existente, porém não há evidências que comprovem tal transformação. Além disso, a dificuldade diagnóstica entre leiomiosarcomas de baixo grau e as diferentes variáveis do leiomioma é um problema que pode levar tanto a erros no diagnóstico, como a um tratamento equivocado.

Pouco se sabe sobre os fatores que dirigem o comportamento clínico e biológico tão diferentes desses tumores. Nesse aspecto, estudos sobre vias de sinalização celular nos tumores mesenquimais do útero são de grande ajuda, tanto na identificação de marcadores tumorais quanto na descoberta de alvos terapêuticos. Essas vias participam em vários processos celulares e podem estar envolvidas no desenvolvimento de diferentes tipos de tumor.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de marcadores relacionados a uma importante via de sinalização celular, inicialmente, descrita por sua participação no desenvolvimento embrionário – via do sonic hedgehog (SHH) - nos leiomiomas e leiomiossarcomas do útero.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o perfil de expressão de genes e proteínas envolvidos direta e indiretamente na via de sinalização do Sonic Hedgehog (Shh) nos leiomiomas e leiomiossarcomas uterinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão transcricional de genes relacionados à via do Sonic Hedgehog nos leiomiomas (incluindo leiomiomas não-convencionais) e leiomiossarcomas uterinos em relação ao miométrio.
- Avaliar a expressão proteica de SHH, PATCH 1, SMO, GLI 1, GLI 2, GLI 3, HHIP 1 e SUFU nessas amostras
- Verificar se há correlação entre os resultados obtidos e os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Anatomia do útero

O útero está localizado próximo ao assoalho da cavidade pélvica, anterior ao reto e pósterio - superiormente à bexiga urinária. Embora a forma e a posição se modifiquem bastante durante a gravidez, no estado não gravídico o útero possui aproximadamente 7cm de comprimento, 5cm de largura (em sua região mais larga) e 2,5cm de diâmetro (Graff, 2003).

Na arquitetura uterina identificam-se três camadas que, da cavidade pélvica para a sua região mais interna, são: perimétrio (túnica serosa), miométrio (túnica muscular) e endométrio (túnica mucosa). O perimétrio corresponde ao peritônio visceral que reveste grande parte do útero. O miométrio é a camada muscular, com espessura que varia de 10 a 15mm, composta por fibras musculares lisas dispostas em fascículos e separados por fibras colágenas. O endométrio, por sua vez, é a camada que reveste internamente a cavidade do útero e permanece em íntimo contato com o miométrio, por não apresentar submucosa. O aspecto morfológico do endométrio varia de acordo com o estímulo hormonal (Conceição, 2005).

3.2. Tumores Uterinos

Os tumores que se desenvolvem no útero podem ser epiteliais ou mesenquimais e ambos podem apresentar comportamento maligno ou benigno. Quando tumores mesenquimais apresentam comportamento maligno são chamados de sarcomas, que representam aproximadamente 1% das malignidades do trato genital feminino e de 2 à 6% dos tumores do útero (revisão em Gao et al., 2014).

Dentre as neoplasias mesenquimais uterinas, as mais comuns são as do miométrio. O leiomioma uterino (LMU) é o tumor muscular benigno mais frequente do trato genital feminino e geralmente se manifesta em mulheres em idade reprodutiva, apresentando-se de forma sintomática ou assintomática (Ono et al., 2012). Já o leiomiossarcoma uterino (LMSU) é o tumor mesenquimal maligno mais comum do útero (Danielson et al., 2010; Hayashi et al., 2011; Hayashi et al., 2012).

A divisão entre os LMU e LMSU é feita com base na atípia citológica, atividades mitóticas, necrose, entre outros critérios. Embora ambos sejam tumores mesenquimais, apresentam manifestações clínicas muito distintas (FEBRASGO, 2004).

O desenvolvimento desses tumores ainda é pouco compreendido, no entanto, alguns autores acreditam que os LMSU podem surgir a partir de um LMU pré-existente. De qualquer modo, existem poucos dados disponíveis a respeito dos eventos genéticos que poderiam ser implicados no surgimento do LMU, e se este poderia ou não se tornar um tumor maligno (Pérot et al., 2012).

Diferenças genéticas como as translocação entre os cromossomos 12 – 14, 6 – 10, trissomia do 12, deleção dos cromossomos 3 e 10 e mutações dos genes *HMGA2* e *MED 12* poderiam indicar origens distintas desses tumores. Esses aspectos reforçam a ideia de que os LMSU não poderiam resultar de uma degeneração maligna do LMU (Revisão em Islam et al., 2013; Revisão em Ciavattini et al., 2013; Bertsch et al., 2014). Sabe-se que este último, é um tumor proliferativo que permanece diferenciado e têm rearranjos cromossômicos semelhantes aos de outras lesões benignas. Em contraste, os

LMSU são indiferenciados e apresentam rearranjos cromossômicos complexos (revisão em Parker, 2007).

As particularidades de cada um desses tumores serão abordadas nos itens a seguir.

3.2.1. Leiomioma uterino

O LMU foi descrito pela primeira vez por Matthew Baillie em 1793 no hospital Saint George's, em Londres, no Reino Unido. Trata-se de tumores benignos, de aspecto sólido e arredondado de diferentes tamanhos. Estudos têm mostrado que de 5,4 a 77% das mulheres têm LMU (4% entre 20 a 30 anos, 11 - 33% entre 30 - 40 anos, e 33% entre 40-60 anos). Essa variação depende da população estudada e o método de diagnóstico aplicado. (Revisão em Shwayder e Sakhel, 2014). Nos Estados Unidos, estima-se que os LMUs sejam responsáveis por 30 a 40% das 600.000 histerectomias realizadas anualmente (Wu et al., 2007).

Quanto ao aspecto histológico (anatômico), os LMUs são tumores monoclonais das células lisas do miométrio e possuem abundante matriz extracelular rica em colágeno, fibronectina, e proteoglicanos (Sankaran e Mantonda, 2008; revisão em Khan et al., 2014). São classificados de acordo com a sua localização no útero (Figura 1), em: **intramurais**, que se desenvolvem dentro da parede uterina, podendo distorcer sua cavidade e a superfície serosa; **submucosos**, localizados abaixo do endométrio; **subserosos**, que se originam na superfície serosa do útero, podendo ter base ampla ou pediculada e intraligamentares; e **cervicais** que se localizam na cérvix uterina (revisão em Stewart, 2001).

A patogênese do LMU tem sido relacionada, há muitos anos, com a ação dos fatores de crescimento, citocinas, mutações e hormônios esteróides (principalmente estrogênio e progesterona). As principais diferenças entre o leiomioma e o miométrio adjacente estão em genes regulados pelo estrogênio (Revisão em Ciavattini et al., 2013; Shynlova et al., 2009). O estrogênio e a progesterona produzidos pelo ovário regulam os níveis de diferentes fatores de crescimento no miométrio. Fatores estes que poderão estimular ou inibir os efeitos da proliferação celular e provável formação do LMU (Figura 2) (Ciarmela et al., 2011).

Figura 1: Classificação e possíveis localizações anatômicas do leiomiomas do útero (Fonte: www.fertilab.net).

O LMU possui maior número de receptores de estrogênio e progesterona, em relação ao miométrio normal, e o aumento na expressão desses receptores varia durante o ciclo menstrual (Leitão et al., 2004; Brandon et al 1995; Bulun et al., 1994). Esse aumento, em conjunto com outros dados epidemiológicos relacionados ao surgimento e desenvolvimento do LMU, torna essa neoplasia relacionada ao estado estrogênico da paciente (Ciarmela et al., 2011).

O estrogênio é um importante agente mitogenico que regula a proliferação celular na mama, útero e outros órgãos (Kovács et al., 2001). Algumas teorias foram propostas para explicar a ação desse hormônio sobre o crescimento do LMU, uma vez que tanto esses tumores quanto o miométrio são igualmente expostos ao estrogênio (Sumitani et al., 2000). Seu mecanismo de ação é via ligação aos receptores α e β , e sua síntese ocorre pela ação catalítica da enzima aromatase, expressa em vários tecidos humanos (Grings et al., 2012; Bulun et al., 1994). Ishikawa e colaboradores (2009) observaram altos níveis de atividade da aromatase no LMU quando comparado ao miométrio, sugerindo que as células do tumor sintetizam o estrogênio que promove seu crescimento.

Outro aspecto que reforça a característica estrógeno-dependente dos LMU é sua involução pelo tratamento com análogos do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que induzem o hipoestrogenismo (Grigoriadis et al., 2012), com a finalidade da redução do volume dos nódulos e a melhora das condições clínicas das pacientes para possível procedimento cirúrgico (Bozzini et al., 2003).

Figura 2: Mecanismos de ação do estrogênio e da progesterona sobre os fatores de crescimento na gênese do LMU (Ciarmela et al., 2011).

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico; PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas; IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina 1; EGF – Fator de crescimento epidérmico; TGFβ3 – Fator de crescimento beta 3; ↑ Aumento da expressão; ↓ Diminuição da expressão; → Efeito estimulatório; — Efeito inibitório.

Existem evidências de que a progesterona também exerce papel relevante no estímulo de crescimento tumoral (Griffiths et al., 2003). A progesterona tem ação sobre o crescimento do LMU por induzir aumento da expressão de EGF e Bcl-2; e baixa de TNFα e IGF-1 (Luo et al., 2010; Matsuo et al., 1997; Kurachi et al., 2001; Yin et al., 2007; Maruo et al., 2000). Outros estudos também mostraram que a progesterona aumenta a atividade proliferativa do LMU (Muller et al., 2002; Revisão em kim et al., 2013; Willians et al., 2012).

Em conjunto, o estrogênio e a progesterona promovem o crescimento do LMU por meio da ativação de vias de sinalização que interferem na

proliferação, apoptose e diferenciação celular (Bakas et al., 2008; Kin e Sefton, 2012; Islam et al., 2013).

Quanto aos sintomas, em geral, quando presentes, estão relacionados ao número, localização e tamanho dos nódulos. Os principais sinais e sintomas clínicos observados são: sangramento uterino anormal, dor e pressão pélvica, aumento do volume abdominal, incontinência urinária, infertilidade, complicações obstétricas, entre outros. Na tabela 1 são descritas as principais apresentações clínicas dos LMU, seus sintomas e complicações. Porém, a maioria dos LMUs não apresentam sinais e/ou sintomas clínicos (Sabry e Al-Hendy 2012)

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento desses tumores pode-se ressaltar: histórico familiar, quando três parentes de primeiro grau apresentam a doença (Okolo, 2008); raça - mulheres afrodescendentes apresentam incidência 2-3 vezes maior em relação às caucasianas (Wise et al., 2005); menarca precoce (Terry et al., 2010); e obesidade – o risco aumenta cerca de 21% para cada aumento de 10kg (revisão em Ciavattini et al., 2013).

Já entre os fatores considerados protetores estão: uso de contraceptivo oral – redução de 17% do risco a cada 5 anos de uso de contraceptivos orais; paridade - mulheres multíparas apresentam menor risco em relação às nuligestas; tabagismo – os LMUs são menos freqüentes em mulheres fumantes em relação às mulheres não fumantes (Revisão em Ciavattini et al., 2013).

Tabela 1: Possíveis apresentações clínicas, sintomas e complicações do LMU, segundo Sabry e Al-Hendy (2012).

Apresentações Clínicas do Leiomioma Uterino	
•	Assintomático
•	Sintomático
❖	Sangramento uterino anormal
	- Menorragia
	- Anemia
❖	Pressão pélvica
	- Frequência urinária
	- Incontinência urinária
	- Dificuldade de urinar
	- Hidronefrose
	- Constipação
	- Tenesmo
❖	Massa pélvica
❖	Dor pélvica
❖	Infertilidade
❖	Complicações obstétricas
❖	Relacionados à gravidez
	- Crescimento do leiomioma
	- Degeneração e dor
	- Aborto espontâneo

Os leiomiomas uterinos podem apresentar variações histológicas, sendo um grupo heterogêneo de tumores que podem ser subdivididos em: leiomioma celular, metastático, atípico (também conhecido como bizzaro ou pleomórfico) e de potencial maligno incerto (STUMP) (Takeda et al., 2011; Sun e Mittal, 2010; Ünver et al., 2011; Ip e Cheung, 2011).

Leiomiomas não-convencionais são tumores benignos com diagnóstico histológico difícil e geralmente ficam entre o leiomioma e leiomiossarcoma. A história natural e o potencial maligno desses tumores continuam incertos (Ng et al., 2010). Os sintomas e idade das pacientes com leiomioma não-convencional são semelhantes aos observados para o leiomioma. Clinicamente, podem ser classificados de acordo com seu potencial metastático ou recorrência, como pode ser observado na Tabela 2 (Ip et al., 2011).

Tabela 2: Classificação dos leiomiomas não-convencionais de acordo com seu comportamento clínico (Ip et al., 2011).

Classificação
Recorrente e/ou com potencial metastático
<ul style="list-style-type: none"> • Tumor de músculo liso de potencial maligno incerto • Leiomioma intravenoso • Leiomioma metastático benigno
Pouco ou não recorrente e/ou potencial metastático
<ul style="list-style-type: none"> • Leiomioma com núcleos bizarros • Leiomioma com mitose ativa • Leiomioma celular e altamente celular • Leiomioma mixóide • Leiomioma epitelióide • Leiomioma difuso

A categoria que divide os tumores uterinos em benignos e malignos é baseada nas suas características microscópicas. A distinção entre o leiomiossarcoma, leiomioma e o leiomioma não convencional é baseada em três critérios: índice mitótico, atipia nuclear e necrose celular (Lim et al., 2013).

3.2.2. Leiomiossarcoma uterino

Trata-se do sarcoma mais frequentemente encontrado no útero e corresponde a cerca de 2 % de todas as neoplasias malignas neste órgão (Oliva et al., 2002).

Em 2009, a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) atribuiu um sistema de classificação e estadiamento para o LMSU, em uma tentativa de refletir seu comportamento biológico (Tabela 3).

Os LMSU são raros, em geral, apresentam prognóstico ruim, com estimativa de vida de aproximadamente cinco anos em 50-70% dos casos no estágio I, e 0-20% para os estágios seguintes (Lin e Slomovitz, 2008; Amant et al., 2009 Pautier et al., 2000; Assoumarova et al., 2002). A média de idade da ocorrência desse tumor é de 50 anos, e apenas 15% se desenvolve em mulheres com menos de 40 anos (Cubbingham et al., 2008). Apresentam alta taxa de recidiva e mais da metade dos casos acaba por dar origem a metástases, pela via hematogênica, para órgãos distantes (em geral pulmões, ossos e cérebro) (Crum et al., 1999; Lehnhard et al., 2009; Muray et al., 2008).

Macroscopicamente os LMSU se apresentam como massas no interior do útero e podem assumir dois padrões pouco distintos, a saber: 1) massas carnosas e volumosas que invadem a parede uterina ou 2) massas polipóides que se projetam em direção ao lúmen do útero (Matsuo et al., 2009). Esses

tumores apresentam crescimento rápido, alta celularidade e necrose. Microscopicamente observa-se atipias, podendo ser encontrados desde tumores bem diferenciados até lesões anaplásicas (FEBRASGO, 2004). Sua classificação em diferentes subtipos histológicos (vide Tabela 4) é baseada em suas características celulares e nos constituintes do estroma (Ip e Cheung, 2011).

Tabela 3: Estadiamento do leiomiossarcoma uterino, segundo FIGO (2009)

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

A origem e o desenvolvimento dos sarcomas uterinos ainda são desconhecidos, a maioria dos casos apresenta-se de forma esporádica, sem etiologia específica e com cariótipos complexos (revisão em D'Angelo e Prat,

2010). No entanto, alguns autores identificaram translocações cromossômicas específicas em um número crescente de sarcomas uterinos. Esses sarcomas apresentam características clínicas semelhantes de tumores de outros locais, tais com crescimento de massas tumorais com áreas de hemorragia e necrose (Tropé et al., 2012).

Alguns autores defendem a ideia de que possa ocorrer malignização de um LMU pré-existente (Levy, 2000). Sabe-se que a maioria dos LMU e 25-70% dos LMSU expressam receptor de estrogênio (ER) e/ou receptor de progesterona (PR). Isto sugere que pelo menos um subgrupo de LMSU é originário de células miometriais que expressam esses receptores (Akhan et al., 2005; Bodner et al., 2003; Bodner et al., 2004; Gokaslan et al., 2005; Kelley et al., 2004; Leitao et al., 2004; Rao et al., 1999; Zhai YL et al., 1999).

Estima-se que apenas um em 800 tumores de musculatura lisa seja maligno, tornando estatisticamente improvável que um LMSU surja a partir de um LMU pré-existente. Devido a sua raridade e diversidade histopatológica, poucas pessoas ou mesmo poucos centros de referência podem acumular experiência adequada para trabalhar com sarcomas uterinos. Assim, a compreensão do comportamento biológico variável e as alternativas de tratamento dos LMSU ainda são limitadas, representando um desafio (Piura, 2011).

Tabela 4: Classificação histológica do leiomiossarcoma (Ip e Cheung, 2011).

Tipos histológicos	Critério de diagnóstico	Características adicionais
Células fusiformes	Qualquer das duas características seguintes: <ul style="list-style-type: none"> - Atipia difusa moderada a grave - ≥ 10 números de mitose por 10 campos de alcance; necrose tumoral 	
Epitelióide	<ul style="list-style-type: none"> - Atipia moderada a grave - ≥ 5 números de mitose por 10 campos de alcance ou necrose tumoral e ≥ 5 número de mitose por 10 campos de alcance 	> 50% células devem ser epitelial
Mixoide	Qualquer uma das seguintes características: <ul style="list-style-type: none"> - Atipia moderada a grave - $\geq$ números de mitoses por 10 campos de alcance; necrose tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> - hipocelularidade - geralmente com fronteiras infiltrativas
Rara morfologia	<ul style="list-style-type: none"> - Células xantomatosas - Rhabdomioblastos - Células gigantes de osteoclastos e lipoblastos 	

A patogênese das neoplasias malignas é estudada por grupos de pesquisa no mundo todo. Sabe-se que a transformação de células normais em células tumorais, normalmente, envolve a desregulação de vias de sinalização, inclusive daquelas que participam do desenvolvimento embrionário normal (Sales, 2012). Dentre estas vias, destaca-se a do Sonic Hedgehog que será detalhada a seguir.

3.3. Via de Sinalização do Sonic Hedgehog

O gene Hedgehog (*HH*) foi descrito pela primeira vez em um *screening* de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário da mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*) por Eric Wieschaus e Christiane Nusslein-Volhard, em 1978. A mutação do gene *HH* resultou em embriões recobertos por dentículos (projeções pontiagudas), semelhantes a um ouriço (Nusslein-Volhard e Wieschaus, 1980).

Nos seres humanos, a via de sinalização HH é crucial para o desenvolvimento normal e morfogênese de vários órgãos como cérebro, medula, estruturas craniofaciais, pulmão, dentes, olhos, cabelo e membros (Wicking e McGlinn, 2001; Ingham e McMahon, 2001). Além disso, o gene HH desempenha papel na hematopoiese (Bharwaj et al., 2001) e na formação de tumores (Toftgard, 2000).

Nos vertebrados, a família de proteínas HH é constituída por três membros: DHH (*Desert*), IHH (*Indian*) e SHH (*Sonic*). Atualmente, a via de sinalização do SHH é a mais estudada, está envolvida no desenvolvimento embrionário e também na regulação e renovação de células tronco em adultos (Beachy et al., 2004).

O sistema HH possui como receptor transmembrânico o Patched (PTCH), proteína que atravessa 12 vezes a membrana citoplasmática, e Smoothened (SMO) como transdutor obrigatório de sinal, que atravessa 7 vezes a membrana (revisão em Jiang e Hui, 2008). PTCH contém um domínio sensível ao esterol (SSD), um motivo encontrado em proteínas implicadas no tráfico intracelular de colesterol, que leva a supressão de SMO (Strutt et al.,

2001). Este último, pertence à família de receptores acoplados a proteína G (Ruiz-Gomes et al., 2007).

As proteínas GLI (1-3) são fatores de transcrição que atuam na repressão ou ativação de genes a jusante à via. GLI 1 atua exclusivamente como ativador transcricional, enquanto GLI 2 e GLI 3 se apresentam como fatores de transcrição bi-funcionais. Ambos apresentam região C-terminal ativadora e N-terminal repressora (Jacob e Briscoe, 2003; Villavicencio et al., 2000).

Na ausência de SHH, PTCH se mantém ligada a SMO e mantém os fatores de transcrição GLI no citoplasma, como um complexo inativo com outras proteínas como SUFU e FUSED. A proteína SUFU atua evitando a translocação nuclear das proteínas GLI e da β -catenina (molécula efetora da via do WNT) (Cheng e Bishop, 2002; Paces-Fessy et al., 2004). FUSED atua como um regulador positivo da via do HH, neutralizando os efeitos repressivos de SUFU nas células, por meio da estabilização das proteínas GLI (Alves et al., 1998).

HHIP 1 (HH interaction protein) é um regulador negativo da via, atuando na internalização de SMO (Ochi et al., 2006). Assim como PTCH, HHIP 1 é regulado diretamente pela via e sua inativação pode se dar pela ação das proteínas GLI ou por hipermetilação na região promotora do gene que o codifica (Kar et al., 2012).

De modo geral, a ativação da via ocorre quando o SHH secretado se liga ao PTCH, permitindo a liberação da proteína SMO que age sobre os fatores de transcrição GLI (Ruiz et al., 2007) (Figura 3). Assim, essa ligação faz com que as proteínas citoplasmáticas GLI sejam translocadas para o núcleo da célula,

promovendo a transcrição de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como por exemplo: *MYC-N*; *CCND1*; entre outros (Alberts., 2010; Pasca e Hebrok., 2003; Karhadkar et al., 2004; Lum e Beachy., 2003).

Figura 3: Via de sinalização do HH (www.qiagen.com). Na ausência do ligante PTCH exerce efeito inibitório sobre SMO, bloqueando a cascata da via. Na presença do ligante HH, PTCH libera SMO que interage com FU, promovendo a ativação e translocação de GLI para o núcleo. Essa translocação culmina com a ativação da transcrição de genes alvo da via.

Os sinais do HH são traduzidos através da família Patched, composta por PTCH 1, PTCH 2 e co-receptores CDON, BOC ou GAS1 (Hahn et al., 1996;

Johnson et al., 1996; Carpenter et al., 1998; Tenzen et al., 2006; McLellan et al., 2008). Como dito anteriormente, a ligação de HH aos receptores PTCH leva a ativação do transdutor de sinal SMO (Van den Heuvel e Ingham 1996; Gallet e Trerond 2005) e MAP3K10 (Kato et al., 1995; Varjosalo et al., 2008), induzindo a inativação de SUFU e resultando no acúmulo dos membros da família GLI no núcleo celular (revisão em Hui e Angers, 2011). Em seguida, ocorre a indução da transcrição de genes reguladores alvos do HH, envolvidos na retroalimentação na via, proliferação e sobrevivência da célula, e na transição epitélio-mesenquimal (Wilkinson et al., 2013).

A expressão do HH é regulada por mecanismos de retroalimentação positiva e negativa que podem ser inibidos por mutações nos genes da via ou por mecanismos epigenéticos (revisão em Onishi e Katano, 2011). Interações com outras vias de sinalização, incluindo Notch, PI3K, RAS-MEK/AKT e NF-KB, promovem o crescimento e recorrência do câncer e, potencialmente, a resistência à quimioterapia (Schreck et al., 2010; Buonamici et al., 2010; Kasperczyk et al., 2009; Stecca et al., 2007).

3.4. Via do Sonic Hedgehog e o desenvolvimento de tumores

A importância da sinalização do HH em tecido maligno foi sugerida primeiro pela identificação do aumento na expressão de GLI 1 em células de glioma maligno. Outra evidência para o envolvimento da via de sinalização do HH em tecidos malignos vem de estudos em pacientes com a síndrome do nevo basocelular (SNBC) também conhecida como síndrome de Gorlin (Gorlin e Goltz, 1960). Essa síndrome é caracterizada por mutações que inativam o

PTCH 1, levando à liberação de SMO e consequentemente ativando a via (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996).

Estudos em carcinoma basocelular (CBC) também forneceram evidências da ativação dessa via independente do ligante HH na maioria dos tumores (Dahmane et al., 1997), de modo que a ativação ocorre devido a mutações no PTCH 1 ou SMO (Xie et al., 1998). A identificação dessas mutações sugere que a desregulação na expressão de membros da via de sinalização do HH contribui para a patogênese tumoral (Ruch e Kim, 2013). Essa desregulação resulta na transcrição de genes responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular (Figura 4) (Lin e Matsui, 2012).

Muitos estudos demonstraram a desregulação da via do SHH em diversos tipos de câncer, entre eles: o câncer de mama, cólon, esôfago, pulmão, estômago, endométrio e pâncreas (Taylor et al., 2002; Levanat et al., 2004, Berman et al., 2003, Berman et al., 2004; Kubo et al., 2004; Martin et al., 2005; Watkins et al., 2003; Feng et al., 2007). Além disso, a presença de mutações em genes relacionados com a via também foi associada ao desenvolvimento de tumores (Figura 5).

Figura 4: Características da via de sinalização do HH em câncer. Diferentes mecanismos moleculares pelos quais o HH constitutivamente ativo age na iniciação, proliferação e manutenção da transformação maligna e tumorigenese em diversos tipos de câncer. Sua ação afeta propriedades tumorigenicas como elevado comportamento metastático e sobrevivência celular pela super-expressão de mediadores anti-apoptóticos (Bcl-2), aumento da proliferação através da modulação da maquinaria de ciclo celular e promoção da invasão pela redução de E-caderina mediada pela expressão de Snail (Kar et al., 2012).

Figura 5: Mecanismos que resultam na ativação constitutiva aberrante da via do HH em câncer. Foram descritos dois mecanismos: o primeiro envolve mutações genéticas e alterações epigenéticas, enquanto o segundo resulta da a super-expressão do ligante HH e/ou marcadores moleculares/fatores de transcrição downstream à via (Kar et al.,2012).

Rubin e Sauvage (2006) propuseram três modelos básicos de ação da via no câncer (Figura 6). O primeiro é independente da presença do ligante HH. Nesse caso, os tumores apresentam mutações ativadoras em outros membros da via. O segundo depende do HH autócrino, de modo que este ligante é produzido pela própria célula tumoral ou vizinha. O terceiro é dependente do ligante, com sinalização parácrina, podendo ter duas variantes: uma, onde o

HH é secretado pelo epitélio tumoral e recebido por células do estroma circundante, e a outra em que HH é secretado a partir de células estromais e recebido por células tumorais (Cohen, 2012).

Figura 6: Três modelos de ativação da via do HH em câncer (Cohen, 2012).

A despeito de tudo que foi exposto quanto a importância da via do SHH nos diferentes tipos de tumor, não existem estudos na literatura sobre seu perfil de expressão ou seu papel biológico em tumores mesenquimais do útero. Uma vez que não são conhecidos, ao certo, a origem desses tumores e nem os

mecanismos envolvidos em seu processo de malignização, nos propusemos a investigar o perfil de expressão transcricional e protéico de moléculas envolvidas nessa via em leiomiomas (incluindo suas variantes não-convencionais) e leiomiossarcomas.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Pacientes e espécimes anatomopatológicos

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia; pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o parecer 0845/11 (Anexo 01) e pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital AC Camargo Cancer Center, sob o parecer 1815/13 (Anexo 02). As amostras de leiomiossarcoma foram fornecidas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C Camargo Cancer Center, SP. Foram obtidas 76 amostras de tecidos emblocadas em parafina (37 leiomiossarcomas e 39 leiomiomas, incluindo 16 leiomiomas não convencionais). Os dados clínicos das pacientes foram coletados dos prontuários disponibilizados pela instituição.

Amostras frescas de leiomioma foram obtidas a partir de 130 intervenções cirúrgicas no período de maio a novembro de 2012. As pacientes foram atendidas no setor de leiomioma uterino, na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). As pacientes selecionadas receberam informações detalhadas sobre a pesquisa e concordaram espontaneamente em participar, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 03).

Das pacientes submetidas à intervenção cirúrgica, foram selecionadas 80 amostras de leiomiomas uterinos e 20 amostras de miométrio. As demais amostras foram excluídas pelo patologista por não apresentar fração significativa de tecido avaliável. Os critérios de exclusão para coleta das amostras foram: neoplasia uterina maligna pré-existente e doenças infecto-contagiosas. Inicialmente, as pacientes foram entrevistadas para coletas de dados como: Idade, peso, altura, número de gestações, partos, abortos, idade

da primeira menstruação, tratamentos, sintomas, entre outros (Anexos 04 e 05).

Um fragmento de cada amostra foi armazenado em formol tamponado a 10%, para análise imunoistoquímica; e outro fragmento foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-80°C), para análise de expressão gênica.

Todas as amostras foram submetidas a revisão de diagnóstico pelo patologista responsável (Dra Isabela W Cunha).

4.2. Processamento histológico

Nesta etapa, as amostras fixadas em formol tamponado foram submetidas às seguintes etapas: desidratação com álcool etílico; diafanização com xilol; impregnação com parafina histológica líquida em estufa a 60°C; inclusão em parafina à temperatura ambiente. Os blocos de parafina contendo o material biológico foram seccionados em micrótomo (Microm HM315 R) ajustado para 4 µm. Os cortes obtidos foram depositados em lâminas e mantidos em estufa a 60°C, durante 24 horas, para secagem. Em seguida, foi realizada a coloração pela hematoxilina e Eosina (H.E.) para revisão histológica para continuidade do estudo.

4.3. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

4.3.1. Extração de RNA das amostras congeladas

Os RNAs das 100 amostras (leiomioma e miométrio) congeladas foram extraídos pelo método do Trizol® (Life Technologies, EUA), seguindo as

especificações do fabricante. A purificação dos RNAs foi realizada utilizando o *Pure Link RNA Mini kit* (Ambion®). Para eliminação de possível contaminação com DNA genômico foi realizada a incubação com *DNase I* (Qiagen) por 15 minutos a temperatura ambiente.

O RNA livre de DNA foi avaliado quanto a sua concentração e pureza, em espectrofotômetro (*NanoDrop*, Thermoscientific), e integridade, em gel de agarose 1% (Figura 7). Posteriormente, foi necessária nova quantificação no aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies, EUA) para a síntese de cDNA. Em seguida, o material genético foi armazenado a - 80°C para posterior utilização nas reações de PCR em Tempo Real.

Figura 7: Gel representativo do perfil eletroforético das amostras de RNA total em gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídeo. As bandas de 28S e 18S estão indicadas. Todas as amostras apresentaram perfil semelhante.

4.3.2. Extração de RNA das amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE)

Os RNAs de 53 amostras (leiomiossarcoma n=37 e leiomioma não convencional n= 16) foram extraídos a partir dos blocos de parafina com auxílio do *kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System* (Promega). Após tratamento

para eliminação de DNA genômico e quantificação, como descrito no item anterior, as amostras foram armazenadas a - 80°C para posterior utilização.

4.3.3. Síntese de cDNA (DNA complementar)

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2µg do RNA total, utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies), seguindo especificações do fabricante. Para checar a eficiência da reação de transcrição reversa e possível contaminação com DNA genômico, foram realizadas reações de PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene da β -actina (Figura 08).

Figura 8: Gel representativo do perfil eletroforético das amostras de cDNA amplificadas para o gene da β -actina em gel de agarose 2% impregado com brometo de etídeo. A seta indica o produto de amplificação na reação de PCR (~ 60 pb) nas amostras obtidas de tecido congelado e parafinado (FFPE).

4.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A análise da expressão de genes envolvidos, direta ou indiretamente, na via do Sonic Hedgehog foi realizada utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes *TaqMan® PCR Master Mix* (Life Technologies), seguindo

as especificações do fabricante. Foi utilizada a plataforma *Quant Studio™ 12K Flex Open Array* (Life Technologies), contendo 112 genes. Os controles endógenos selecionados para composição do chip foram os genes da *ACTB* (Beta actina), *B2M* (Beta 2 microglobulina), *GAPDH* (Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase), *GUSB* (Beta Glucuronidase), *HPRT1* (Hipoxantina fosforibosil transferase 1) e *RPLP0* (Proteína ribossomal p0). No Anexo 06 podem ser visualizadas as identificação e referência das sequências dos ensaios fornecidos pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata no volume final de 5 µl, contendo 1,2 µl de cDNA e 3,8 µl PCR Master Mix. A quantificação dos transcritos foi realizada pelo método do DDCT, utilizando o *Expression Suite Software v1.03* (Life Technologies).

4.5. Construção do microarranjo de tecido (TMA)

Os blocos, contendo as áreas selecionadas pelo patologista, foram utilizados para construção de dois TMAs. O primeiro contendo as amostras de miométrio e leiomioma (20 e 80 casos, respectivamente), e o segundo contendo amostras de leiomiossarcoma, leiomioma e leiomioma não convencional (37, 23 e 16 casos, respectivamente). As áreas representativas dos tecidos foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual *Tissue Arrayer 1* (Benchmar Instruments Micro-array technology, EUA). Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes dos tecidos e depositados de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata com espaço de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes

seriados do bloco de TMA (4µm) foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®), recobertas com adesivo e submetidas à fixação por UV (Instrumedics Inc®, NJ). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e armazenadas em freezer a - 20°C.

4.6. Reações de imunoistoquímica (IIQ)

As lâminas de TMA foram utilizadas nas reações de imunoistoquímica, para os anticorpos monoclonais contra: SHH, PTCH 1, SMO, GLI 1, GLI 2, GLI 3, HHIP 1 e SUFU, segundo as instruções do fabricante de cada anticorpo. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, hidratadas em concentrações crescentes de álcool (100, 80 e 70%). A etapa de recuperação antigênica e diluição foram padronizadas individualmente para cada anticorpo (Tabela 5). O bloqueio da peroxidase endógena e proteínas inespecíficas foram obtidos com peróxido de hidrogênio e leite desnatado (Molico), respectivamente. Entre esta e todas as etapas seguintes foram realizados 3 banhos de 5 min. com PBS 1X (0,13M de NaCl; 2,6mM de KCL; 8mM de Na₂HPO₄; 1,7mM de KH₂PO₄). A incubação com anticorpo primário foi de 2 horas à temperatura ambiente. O sistema de amplificação e detecção utilizado foi o LSAB (DAKO). A revelação foi feita com DAB a 1:50, por no máximo 5 minutos, e os cortes foram contra-corados com Hematoxilina e montados com lamínula utilizando meio de montagem (Ver-Mount, Easy Path).

Tabela 5: Condições padronizadas para cada um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.

Anticorpo	Marca	Fonte	Diluição	Recuperação antigênica
SHH	Abcam	Monoclonal de coelho	1:50	Panela de Pressão EDTA pH 8.0
PTCH 1	Abcam	Policlonal de coelho	1:100	Panela de Pressão Citrato pH 6.0
SMO	Abcam	Policlonal de coelho	1:100	Panela de Pressão Citrato pH 6.0
GLI 1	Abcam	Policlonal de coelho	1:200	Panela de Pressão Citrato pH 6.0
GLI 2	Abcam	Policlonal de coelho	1:200	Banho Maria Citrato pH 6.0
GLI 3	Abcam	Policlonal de coelho	1:400	Banho Maria Citrato pH 6.0
SUFU	Abcam	Monoclonal de coelho	1:50	Panela de Pressão Citrato pH 6.0
HHIP 1	Abcam	Policlonal de coelho	1:200	Banho Maria Citrato pH 6.0

Para análise das reações de imunoistoquímica foi utilizada uma escala visual de intensidade de coloração (0 negativo, 1 fraco, 2 moderado e 3 forte) e porcentagem de células marcadas 0 (<10%), 1 (≥ 10 <25%), 2 (≥ 25 <50%), 3 (≥ 50 <75%) e 4 ($\geq 75\%$). As escalas foram multiplicadas, resultando num *range* 0 a 12. O escore final foi definido como fraco (≤ 4), moderado (> 4 e ≤ 8) e forte (> 8 e ≤ 12).

4.7. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos e sua associação com os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes foi realizada utilizando o *SPSS 13.0 Software* (SPSS Inc. Chicago. IL, USA).

Foi realizado o teste Kolmogorov –Smirnov para determinar se os dados apresentavam distribuição paramétrica ou não. Para os dados com distribuição paramétrica foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Anova seguido pelo pós-Test Hoc ou teste exato de Fisher. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ou Man Whitney.

Para a correlação dos dados foi utilizado o teste de Correlação de Pearson. Nas análises de sobrevida câncer específica e livre de doença foi empregado o teste de Kaplan-Meier. A diferença entre as curvas de sobrevida foi avaliada pelo *Logrank*. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

Para fins de comparação, os dados clínicos, anatomopatológicos e moleculares foram considerados de acordo com os tecidos avaliados. Assim, foram criados os seguintes grupos: LMU (leiomioma uterino clássico ou convencional), LMAU (leiomioma uterino com características atípicas ou não convencionais) e LMSU (leiomiossarcomas). Todas as análises foram realizadas em relação com o miométrio normal (MM), considerado como amostra referência.

5.1. Dados Clínicos e Anatomopatológicos

A média de idade das pacientes com LMU, LMAU e LMSU foram respectivamente 44 ($\pm 7,0$), 43($\pm 9,0$) e 50 (± 14) anos. 55% das pacientes com LMSU eram caucasianas, 13% não caucasianas e 5% asiáticas. Os casos de LMAU e LMSU tiveram seguimento de 51 meses (± 60) e 37 meses (± 54), respectivamente. O número de pacientes na menopausa é de 6% e 46% nos LMAU e LMSU, respectivamente. Os dados clínicos adicionais das pacientes com LMSU estão apresentados na Tabela 06.

As pacientes com LMU apresentaram IMC (índice de massa corporal) de 28% kg/m² (± 6.7) e idade da menarca de 13 anos (± 2); 38% eram nulíparas; 62% não fumantes, 48% apresentaram patologias associadas e 77% realizaram histerectomia.

Tabela 6 - Características clínicas e achados operatórios das pacientes com leiomiossarcoma (LMSU)

Variáveis	Categorias	N (%)
Raça	Branca	22 (59,5)
	Negra	3 (8,1)
	Parda	2 (5,4)
	Amarela	2 (5,4)
	Ignorado	8 (21,6)
Menopausa	Sim	17 (45,9)
	Não	20 (54,1)
Forma de diagnóstico	Curetagem	7 (18,9)
	Histeroscopia	1 (2,7)
	Biópsia de colo	1 (2,7)
	Achados pós operatórios	26 (70,3)
	Ignorado	2 (5,4)
Sintomas iniciais	Assintomático	4 (10,8)
	Dor pélvica	10 (27,0)
	Sangramento vaginal	15 (40,5)
	Corrimento vaginal	1 (2,7)
	Massa pélvica	4 (10,8)
	Ignorado	3 (8,1)
Local da cirurgia	HAAC	16 (43,2)
	fora	21 (56,8)
Linfonodomegalia no Intraoperatório	Não	19 (51,4)
	Sim	4 (10,8)
	Ignorado	14 (37,8)
Linfadenectomia	Não	31 (86,1)
	Sim	5 (13,9)
Estadiamento FIGO	I	18 (48,6)
	II	6 (16,2)
	III	4 (10,8)
	IV	9 (24,3)
Quimioterapia*	Não	19 (54,3)
	Com antraciclinas	6 (17,1)
	Sem antraciclinas	10 (28,6)
Radioterapia externa (cGy)	Não	29 (82,9)
	Sim	6 (17,1)
Braquiterapia	Não	31 (88,6)
	Sim	4 (11,4)

*Para 2 casos não havia informação sobre tratamento adjuvante.

O diagnóstico de leiomiosarcoma restrito ao útero foi realizado em todos os casos após cirurgia primária para tratamento de suposto leiomioma. As cirurgias primárias foram histerectomia e miomectomia, na maioria das pacientes.

Das 37 pacientes com leiomiossarcoma, 32,4% não apresentaram recidiva, 43,2% apresentaram recidiva e 24% apresentaram persistência da doença (estádio clínico IV). Das pacientes que apresentaram recidiva, 42,1% foi local, 47,4% à distância e 10,5% apresentaram tanto recidiva local quanto à distância. O tempo médio para recidiva foi de 16 meses e a mediana, de 12 meses, variando de 4,6 a 69 meses.

Dentre as pacientes com leiomiossarcoma em estágio I, 25% realizaram quimioterapia e 18,7% radioterapia adjuvante. Considerando neoplasias em estágio II, III ou IV, 63,1% realizaram quimioterapia e 15,7% realizaram radioterapia.

5.2. Histomorfologia dos tecidos

Foram avaliados, no total, 20 miométrios, 119 leiomiomas, (sendo 16 leiomiomas não convencionais) e 37 leiomiossarcomas. Os cortes histológicos de todas as amostras foram corados por Hematoxilina e Eosina (Figura 9), e avaliados pela patologista Dra. Isabela Werneck da Cunha. As áreas representativas dos tumores e de tecido normal foram selecionadas e marcadas para construção dos blocos de tissue microarray (TMA).

Figura 9: Fotomicrografias dos tecidos corados por HE (40x). Em A, miométrio normal; B, leiomioma uterino; C, leiomioma uterino não convencional e D; leiomiossarcoma uterino. As setas indicam algumas atipias celulares características dos leiomiomas não convencionais.

5.3 Expressão de genes relacionados à via do SHH

As análises de expressão dos genes envolvidos, direta e indiretamente, na via de sinalização do SHH foram realizadas em amostras congeladas (MM e LMU) e FFPE (MM, LMU, LMAU e LMSU). Das amostras congeladas foram avaliados 20 MM e 80 LMU. E das amostras FFPE foram avaliados 5 MM, 5 LMU, 10 LMAU e 17 LMSU. Foram excluídos casos de LMAU e LMSU em que não foi possível obter quantidade necessária de RNA total (2µg) para realização da PCR em tempo real na plataforma selecionada.

Para evitar viés entre os resultados devido à origem dos tecidos, algumas amostras de MM e LMU foram avaliadas por PCR, utilizando tanto o RNA de tecido congelado quanto FFPE. Porém as comparações finais foram realizadas considerando somente as amostras pareadas de acordo com a sua preparação.

Os valores de quantificação relativa (RQ) e do *fold* de regulação (FR) dos genes estão representados na tabela 7. Foram considerados como genes hiperexpressos aqueles que apresentaram os valores dos *folds* de regulação > +2 (vermelho) e genes hipoexpressos com valores < -2 (verde) (tabela 07).

Dentre todos os genes avaliados, somente *PTCH 1* mostrou tendência à hipoexpressão, com FR de -1,894 nos LMU. Os demais receptores e cofatores da via quando apresentaram diferença de expressão no perfil de expressão, foi para hiper-regulação em relação ao grupo referência (miotômio).

As amostras de LMSU apresentaram hiperexpressão para todos os fatores de transcrição e reguladores avaliados. Nos LMAU somente os genes *GSK3B* (*Glycogen synthase kinase 3 beta*) e *GLI 3* não foram hiperexpressos. Já para os LMU, somente o gene *GLI 1* foi hiperexpresso (tabela 7).

Os genes alvo e demais genes avaliados da via do SHH apresentaram perfis de expressão semelhantes nas amostras de LMAU e LMSU. Já nos LMU, os genes *BCL-2* (B-cell CLL/lymphoma 2), *HHAT* (Hedgehog acyltransferase), *SLC2A4* (*Facilitated glucose transporter member 4*), *FOX E1* (*Forkhead box E1*), *SFRP1* (*Secreted frizzled-related protein 1*) e *SFRP4* (*Secreted frizzled-related protein 4*) mostraram-se hiperexpressos (tabela 7).

Os receptores hormonais avaliados *ESR1* (receptor de estrogênio α), *PGR* (receptor de progesterona), *PRL* (prolactina), *PRLR* (receptor de

prolactina), foram todos hiperexpressos nos LMU. Nos LMAU somente o *PGR* não apresentou hiperexpressão. As amostras de LMSU não mostraram diferença na expressão de *PGR* e *PRLR* (tabela 7).

Tabela 7: *Fold* de regulação (FR) e quantificação relativa (RQ) dos genes.

Função	Gene	LMU		LMAU		LMSU	
		RQ	Fold	RQ	Fold	RQ	Fold
Ligantes e reguladores	<i>SHH</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>DHH</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>IHH</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>HHIP 1</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Receptores e cofatores do HH	<i>PTCH 1</i>	0,269	-1,894	21,183	4,405	6,999	2,807
	<i>PTCH 2</i>	4,163	2,058	1,907	0,932	2,012	1,009
	<i>SMO</i>	4,265	2,093	12,081	3,595	11,314	3,500
	<i>RAB23</i>	1,887	0,916	7,077	2,823	3,584	1,842
Fatores de transcrição e reguladores do HH	<i>GLI 1</i>	5,021	2,328	42,383	5,405	8,304	3,054
	<i>GLI 2</i>	2,299	1,201	12,840	3,683	8,018	3,003
	<i>GLI 3</i>	0,861	-0,216	3,175	1,667	6,837	2,773
	<i>SUFU</i>	3,706	1,890	6,188	2,629	12,505	3,644
	<i>CTNNB1</i>	1,982	0,987	8,645	3,112	6,745	2,754
	<i>GSK3B</i>	2,183	1,126	3,720	1,895	5,876	2,555
Genes alvos do HH	<i>BCL-2</i>	9,497	3,247	12,238	3,613	5,188	2,375
	<i>WNT2B</i>	1,589	0,668	16,206	4,018	8,219	3,039
	<i>WNT5A</i>	1,746	0,804	NA	NA	1,173	0,231
	<i>CCND1</i>	2,854	1,513	8,390	3,069	4,308	2,107
	<i>CCND2</i>	1,595	0,674	4,976	2,315	5,541	2,470
	<i>VEGFA</i>	0,991	-0,014	2,669	1,416	3,363	1,750
Outros Genes	<i>DVL1</i>	1,946	0,961	16,143	4,013	8,395	3,070
	<i>DVL2</i>	1,986	0,990	4,703	2,233	4,802	2,264
	<i>HHAT</i>	5,876	2,555	8,520	3,091	5,863	2,552
	<i>SLC2A3</i>	0,534	-0,904	2,479	1,310	2,854	1,513
	<i>SLC2A4</i>	9,592	3,262	30,135	4,913	6,578	2,718
	<i>GREM1</i>	5,074	2,343	14,928	3,900	18,498	4,209
	<i>GSK3A</i>	1,786	0,837	4,090	2,032	7,796	2,963
	<i>AXIN1</i>	1,234	0,303	11,983	3,583	7,618	2,929
	<i>FOXE1</i>	4,163	2,058	20,958	4,389	9,735	3,283
	<i>FZD1</i>	2,376	1,248	10,787	3,431	6,279	2,651
	<i>FZD2</i>	5,229	2,387	21,070	4,397	3,625	1,858
	<i>FZD4</i>	0,971	-0,042	2,967	1,569	1,127	0,173
	<i>FZD5</i>	3,343	1,741	13,544	3,760	5,962	2,576
	<i>FZD9</i>	3,064	1,616	17,371	4,119	2,645	1,403
	<i>IFT52</i>	3,066	1,616	5,738	2,521	4,562	2,190
	<i>LATS1</i>	1,334	0,415	3,905	1,965	9,577	3,260
	<i>LEF1</i>	2,125	1,088	26,535	4,730	1,834	0,875
	<i>MAPK8</i>	1,500	0,585	9,193	3,201	2,755	1,462
	<i>MMP7</i>	2,755	1,462	6,290	2,653	1,614	0,691
	<i>PTEN</i>	1,073	0,101	7,335	2,875	4,768	2,253
	<i>SFRP1</i>	11,407	3,512	8,007	3,001	1,932	0,950
	<i>SFRP4</i>	12,947	3,695	9,211	3,203	10,605	3,407
	<i>RHOA</i>	1,505	0,590	3,460	1,791	9,957	3,316
	<i>TCF7L1</i>	1,882	0,912	4,931	2,302	13,444	3,749
	<i>TLE1</i>	2,285	1,192	2,617	1,388	4,126	2,045
	<i>TP53</i>	1,966	0,975	5,132	2,359	3,289	1,718
	<i>WIF1</i>	1,944	0,959	15,656	3,969	4,119	2,042
	<i>WISP1</i>	1,562	0,643	5,725	2,517	10,775	3,430
Receptores hormonais	<i>ESR1</i>	8,495	3,087	8,647	3,112	8,334	3,059
	<i>PGR</i>	5,975	2,579	3,070	1,618	0,639	-0,647
	<i>PRL</i>	11,057	3,467	15,708	3,973	4,795	2,261
	<i>PRLR</i>	6,978	2,803	10,683	3,417	2,892	1,532

NA – Não avaliável

Em relação ao MM, os LMSU mostraram, *FZD2* (*Frizzled family receptor 2*, $p=0.039$), *FZD8* (*Frizzled family receptor 8*, $p=0,028$), *GSK3A* (*Glycogen synthase kinase 3 alpha*, $p=0.047$), mostraram diferença significativa de expressão. Os LMAU, mostraram diferenças na expressão de *FZD3* (*Frizzled family receptor 3*, $p=0.019$), *FZD7* (*Frizzled family receptor 7*, $p=0.029$), *PGR* (*Receptor de progesterona*, $p=0.027$) e *PRLR* (*Receptor da prolactina* $p=0.0270$). Entre LMU e LMSU, *PGR* (*Receptor de progesterona*, $p=0.016$) foi mais expresso nos LMSU. Entre LMAU e LMSU, foi observado *PGR* (*Receptor de progesterona*, $p=0.042$) e *PRLR* (*Receptor da prolactina* 0.039) com diferença significativa de expressão.

Diversos genes apresentaram diferenças na regulação de expressão (hipo ou hiperexpressão) em relação aos dados clínico patológicos das pacientes. Os dados estão apresentados na tabela 08

Tabela 8: Correlação entre expressão gênica e os dados clínico-patológicos das pacientes.

	MM	LMU	LMAU	LMSU
Caucasiana	<i>DVL2, FZD1, WNT3,</i> <i>AXIN2, DVL1, DVL2,</i> <i>FZD6, FZD9*,</i> <i>GSK3B, PCTH1,</i> <i>RHOA*, SLC2A3*,</i> <i>TCL7</i>	<i>SLC2A1, WNT7B</i>		
IMC até 25				
Gravidez	<i>WNT10B, WNT5B</i>	<i>IHH, WNT7A</i>		
Aborto	<i>CSNK1A1, CSNK2A1,</i> <i>GSK3A, WNT9B</i>	<i>CSNK1A1, IHH,</i> <i>PTCH 2, SMO</i> <i>WNT7A, WNT10B</i>		
Paridade	<i>BMP7 WNT5B</i>	<i>SHH</i>		
Contraceptivo oral	<i>CTNNB1, FZD2, WNT6</i>	<i>FZD2, FZD6, MMP7</i> <i>PRL, SHH, SLC2A4,</i> <i>WNT3, WNT7B</i>		
Patologias associadas	<i>BMP8, CCDN1,</i> <i>GREM1 SFRP4,</i> <i>WISP1, WNT2B</i>	<i>APC, AXIN2, CCND1,</i> <i>DISP1, DVL1,</i> <i>FZD3FZD5, GLI 2,</i> <i>GSK3B, LATS1,</i> <i>PTCHD1, PTCHD3,</i> <i>RAB23, SUFU,</i> <i>WNT9B</i>		
Menarca <12 anos	<i>GLI 1</i>	<i>WISP1, WNT18</i>		
Tratamento para o LMU	<i>BCL-2, BMP2, BMP4,</i> <i>ESR1, FZD2, FZD6,</i> <i>LATS1, LEF1, MAPK8,</i> <i>PTCH 1, SFRP4, SMO,</i> <i>TLE1</i>			
Idade >50 anos			<i>FZD4,</i> <i>TP53</i>	<i>WISP1</i>
IMC >25		<i>DISP1, FZD2,</i> <i>WNT7A, WNT9B</i>		
1-3 Nódulos		<i>FGF9</i>		
Histerectomia		<i>SHH</i>		
Tabagismo		<i>BCL-2, DISP1, DVL1,</i> <i>FZD4</i>		
Menopausa				<i>AXIN1, FZD9,</i> <i>HHAT, MTSS1,</i> <i>PTCH 2, SUFU,</i> <i>TLE1</i>
Tumor maior >5cm				<i>PRLR</i>
Tumor ≤8cm				<i>GLI 2, SLC2A3</i>

* p valor ≤0.001

Verde = Hipoexpressão

Vermelho = Hipoexpressão

As análises de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida câncer específica (SCE) foram realizadas considerando os valores de *fold* de regulação < -1 e $> +1$, onde valores dentro desse intervalo foram considerados normais (iguais ao das amostras referência). Valores maiores que 1 foram considerados hiperexpresso e menores que -1 hipoexpressos.

Foram observados valores estatisticamente significativos para os genes: *AXIN2* (*Axin 2*), *FZD2*, *CCND1* (*Cyclin D1*), *FZD6* (*Frizzled family receptor 6*), *ERS1* e *IF52* (*Intraflagellar transport 52 homolog*) quanto à sobrevida livre de doença (Figura 10). Os genes *FZD3*, *FZD8* e *WISP1* (*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*) mostraram associação significativa com sobrevida cancer específica (Figura 11).

As pacientes com hiperexpressão do gene *AXIN2* apresentaram menor sobrevida quando comparadas com as pacientes com expressão normal ou reduzida (hipoexpressão) desse gene. Para os genes *FZD2*, *CCND1*, *FZD6*, *ERS1* e *IF52* foi observado que as pacientes com hipoexpressão têm uma melhor SLD em relação às pacientes com expressão normal (Figura 10). As pacientes com expressão normal ou hiporegulada dos genes *FZD3*, *FZD8* e *WISP1* mostraram uma menor SCE (Figura 10).

Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida livre de doença (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão gênica de *AXIN2*, *FZD2*, *CCND1*, *FZD6*, *ESR1* e *IFT52*.

Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida câncer específica (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão gênica de *FZD3*, *FZD8* e *WISP1*.

5.4 Expressão das proteínas da via do Sonic hedgehog

As proteínas da via do HH foram avaliadas quanto à intensidade de reação e frequência de células marcadas nas amostras de MM, LMU, LMAU e LMSU. Inicialmente o escore (intensidade x frequência) dos marcadores foi dividido em negativo, fraco, moderado e forte, para a realização da análise

estatística. As amostras com expressão negativa foram excluídas e a frequência de amostras positivas (número de amostras com positividade moderada e forte) estão apresentadas na tabela 9. Os perfis de expressão geral das proteínas nos tecidos avaliados estão representados nas figuras 12-15.

Tabela 09: Frequência de expressão das proteínas nos tecidos avaliados

Tecidos	Proteínas (%)							
	SHH	PTCH 1	SMO	SUFU	GLI 1 [#]	GLI 2 [#]	GLI 3 [#]	HHIP 1 [#]
MM	20	100*	-	-	-	95	-	100
LMU	19	79	15	30	12,6	69	17	47
LMAU	37	75	37	50	56	62	37	43
LMSU	40	76	51	70	59	65	30	30
TOTAL[†]	45	142	41	65	44	124	35	87

*Somente expressão moderada de PTCH 1

[#] Somente expressão nuclear

[†] Número absoluto de amostras positivas (moderado e forte)

Figura 12: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de miométrio. O painel de fotomicrografia mostra exemplos somente de marcação moderada ou forte dessas proteínas nas amostras. Em A: SHH, B: PTCH 1, C: SUFU, D: SMO, E: GLI 1, F: GLI 2, G: GLI 3 e H: HHIP 1 em 400X. O gráfico apresenta os escores semiquantitativos de intensidade e frequência dos alvos nas amostras de MM. A linha pontilhada indica o valor indicado de corte (3), valores inferiores foram considerados como negativos nas análises de frequência.

Figura 13: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomioma. O painel de fotomicrografia mostra exemplos somente de marcação moderada ou forte dessas proteínas nas amostras. Em A: SHH, B: PTCH 1, C: SUFU, D: SMO, E: GLI 1, F: GLI 2, G: GLI 3 e H: HHIP 1 em 400X. O gráfico apresenta os escores semiquantitativos de intensidade e frequência dos alvos nas amostras de LMU. A linha pontilhada indica o valor indicado de corte (3), valores inferiores foram considerados como negativos nas análises de frequência.

Figura 14: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomioma não convencional. O painel de fotomicrografia mostra exemplos somente de marcação moderada ou forte dessas proteínas nas amostras. Em A: SHH, B: PTCH 1, C: SUFU, D: SMO, E: GLI 1, F: GLI 2, G: GLI 3 e H: HHIP 1 em 400X. O gráfico apresenta os escores semiquantitativos de intensidade e frequência dos alvos nas amostras de LMAU. A linha pontilhada indica o valor indicado de corte (3), valores inferiores foram considerados como negativos nas análises de frequência.

Figura 15: Perfil imunoistoquímico de SHH, PTCH 1, SUFU, SMO, GLI 1-3 e HHIP 1 nas amostras de leiomiossarcoma. O painel de fotomicrografia mostra exemplos somente de marcação moderada ou forte dessas proteínas nas amostras. Em A: SHH, B: PTCH 1, C: SUFU, D: SMO, E: GLI 1, F: GLI 2, G: GLI 3 e H: HHIP 1 em 400X. O gráfico apresenta os escores semiquantitativos de intensidade e frequência dos alvos nas amostras de LMSU. A linha pontilhada indica o valor indicado de corte (3), valores inferiores foram considerados como negativos nas análises de frequência.

A figura 16 mostra as análises estatísticas considerando os marcadores com expressão moderada e forte (escore >3) nos diferentes tecidos. Não foi observada expressão significativa de SMO, SUFU, GLI 1 e GLI 3 nas amostras de MM. Por outro lado, 100% e 95% destas amostras mostrou expressão de PTCH 1 e GLI 2, respectivamente. HHIP 1 foi detectado em 100% das amostras de MM no núcleo e em 25% no citoplasma (Tabela 09 e Figuras 12 e 16).

Foi observada expressão positiva de PTCH 1 e GLI 2, em 79% e 69% das amostras de LMAU, respectivamente. SUFU e HHIP 1 apresentaram tanto marcação nuclear (12,6 e 6%) quanto citoplasmática (30 e 47%) no LMU (Tabela 09 e Figuras 13 e 16).

As amostras de LMAU mostraram alta frequência de expressão de PTCH 1 (75%), GLI 1 (56%) e GLI 2 (62%). SUFU e HHIP 1 mostraram expressão nuclear e citoplasmática (Tabela 9 e Figuras 14 e 16), porém com expressão nuclear predominante.

As amostras de LMSU, 76% e 70% foram positivas para PTCH 1 e SUFU, respectivamente. SHH e SMO foram detectados em 40% e 51% dos casos, enquanto os GLIs 1-3 foram observados em 59%, 65% e 30%, respectivamente (Tabela 9 e Figuras 15 e 16). Menor frequência de expressão de HHIP 1 foi detectada nestas amostras (40% no citoplasma e 30% no núcleo).

De modo geral as proteínas da via mostraram perfis crescentes, seja na intensidade da marcação (SMO, SUFU e GLI 3) ou na frequência de amostras positivas (SHH, SMO, SUFU, GLI 1, GLI 3), partindo do MM até os LMSU

(Figura 16). Somente as proteínas PTCH 1 e HHIP 1 mostraram padrão diferente ou invertido de expressão.

Figura 16: Representações gráficas dos escores semiquantitativos de intensidade (I) e frequência (F) da marcação imunoistoquímica de SMO, SUFU, HHIP 1 e GLI 1-3 nos tecidos avaliados. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$). As barras horizontais indicam significância estatística entre MM e todos os outros tecidos (LMU, LMAU e LMSU). A seta horizontal representa o valor de corte para a expressão negativa e fraca ($I \times F < 3$). A seta vertical representa diferenças altamente significativas em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$).

Quanto às análises de correlação entre expressão proteica e os parâmetros clínicos, SHH mostrou expressão aumentada no MM ($p = 0.016$) e LMU ($p = 0.039$) de mulheres sem uso de contraceptivo oral. Além disso, menor

sobrevida livre de doença foi associada com a expressão de SHH e SUFU nos LMSU (Figura 17).

Figura 17: Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida livre de doença (meses) das pacientes com LMSU em relação à expressão protéica de SHH e SUFU.

Foi observado também que o aumento de expressão das proteínas GLIs foram associados a alguns parâmetros clínicos nos tumores. Nos LMU, a expressão de GLI 1 mostrou associação com o status menopausal das pacientes ($p=0.031$), GLI 2 com gravidez ($p=0.046$) e história de aborto espontâneo ($p=0.027$), e GLI 3 com aborto espontâneo ($p=0.012$). Nos LMSU o aumento de expressão de GLI 1 mostrou associação com o tamanho do tumor (>5 cm, $p=0.031$). Os dados referentes às análises realizadas estão apresentados na tabela 10.

Quanto à correlação entre expressão genica e protéica, foi observada para GLI 1 e HHIP 1 nos leiomiomas, PTCH 1 nos leiomiomas não convencionais e SUFU nos leiomiossarcomas. De modo geral, o perfil de expressão protéica corroborou os achados de expressão transcricional com perfil crescente dos marcadores, sendo que uma maior expressão de SMO, SUFU, GLI 1 e GLI 3 encontrados nos LMAU e LMSU.

Tabela 10: Correlação entre a expressão protéica com os dados clínicos patológicos

Dados clínicos	Tecido	Frequência da expressão proteica e p valor									
		SHH [†]		PTCH 1		GLI 1		GLI 2		GLI 3	
Contraceptivo oral	MM	93,3% n=14	p=0.01	0% n=0		100% n=15		0% n=0		100% n=16	
	LM	87,2% n=41	p=0.03	6,4 n=3	p>0,05	100 n=49	p>0,05	22,4% n=11	p>0,05	86,5% n=45	p>0,05
Menopausa	LM	100% n=4		25% n=1		100,0% n=4		50% n=2		50% n=2	
	ULM	0% n=0	p>0,05	0% n=0	p>0,05	0% n=0	p=0.02	0% n=0	p>0,05	0% n=0	p>0,05
	LMS	50% n=7		14,3% n=2		35,7% n=5		35,7% n=5		64,3% n=9	
Tamanho do tumor >5cm	LM	0% n=0		0% n=0		0% n=0		0% n=0		0% n=0	
	ULM	50% n=1	p>0,05	0% n=0	p>0,05	0% n=0	P=0.03	50% n=1	p>0,05	50% n=1	p>0,05
	LMS	47,6 % n=10		13,6% n=3		42,9% n=9		36,4% n=8		63,6 n=14	
Tamanho do tumor ≤8cm	LM	64,7% n=11		16,7 n=3		35,3% n=6		35,3% n=6		66,7% n=12	
	ULM	50% n=3	p>0,05	0% n=0	p>0,05	16,7% n=1	p>0,05	0% n=0	p>0,05	42,9% n=3	p>0,05
	LMS	44,4% n=4		22,2% n=2		44,4% n=4		33,3% n=3		75% n=6	
Aborto	MM	0% n=0		0% n=0		0% n=0		80% n=14		0% n=0	
	LM	14,3% n=2	p>0,05	23,1 n=3	p>0,05	0% n=0	p>0,05	69,2% n=9	p=0.02	6,7% n=1	p=0.01
Gravidez	MM	0% n=0		0% n=0		0% n=0		72,2% n=14		0% n=0	
	LM	6,7% n=3	p>0,05	22,2% n=10	p>0,05	0% n=0	p>0,05	42,6% n=20	p=0.04	2% n=1	p>0,05
Histerectomia	MM	78,9% n=15		100% n=20		100% n=20		0% n=0		100% n=20	
	LM	83% n=44	p>0,05	7,5% n=4	p>0,05	96,4 n=53	p>0,05	22,2% n=12	p>0,05	93,2% n=55	p=0.01
Patologias Associadas	MM	23,1% n=3		100% n=14		0% n=0		28,6% n=4		0% n=0	
	LM	12,2 n=6	p>0,05	75% n=39	p=0.02	2% n=1	p>0,05	43,1% n=22	p>0,05	10,7% n=6	p>0,05

SMO, SUFU e HHIP1 não apresentaram p valor significativo e foram excluídos da tabela .

[†] SHH perda da expressão nos MM.

6. DISCUSSÃO

O estudo da via de sinalização do Sonic Hedgehog nos tumores de musculatura lisa do útero mostra-se relevante, uma vez que essa via está relacionada com diversos aspectos do desenvolvimento embrionário (proliferação, diferenciação celular, entre outros) e muitos aspectos desses tumores são desconhecidos.

As vias de sinalização que participam no desenvolvimento embrionário são, normalmente, mantidas inativas em tecido não neoplásico e a sua ativação pode acarretar no desenvolvimento de tumores (Chari e McDonnell 2007). Trabalhos têm mostrado a ativação da via de sinalização do SHH em vários tipos de tumor (Pignot et al., 2012; You et al., 2010; Wang et al., 2012; Feng et al., 2007). Todavia, não é de nosso conhecimento, até o presente, nenhum trabalho avaliando a expressão de genes e proteínas dessa via de nos leiomiomas e leiomiossarcomas uterinos.

Nosso trabalho avaliou 106 genes que estão relacionados, direta ou indiretamente, na via de sinalização do HH em 20 amostras de MM, 119 LMU (incluindo 16 LMAU) e 37 LMSU. Foram avaliadas a expressão transcricional e protéica de diversos marcadores e, posteriormente, a correlação desses achados com os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes.

Dos dados clínicos e anatomopatológicos que foram avaliados, somente a etnia mostrou-se diferente dos achados na literatura em pacientes com LMU, sendo a frequência de mulheres da raça branca superior (59%) em nosso estudo. A etnia é um importante fator de risco para o LMU na população geral. O efeito da raça na incidência e gravidade do LMU é significativo e descrito em vários trabalhos (Powe et al., 2013, Wei et al., 2006). Porém, sabe-se que a estimativa da incidência racial pode sofrer influência da etnia autodeclarada pela

paciente e a diversidade da população com base na localização do serviço hospitalar (Moore et al.,2008).

A variação étnica em pacientes com LMU não é clara, várias teorias foram propostas para a causa do aumento da prevalência e dos sintomas em pacientes afrodescendentes. Uma delas está relacionada à expressão de genes que aumentam o risco em mulheres negras. Makinen et al., 2011, mostraram que pacientes africanas, apresentam maior taxa de mutação no gene *MED12* quando comparadas com pacientes brancas. Ishikawa et al.,2009, mostraram que pacientes negras apresentam expressão gênica aumentada de *CYP19* (aromatase), *ER α* e *PGR* em relação a pacientes brancas. Al-Hendy e Salama (2006) avaliaram a presença de polimorfismos na enzima Catechol-O-methyltransferase (COMT), essencial para o metabolismo do estrogênio, e mostraram que a mutação homozigota dominante também apresenta maior frequência em mulheres negras. Em suma, sendo o LMU estrógeno-dependente, todos esses fatores poderiam influir na predominância desses tumores em mulheres negras.

Não foi possível avaliar a expressão gênica dos ligantes da via de sinalização do HH (*SHH*, *DHH*, *IHH* e *HHIP 1*) em todos os tecidos. A técnica utilizada em nosso trabalho é considerada padrão ouro para expressão gênica, porém a utilização de amostras de FFPE limitou a detecção da expressão de vários genes. Porém, mesmo em tecidos frescos de MM e LMU não conseguimos detectar a expressão significativa de *SHH*, *IHH* e *DHH*.

Os demais genes da via de sinalização do HH (*PTCH 1*, *SMO*, *SUFU* e *GLI 1-3*) apresentaram hiperexpressão nas amostras de LMSU e LMAU, exceto o *GLI 3* que não apresentou diferença de expressão nas últimas amostras.

Nas amostras de LMU, o gene *PTCH 1* apresentou hipoexpressão e os genes *SMO* e *GLI 1* hiperexpressão. Os demais genes não apresentaram diferença de expressão. Trabalhos têm mostrado a expressão aumentada desses genes em outros tipos de tumor. You et al., 2010, avaliaram *PTCH 1* em amostras de câncer colorretal e observaram que tumores com alto risco de metástase apresentam menor expressão de *PTCH 1* que aqueles com baixo risco. Os autores sugerem que *PTCH 1* pode ser um marcador para discriminar o risco de metástase nesses tumores. Wang et al., 2012 avaliaram a expressão de *SHH*, *SMO* e *GLI 1* também em amostras de câncer colorretal e encontraram aumento significativo na expressão de *SMO* e *GLI 1* nos tumores em relação ao tecido normal.

Os genes *AXIN2*, *FZD2*, *CCND1*, *FZD6*, *ESR1*, *IFT52*, *FZD3*, *FZD8* e *WISP1* apresentaram correlação com o prognóstico nas pacientes com LMSU. Diversos autores têm mostrado essa correlação em outros tipos de tumores. Cheng et al., 2012 avaliaram, por PCR em tempo real a *CCND1* em amostras de carcinoma ductal de mama. Os resultados mostraram que as amostras de pacientes no estágio III e IV apresentaram expressão aumentada desse gene quando comparadas com tumores em os estádios iniciais.

Davies et al., 2010 estudaram o gene *WISP1* em amostras de pacientes com câncer colorretal, e mostraram que pacientes com estadiamento II, III e IV apresentavam hiperexpressão desse gene em relação àquelas em estadiamento I.

Chan et al., 2008, avaliaram a expressão gênica do receptor de estrogênio β em câncer de ovário, seus resultados mostraram que a expressão do receptor de estrogênio β foi associado com melhor sobrevida das pacientes.

Quanto aos genes da família de receptores Frizzeld, nosso estudo mostrou a alteração na expressão de FZD 2, 3 8 e 6 tem correlação com a sobrevida nas pacientes com leiomiiossarcoma. Estudos têm mostrado que vários membros dessa família estão relacionados com prognóstico de pacientes com outros tipos de tumores. Ou et al., 2014, avaliaram a expressão gênica de *FZD 1* em câncer colorretal e mostraram que sua expressão foi associada com metástase linfonodal. Qu et al., 2013, mostraram que a expressão de *FZD 1* em câncer gástrico foi associado com pior sobrevida das pacientes.

Já as reações de imunoistoquímica foram realizadas, exclusivamente, para detecção das proteínas da via, a saber: SHH, PTCH 1, SMO, SUFU, GLI 1, GLI 2, GLI 3 e HHIP1. Inicialmente, as reações foram consideradas positivas quando o escore de intensidade x frequência das reações foi >3 (reações moderada e forte). Esse corte foi estabelecido para excluir as amostras com expressão fraca e negativas. Foi considerada a frequência de amostras positivas de modo que a expressão protéica pudesse ser visualizada quantitativamente para fins de diagnóstico diferencial, principalmente entre LMAU e LMSU.

Nessa condição, quatro das oito proteínas da via do SHH não mostraram expressão significativa nas amostras de MM. Já PTCH 1, GLI 2 e HHIP 1 foram detectados na grande maioria das amostras de MM (>95%). HHIP 1 é um inibidor da via do HH (Choy e Cheng 2012; Hooper e Scot 2005) e é geralmente encontrado no citoplasma. Porém, nas nossas amostras, sua expressão foi predominantemente nuclear. PTCH 1 também é um inibidor da

via, pois mantém SMO inativado na ausência do ligante SHH (Hooper e Scot 2005).

Esses resultados foram muito interessantes, pois o MM foi o tecido normal, usado como referência, e várias amostras foram obtidas das mesmas pacientes com LMU. Esse aspecto abre perspectivas para possíveis bloqueios desses alvos sem prejuízo para o tecido normal adjacente, seja para pacientes com LMU ou LMSU.

De modo geral, os LMU, LMAU e LMSU mostraram expressão crescente de todas as proteínas relacionadas do SHH (exceto HHIP 1 e GLI 2). Desse modo, a possibilidade de uso dessas proteínas para fins de diagnóstico diferencial ficou comprometida.

SMO é considerado uma oncoproteína, e o aumento da expressão vêm sendo descrito na literatura em diversos tipos de tumores (Choy e Cheng, 2012; Jeng et al., 2013; Li et al., 2014).

Pequenas moléculas inibidoras da via do HH que agem como antagonistas da proteína SMO vem sendo descritas na literatura para terapia alvo, impedindo que ocorra a transcrição de genes alvo da via relacionados com proliferação e sobrevivência celular (Proctor et al., 2014; Sahebjam et al., 2012). Uma vez que essa proteína não tem expressão significativa no MM, vale investigar a ação desses inibidores nos tumores de musculatura lisa do útero.

A localização de SUFU no citoplasma e a expressão aumentada de GLI 1 e GLI 3 no núcleo indica ativação da via de sinalização do HH (Katoh e Katoh 2009; Choy e Cheng 2012). Neste trabalho, amostras de LMSU apresentaram expressão aumentada dessas proteínas, indicando a ativação da via nesses tumores. Pesquisas têm mostrado resultados semelhantes de expressão das

proteínas relacionadas à via de sinalização do SHH em outros tipos de tumores. Niu et al.,2014 encontraram expressão de SHH aumentada em amostras de câncer gástrico, em relação ao tecido normal. Dong et al.,2014 mostraram SHH, PTCH 1, SMO e GLI 1 com expressão aumentada no câncer de tireoide. Zhoa et al.,2013 avaliaram a expressão de SHH em câncer de esôfago e no tecido adjacente, seus resultados mostraram expressão significativamente maior no tumor.

Considerando a influencia hormonal, foi observada regulação negativa da expressão de SHH no MM e LMU das pacientes em uso de contraceptivo oral. Adicionalmente, verificamos maior expressão de GLI 1 nas pacientes não menopausadas, com maior número de gravidez e aborto espontâneo (nas amostras de LMU). Alguns autores já mostraram essa influencia hormonal na regulação da via de sinalização do SHH (Sekiguchi et al., 2012; Okolowsky et al., 2014).

Zhao et al., 2010 mostraram que a proteína GLI 1 está significativamente aumentada em células de câncer de mama independentes de estrogênio, em comparação às células dependentes de estrogênio, sugerindo que o aumento de GLI 1 nessas células pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de independência ao estrogênio. Em câncer gástrico, o estudo de Kameda et al.,2010, indica que a ativação da via do receptor do estrogênio α promove a proliferação celular através da ativação da via do HH.

Considerando a sobrevida das pacientes, nossos resultados mostraram que as proteínas SHH e SUFU, quando aumentadas, estão associadas a pior sobrevida livre de doença nas pacientes com LMU. A ativação da via ou a expressão aumentada de algumas proteínas têm sido relacionadas com

prognóstico em vários tipos de câncer (Katoh e Katoh 2009; Seiguchi et al., 2012; Kameda et al., 2010). Niu et al., 2014, mostraram que em câncer gástrico a expressão aumentada de SHH está associada a menor sobrevida livre de doença, idade e estadiamento.

Em câncer de pâncreas, Yang et al., 2013, mostraram que pacientes com expressão nuclear de GLI 1 apresentaram pior prognóstico, sugerindo que a proteína GLI 1 pode ser um importante indicador prognóstico em câncer de pâncreas. Li et al., 2014 observaram que pacientes com glioma que apresentaram expressão aumentada de SHH, PTCH 1 e GLI 1 tiveram menor sobrevida quando comparados com os pacientes que não expressaram essas proteínas.

Nossos dados corroboram, em grande parte, os achados na literatura. Porém, no tocante as nossas ambições iniciais, nenhuma proteína avaliada serviu como marcador exclusivo para LMU (sejam eles convencionais mais ou não) ou para os LMSU. Porém, observamos mais evidencias que apontam para uma possível malignização dos LMAU, já que a grande maioria dos marcadores avaliados apresentou perfil de expressão crescente considerando o tecido normal, tumor benigno e tumor maligno (MM, LMU, LMAU, LMSU).

7. CONCLUSÃO

- De 106 genes avaliados, em relação ao MM, somente PTCH 1 apresentou tendência a hipoeexpressão nos LMU. Quatorze genes (*PTCH 2, SMO, GLI 1, BCL-2, HHAT, SLC2A4, GREM 1, FOXE 1, SFRP 1, RHOA, ESR1, PGR, PRL e PRLR*) apresentaram expressão significativamente maior nos LMU; Trinta e oito genes (*PTCH 1, SMO, RAB 23, GLI 1, GLI 2, GLI 3, SUFU, CTNNB 1, BCL-2, WNT 2B, CCND 1, CCND 2, DVL 1, DVL 2, HHAT, SLC2A4, GREM 1, GSK3A, AXIN 1, FOXE 1, FZD 1, FZD 2, FZD 5, FZD 9, IFT52, LEF 1, MAPK 8, MMP 7, PTEN, SFRP 1, SFRP4, TCF7, TP53, WIF 1, WISP1, ESR1, PRL e PRLR*) foram hiperexpressos nos LMAU e trinta e quatro genes (*PTCH 1, SMO, GLI 1, GLI 1, GLI 3, SUFU, CTNNB 1, GSK3B, BCL-2, WNT2B, CCND 1, CCND 2, DVL 1, DVL 2, HHAT, SLC2A4, GREM 1, GSK3A, AXIN 1, FOXE 1, FZD 1, FZD 2, FZD 5 IFT52, LATS 1, PTEN, SFRP4, RHAO, TCF7L1, TLE 1, WIF 1, WISP 1, ESR1 e PRL*) mostraram-se com expressão aumentada nos LMSU,
- Das oito proteínas avaliadas, HHIP 1 e GLI 2 apresentaram expressão maior nos MM. GLI 2 foi mais expressa nos LMU e SMO, SUFU, GLI 1, GLI 2 e GLI 3 nos LMA e LMSU.
- A correlação positiva entre expressão gênica e protéica foi observada para GLI 1 e HHIP 1 nos LMU, PTCH 1 nos LMAU e SUFU nos LMSU.
- Quanto aos parâmetros clínicos e anatomopatológicos obtivemos que: Para as pacientes com LMU, a hiperexpressão do gene *SLC2A1* e a hipoeexpressão de *WNT7B* mostraram correlação com a etnia; a hiperexpressão *FZD 2, PRL, SHH, SLC2A4* e *WNT 3* e hipoxpressão de *FZD 6, MMP 7, WNT 7B* com o uso de contraceptivo oral. Nos LMAU

FZD 4 e *TP53* foram hiperexpressos em mulheres com idade superior a 50 anos. Nos LMSU, a hiperexpressão de *WISP 1* também mostrou expressão aumentada em mulheres com mais de 50 anos; hiperexpressão de *AXIN 1*, *FZD 9*, *HHAT*, *MTSS 1*, *PTCH 2*, *SUFU* e *TLE 1* foi observada em mulheres menopausadas; hipoexpressão de *PRLR* com maior tamanho do tumor (> 5 cm) e hipoexpressão de *GLI 2* e *SLC2A3* para tumores com 8cm ou menos. *AXIN 2*, *FZD 2*, *CCND 1*, *FZD6*, *ESR1* e *IFT52* foram associados com sobrevida livre de doença e *FZD 3*, *FZD 8* e *WISP 1* com sobrevida câncer específica, nas pacientes com LMSU. Menor expressão protéica de SHH foi associada com o uso de contraceptivo oral nas amostras de pacientes com LMU. Expressão aumentada de GLI 1 foi observada em mulheres menopausadas e com maior tamanho de tumor (> 5cm), nos LMAU. A expressão das proteínas SHH e SUFU foram associadas a sobrevida livre de doença nas pacientes com LMSU.

8.1. Anexo 01 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional

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

Nº Protocolo: 0845/11

Título: VIA DE SINALIZAÇÃO DO SONIC HEDGEHOG EM LEIOMIOMA E LEIOMIOSSARCOMA UTERINOS: ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA, TRANSCRICIONAL E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA VIA

Pesquisador Responsável: Katia Candido Carvalho

Pesquisador Executante: Natalia Garcia

Co-autores: Edmund Chada Baracat, Gustavo Arantes Rosa Maciel, José Maria Soares Junior, Fernando Augusto Soares e Isabela Cunha.

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 27 de Dezembro de 2011

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.2. Anexo 02 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC

Camargo Cancer Center

**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 05 de dezembro de 2013.

A
Dra. Kátia Cândido Carvalho.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1815/13
“Via de sinalização do Sonic Hedgehog em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: Estudo da expressão proteica, transcricional e avaliação do perfil de metilação dos genes envolvidos na via”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/11/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 03/09/2013, aprovaram a realização do projeto (datado de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência dos Centros Participantes da Pesquisa;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Comprometimento da Instituição Coparticipante;
- Cronograma de atividades;
- Carta de Aprovação do estudo em questão na Instituição Proponente (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP);
- Orçamento Financeiro Detalhado e Termo de Outorga e Aceitação de Auxílios – FAPESP 2012/10098-5.

NOTA: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,

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

1/1

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1815/13

Título: VIA DE SINALIZAÇÃO DO SONIC HEDGHOG EM LEIOMIOMA E LEIOMIOSSARCOMA UTERINOS. ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA, TRANSCRICIONAL, E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA VIA.

Pesquisador Responsável: Dra. KÁTIA CÂNDIDO CARVALHO

Copesquisador: DRA. ISABELA WERNECK DA CUNHA

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FMUSP).

Pesquisador Responsável Institucional: DR. FERNANDO AUGUSTO SOARES.

Aluna: NATÁLIA GARCIA (Mestrado).

Patrocinador: FAPESP

Comentários gerais: O LEIOMIOMA E LEIOMIOSSARCOMA SÃO TUMORES DE MUSCULATURA LISA UTERINA. PRETENDE-SE ESTUDAR AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DESTES TUMORES, UMA VEZ QUE DIVERSOS ESTUDOS JÁ DEMONSTRARAM SUA DESREGULAÇÃO EM DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER E NENHUM ESTUDO DESTA NATUREZA FOI DESCRITO PARA TUMORES UTERINOS.

Comentários Finais (CEP): Os autores apresentaram respostas aos questionamentos realizados por este Comitê de Ética, em carta direcionada ao CEP datada de 22 de outubro de 2013. Foram feitos esclarecimentos com relação a:

- Critérios de Inclusão e Exclusão;
- Benefícios aos participantes;
- Responsabilidades do patrocinador;
- Critérios para suspender ou encerrar a pesquisa;
- Genes a serem estudados;
- Cronograma;
- Caráter da pesquisa.

Após análise das respostas às pendências apresentadas pelos autores do estudo, este CEP considerou-as atendidas satisfatoriamente e considera o presente projeto como aprovado.

Parecer Final: PROJETO APROVADO.

NOTA: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

 FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
 Hospital do Câncer A. G. Comarça
 Comissão de Ética em Pesquisa
 Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalewski
 Coordenador

8.3. Anexo 03 - Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD
(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Via de sinalização do Sonic Hedgehog em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: Estudo da expressão protéica, transcricional e avaliação do perfil de metilação dos genes envolvidos na via.

PESQUISADOR : Kátia Candido Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 64105/01-D.

UNIDADE DO HC/FMUSP: Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - Lim 58.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) **“essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa Analisar a expressão de genes envolvidos na via de sinalização do Sonic Hedgehog e avaliar a presença e grau de metilação desses genes em pacientes com leiomioma e leiomiossarcoma”.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: **Não se aplica ao presente projeto. Caso a paciente concorde, um fragmento do tumor retirado em cirurgia será doado para a pesquisa.**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – **Não se aplica. Para o desenvolvimento do projeto não serão necessários materiais biológicos adicionais.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3. **Somente serão utilizadas amostras de pacientes que necessitarão ser submetidas ao procedimento cirúrgico devido à presença do tumor. Assim, qualquer desconforto ou risco são os relativos a cirurgia para miomectomia e não estão relacionados ao fato da paciente concordar em ceder a amostra retirada.**

5 – Benefícios para o participante: **O projeto visa avaliar a expressão de genes da via do sonic hedgehog no leiomioma e no leiomiossarcoma. A contribuição do projeto se dará, caso algum dos genes apresente perfil alterado de expressão. Já o procedimento cirúrgico, em geral, é realizado com intuito de diminuir os desconfortos (dor, sangramento) que o tumor infringe a paciente.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; **Não se aplica**

7 – Garantia de acesso: **Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos**

profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Kátia Candido Carvalho que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo 455, 2º andar, sala 2113, fone 3061-7033. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – **As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.**

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: **Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.**

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Via de sinalização do Sonic Hedgehog em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: Estudo da expressão protéica, transcricional e avaliação do perfil de metilação dos genes envolvidos na via.

Eu discuti com a Dra. Kátia Candido Carvalho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e

poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

8.4. Anexo 04 - Ficha de coleta de dados**Ficha de coleta de dados
(leiomioma uterino)**

1. Identificação:
2. Registro Hospitalar:
3. Idade:
4. Raça:
5. Peso:
6. Altura:
7. Queixa principal:
8. Idade da menarca:
9. Anticoncepcional () sim () não
10. Uso de medicamento hormonal: () sim () não qual _____
11. Tabaco () sim () não () ex tabagista () ignorado
12. Paridade ____G____P____A
13. Patologia de base: () HAS () DM () outras _____
14. Cirurgia realizada:

15. Volume uterino:
16. Número de nódulos:

8.5 Anexo 05 - Dados clínicos e patológicos

Amostra	Data de Nascimento	Raça	Peso (Kg)	Altura (m)	Vol.Uterino (cm³)	Idade da menarca
107	20.04.1977	Negra	62,5	1,57	80	13
109	15.10.1961	Negra	89	1,71	424	11
110	07.03.1967	Negra	58,2	1,6	530	13
112	10.12.1959	Negra	80	1,7	207	15
116	10.12.1964	Branca	73	1,55	1051	14
117	16.02.1982	Branca	59	1,69	143	14
118	03.12.1968	Branca	77	1,6	322	9
119	31.07.1968	Negra	64	1,54	4875	12
135	06.03.1973	Branca	91	1,69	195	12
138	04.06.1971	Branca	69	1,69	1012	11
142	06.02.1961	Negra	78	1,59	624	11
143	16.08.1974	Negra	80	1,55	316	11
145	20.01.1973	Branca	69	1,69	282	15
146	10.08.1974	Branca	60	1,6	258	12
147	12.03.1981	Negra	94	1,69	319	13
149	18.08.1961	Branca	88	1,65	805	16
150	30.12.1965	Negra	72	1,59	194	11
151	17.12.1964	Branca	74	1,6		10
152	04.08.1971	Branca	80	1,6	186,2	11
153	03.04.1969	Branca	97	1,62	582	14
154	06.08.1966	Branca	92	1,69	257	13

Amostra	Data de Nascimento	Raça	Peso (Kg)	Altura (m)	Vol.Uterino (cm³)	Idade da menarca
155	18.05.1962	Branca	83	1,51	510	11
156	04.06.1972	Branca	75,3	1,57	365	12
157	13.01.1965	Negra	92	1,65	12850	11
158	19.10.1966	Negra	74	1,67	313	12
159	29.11.1957	Branca	83	1,6	190.5	14
160	06.06.1966	Branca	69.8	1,7	251	13
161	17.04.1974	Branca	62,8	1,56	168	15
162	11.07.1967	Branca	58	1,6	3.066	17
163	09.08.1971	Negra	73	1,54	145	14
164	08.03.1966	Negra	80	1,59	350,6	15
165	01.03.1967	Branca	70	1,51	604,2	14
166	23.08.1980	Negra	94	1,66	244	13
167	03.05.1952	Negra	63	1,48	36	15
168	06.10.1968	Branca	72	1,59	223	12
169	14.09.1963	Negra	64		1511	9
170	19.07.1965	Branca	60	1,58	66	16
171	25.05.1967	Branca	74	1,61	1852	14
172	25.04.1978	Negra	72	1,62	358, 5	11
173	03.12.1962	Negra	80	1,64	488,35	13
175	30.05.1973	Negra	89	1,53		13
176	23.09.1964	Branca	73	1,62	290	10
177	19.11.1952	Branca	58	1,58		14

Amostra	Data de Nascimento	Raça	Peso (Kg)	Altura (m)	Vol.Uterino (cm³)	Idade da menarca
178	29.04.1968	Negra	70	1,69	211	12
179	24.03.1975	Negra	96	1,63	359	14
180	01.11.1968	Negra	90	1,64	613	14
181	06.01.1961	Branca	70	1,65	273	15
183	02.02.1966	Branca	90	1,5	545	11
184	20.06.1972	Negra	63,7	1,65	803	9
185	29.06.1960	Branca	69	1,53		13
186	06.08.1970	Branca	68	1,53	530	12
187	13.12.1968	Negra	73	1,5		13
188	28.08.1964	Branca	65	1,65	800,8	13
191	07.06.1964	Branca	65	1,65	131	17
192	04.08.1967	Branca	122	1,62	617	9
193	28.06.1964	Branca	70	1,62	219	14
194	25.07.1981	Negra	72	1,62	1000	12
195	06.01.1981	Branca	56	1,55	593	14
196	25.04.1968	Branca	84	1,59	405,9	15
197	19.02.1958	Branca	63	1,53	1139	12
199	19.06.1964	Negra	73	1,67	338	
200	04.06.1986	Negra	55	1,63	523	12
203	17.02.1962	Branca	77	1,65		15
204	13.08.1977	Negra	52	1,58	586	12
205	12.12.1979	Branca	60	1,57	126	13

Amostra	Data de Nascimento	Raça	Peso (Kg)	Altura (m)	Vol.Uterino (cm³)	Idade da menarca
206	06.01.1989	Branca	50	1,59	454,4	13
207	13.05.1983	Branca	58	1,7	474	14
208	26.10.1977	Branca	94	1,67	519,9	14
209	26.12.1971	Branca	72	1,61	1314,8	11
210	15.04.1971	Branca	57	1,64	935	13
211	19.03.1965	Branca	57	1,54		12
212	30.03.1966	Negra	65	1,59	1927,87	11
213	13.06.1966	Negra	52	1,68	1910	11
214	26.01.1970	Branca	81	1,65	748	20
219	27.07.1961	Branca				
222	10.01.1965	Branca	65	1,52	304	16
223	17.01.1973	Negra	103	1,69	1478	12
225	08.06.1966	Branca	76	1,5	140	12
226	26.05.1975	Negra	57	1,65	339,4	15

Amostra	Tabagismo	Gravidez	Abortos	Paridade	Nº de nódulos
107	Não	0	0	0	2
109	Não	1	0	1	
110	Sim	2	0	2	
112	Não	4	1	3	
116	Não	3	0	3	
117	Não	0	0	0	13
118	EX	3	0	3	
119	EX	1	0	1	
135	não	2	1	1	
138	Ex	2	0	2	
142	EX	4	0	4	
143	Sim	1	0	1	
145	Não	0	0	0	4
146	Não	1	1	0	
147	Não	0	0	0	4
149	EX	4	1	3	
150	Não	7	4	3	
151	Não	2	0	2	
152	Não	3	0	3	
153	Não	3	0	3	
154	Não	1	0	1	
155	Ex	4	0	4	
156	Sim	2	0	2	

Amostra	Tabagismo	Gravidez	Abortos	Paridade	Nº de nódulos
157	Sim	0	0	0	6
158	Não	7	0	7	
159	Não	4	0	4	
160	EX	1	0	1	
161	Não	0	0	0	3
162	Não	0	0	0	
163	Sim	3	0	3	
164	Não	4	1	3	
165	Não	2	1	1	8
166	Não	0	0	0	
167	EX	4	0	4	
168	Não	2	0	2	
169	Sim	1	0	1	15
170	Não	0	0	0	
171	Não	2	2	0	
172	Sim	1	1	0	
173	Não	1	0	1	5
175	Não	6	1	5	
176	Não	1	0	1	
177	EX	7	3	4	
178	EX	2	0	2	1
179	Não	3	2	1	
180	Sim	2	0	2	

Amostra	Tabagismo	Gravidez	Abortos	Paridade	Nº de nódulos
180	Sim	2	0	2	
181	EX	1	0	1	
183	EX	3	0	3	
184	Não	0	0	0	
185	Não	4	0	4	
186	Não	2	0	2	
187	EX	4	2	2	
188	EX	4	0	4	
191	EX	4	1	3	
192	Não	0	0	0	
193	Não	6	2	4	
194	Não	0	0	0	
195	Não	0	0	0	5
196	Não	2	0	2	
197	Não	0	0	0	
199	Não	0	0	0	
200	Não	0	0	0	2
203	EX	6	2	4	1
204	Sim	4	0	4	
205	não	0	0	0	
206	não	0	0	0	1
207	não	0	0	0	1

Amostra	Tabagismo	Gravidez	Abortos	Paridade	Nº de nódulos
208	não	0	0	0	6
209	não	0	0	0	
210	sim	0	0	0	
211	não	0	0	0	
212	não	0	0	0	
213	sim	0	0	0	
214	EX	1	0	1	
219					
222	EX	4	0	4	
223	Não	1	0	1	
225	Não	2	0	2	
226	Não	0	0	0	2

Amostra	Uso de contraceptivos	TTO	Cirurgias	Patologias Associadas
107	Não	Não	Miomectomia	Não
109	Sim	Não	Histerectomia	Não
110	Sim	Sim	Histerectomia	Não
112	Sim	Não	Histerectomia	HAS Hipotireoidismo
116	Sim	Não	Histerectomia	Não
117	Não	Não	Miomectomia	Não
118	Sim	Não	Histerectomia	Não
119	não	não	histerectomia	HAS Rinite Alergica
135	Sim	sim	histerectomia	não
138	Não	Não	Histerectomia	Não
142	Sim	Não	Histerectomia	HAS
143	Sim	Sim	Histerectomia	Não
145	Não	Não	Miomectomia	Não
146	Sim	Não	Histerectomia	Não
147	Sim	Sim	Miomectomia	Não
149	Sim	Não	Histerectomia	HAS DM
150	Sim	Sim	histerecomia	Não
151	Não	Não	Histerectomia	Não
152	Sim	Não	Histerectomia	Não
153	Sim	Não	Histerectomia	HAS DM
154	Sim	Sim	Histerectomia	Hipotiroidismo Dislipidemia
155	Não	Não	Histerectomia	Não
156	Sim	Sim	Histerectomia	Não
157	Não	Não	Miomectomia	Não
158	Sim	Sim	Histerectomia	Não
159	Sim	Sim	Histerectomia	Não
160	Sim	Sim	Histerectomia	Depressão

Amostra	Uso de contraceptivos	TTO	Cirurgias	Patologias Associadas
161	Sim	Sim	Miomectomia	Não
162	Não	Não	Histerectomia	Não
163	Sim	Sim	Histerectomia	Não
164	Não	Não	Histerectomia	DM
165	Sim	Sim	Histerectomia	Não
166	Sim	Não	Miomectomia	Não
167	Sim	Não	Histerectomia	HAS
168	Sim	Sim	Histerectomia	HAS
169	Não	Não	Histerectomia	Não
170	Sim	Sim	Histerectomia	Anemia
171	Sim	Não	Miomectomia	HAS Hipertireoidismo
172	Sim	Sim	Miomectomia	Não
173	Sim	Sim	Histerectomia	HAS
175	Sim	Sim	Histerectomia	Não
176	Sim	Sim	Histerectomia	Não
177	Sim	Não	Histerectomia	Não
178	Sim	Sim	Histerectomia	Não
179	Sim	Sim	Histerctomia	Não
180	Sim	Sim	Histerectomia	HAS Asma
181	Sim	Sim	Histerectomia	Não
183	Sim	Não	Histerectomia	Não
184	Sim	Sim	Histerectomia	HAS
185	Sim	Sim	Histerectomia	HAS Depressão
186	Não	Sim	Histerectomia	HAS
187	Sim	Não	Histerectomia	HAS
188	Não	Não	Histerectomia	Não

Amostra	Uso de contraceptivos	TTO	Cirurgias	Patologias Associadas
191	Sim	Sim	Histerectomia	Não HAS DM
192	Não	Sim	Histerectomia	Hipotireoidismo Obesidade
199	Não	Sim	Histerectomia	HAS
200	Sim	Sim	Miomectomia	Não
203	Sim	Não	Miomectomia	HAS
204	Não	Sim	Histerectomia	Não
205	sim	não	miomectmia	Não
206	não	sim	miomectomia	Não
207	sim	sim	miomectomia	Não
208	não	não	miomectomia	não
209	sim	não	histerectomia	não
210	não	não	histerectomia	HAS
211	não	não	histerectomia	não
212	não	não	Histerectomia	não
213	não	não	histerectomia	não
214	Sim	Não	Histerectomia	Não
219			Histerectomia	
222	Sim	Sim	Histerectomia	Não
223	Sim	Não	Histerectomia	Não
225	Sim	Sim	Histerectomia	Não
226	Não	Não	Miomectomia	Não

8.6. Anexo 06- Dados dos ensaios (mistura de oligonucleotídeos iniciadores e sondas) utilizados neste estudo

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i> ®	Referência
ACTB*	Actin, beta	hs 99999903_m1	NM_001101
B2M*	Beta-2-microglobulin	hs 00984230_m1	NM_004048
GAPDH*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	hs 99999905_m1	NM_002046
GUSB*	Glucuronidase, beta	hs 00939627_m1	NM_000181
HPRT1*	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	hs 02800695_m1	NM_000194
RPLP0*	Ribosomal protein, large, P0	hs 99999902_m1	NM_001002
APC	Adenomatous polyposis coli	hs 01568269_m1	NM_000038
AXIN1	Axin 1	hs 00394718_m1	NM_003502
AXIN2	Axin 2	hs 00610344_m1	NM_004655
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	hs 00608023_m1	NM_000633
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	hs 00154192_m1	NM_001200
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	hs 01041266_m1	NM_130851
BMP5	Bone morphogenetic protein 5	hs 00234930_m1	NM_021073
BMP6	Bone morphogenetic protein 6	hs 01099594_m1	NM_001718
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	hs 00233476_m1	NM_001719
BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b	hs 01629120_s1	NM_001720
CCND1	Cyclin D1	hs 00765553_m1	NM_053056
CCND2	Cyclin D2	hs 00153380_m1	NM_001759
CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1	hs 00793391_m1	NM_001892

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i>®	Referência
CSNK2A1	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	hs 00953536_m1	NM_001895
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	hs 00355049_m1	NM_001904
CTNNBIP1	Catenin, beta interacting protein 1	hs 00172016_m1	NM_020248
DAAM1	Dishevelled associated activator of morphogenesis 1	hs 00323674_m1	NM_014992
DHH	Desert hedgehog	hs 00368306_m1	NM_021044
DISP1	Dispatched homolog 1 (Drosophila)	hs 00399179_m1	NM_032890
DISP2	Dispatched homolog 2 (Drosophila)	hs 00394338_m1	NM_033510
DVL1	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	hs 00182896_m1	NM_004421
DVL2	Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)	hs 00182901_m1	NM_004422
EIF5A	eucariotic initiation factor 5A	hs 04188519_m1	NM_001143
ERBB4	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	hs 00955525_m1	NM_005235
ESR1	Estrogen receptor	hs 00174860_m1	NM_001253
FGF4	Fibroblast growth factor 4	hs 00999691_m1	NM_002007
FGF9	Fibroblast growth factor 9 (GLIa-activating factor)	hs 00181829_m1	NM_002010
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3	hs 00179829_m1	NM_000142
FOXE1	Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	hs 00916085_s1	NM_004473
FOXM1	Forkhead box N1	hs 00186096_m1	NM_003593
FOXO3A	Forkhead box	hs 00818121_m1	NM_001455
FRZB	Frizzled-related protein	hs 00173503_m1	NM_001463
FZD1	Frizzled family receptor 1	hs 00268943_s1	NM_003505
FZD2	Frizzled family receptor 2	hs 00361432_s1	NM_001466
FZD3	Frizzled family receptor 3	hs 00184043_m1	NM_017412

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i>®	Referência
FZD4	Frizzled family receptor 4	hs 00201853_m1	NM_012193
FZD5	Frizzled family receptor 5	hs 00258278_s1	NM_003468
FZD6	Frizzled family receptor 6	hs 00171574_m1	NM_003506
FZD7	Frizzled family receptor 7	hs 00275833_s1	NM_003507
FZD8	Frizzled family receptor 8	hs 00259040_s1	NM_031866
FZD9	Frizzled family receptor 9	hs 00268952_s1	NM_003508
GAS1	Growth arrest-specific 1	hs 00266715_s1	NM_002048
GLI1	GLI family zinc finger 1	hs 01110766_m1	NM_005269
GLI2	GLI family zinc finger 2	hs 01119974_m1	NM_005270
GLI3	GLI family zinc finger 3	hs 00609233_m1	NM_000168
GREM1	Gremlin 1	hs 00171951_m1	NM_013372
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha	hs 00997938_m1	NM_019884
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	hs 01047719_m1	NM_002093
HHAT	Hedgehog acyltransferase	hs 00911326_m1	NM_018194
HHIP	Hedgehog interacting protein	hs 01011015_m1	NM_022475
IFT52	Intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)	hs 00211198_m1	NM_016004
IHH	Indian hedgehog	hs 01081801_m1	NM_002181
JUN	Jun proto-oncogene	hs 01103582_s1	NM_002228
LATS1	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)	hs 01125528_m1	NM_004690
LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	hs 00324396_m1	NM_014572
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	hs 01547250_m1	NM_016269
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	hs 01046830_m1	NM_002745

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i>®	Referência
MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	hs 01042796_m1	NM_002423
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	hs 00177083_m1	NM_002750
MTSS1	Metastasis suppressor 1	hs 00207341_m1	NM_014751
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	hs 00153408_m1	NM_002467
PGR	progesterone receptor	hs 01556702_m1	NM_000926
PRL	prolactin	hs 00168730_m1	NM_000948
PRLR	prolactin receptor	hs 01061477_m1	NM_000949
PTCH1	Patched 1	hs 00181117_m1	NM_000264
PTCH2	Patched 2	hs 00184804_m1	NM_003738
PTCHD1	Patched domain containing 1	hs 00288486_m1	NM_173495
PTCHD2	Patched domain containing 2	hs 01367724_m1	NM_020780
PTCHD3	Patched domain containing 3	hs 01584645_m1	NM_001034
PTEN	protein tensin homologue	hs 02621230_s1	NM_000314
RAB23	RAB23, member RAS oncogene family	hs 00212407_m1	NM_183227
RHOA	Ras homolog gene family, member A	hs 00357608_m1	NM_001664
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	hs 00610060_m1	NM_003012
SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4	hs 00180066_m1	NM_003014
SHH	Sonic hedgehog	hs 00179843_m1	NM_000193
SLC2A1	Facilitated glucose transporter member 1	hs 00892681_m1	NM_001455
SLC2A3	Facilitated glucose transporter member 3	hs 00359840_m1	NM_006931
SLC2A4	Facilitated glucose transporter member 4	hs 00168966_m1	NM_001042
SMO	Smoothened, frizzled family receptor	hs 01090242_m1	NM_005631

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i>®	Referência
SUFU	Suppressor of fused homolog (Drosophila)	hs 00171981_m1	NM_016169
TCF7	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	hs 00175273_m1	NM_003202
TCF7L1	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	hs 01064103_m1	NM_031283
TLE1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	hs 00270768_m1	NM_005077
TP53	Tumor protein p53	hs 01034249_m1	NM_000546
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	hs 00900055_m1	NM_003376
WIF1	WNT inhibitory factor 1	hs 00183662_m1	NM_007191
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	hs 04234730_m1	NM_003882
WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	hs 01011247_m1	NM_005430
WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A	hs 00228741_m1	NM_025216
WNT10B	Wingless-type MMTV integration site family, member 10B	hs 00559664_m1	NM_003394
WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	hs 00182986_m1	NM_004626
WNT16	Wingless-type MMTV integration site family, member 16	hs 00365138_m1	NM_057168
WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2	hs 00608224_m1	NM_003391
WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	hs 00921614_m1	NM_004185
WNT3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	hs 00902257_m1	NM_030753
WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A	hs 00263977_m1	NM_033131
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4	hs 01573504_m1	NM_030761
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	hs 00998537_m1	NM_003392
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	hs 01086864_m1	NM_032642
WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6	hs 00362452_m1	NM_006522
WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	hs 01114990_m1	NM_004625

Símbolo	Nome do gene	Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i>®	Referência
WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B	hs 00536497_m1	NM_058238
WNT8A	Wingless-type MMTV integration site family, member 8A	hs 00230534_m1	NM_058244
WNT8B	Wingless-type MMTV integration site family, member 8B	hs 00610126_m1	NM_003393
WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	hs 00243321_m1	NM_003395
WNT9B	Wingless-type MMTV integration site family, member 9B	hs 00287409_m1	NM_003396

9. REFERÊNCIAS

Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, Iyibozkurt CA, Topuz S, Tuzlali S, Bengisu E, Berkman S. The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas. A clinicopathologic study. *Gynecol Oncol*. 2005 Oct;99(1):36-42.

Alberts, Bruce. *Biologia molecular da célula*. 5ed. Editora Artmed 2010.

Al-Hendy A, Salama SA. Catechol-O-methyltransferase polymorphism is associated with increased uterine leiomyoma risk in different ethnic groups. *J Soc Gynecol Investig*. 2006; 13(2): 136–144.

Alves G, Limbourg-Bouchon B, Tricoire H, Brissard-Zahraoui J, Lamour-Isnard C, Busson D. Modulation of Hedgehog target gene expression by the Fused serine-threonine kinase in wing imaginal discs. *Mech Dev*. 1998 Nov;78(1-2):17-31.

Amant F, Coosemans A.N, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. “Clinical management of uterine sarcomas,” *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 12, pp. 1188– 1198, 2009.

ASSoumarová R, Horová H, Seneklová Z, Ruzicková J, Horová I, Budíková M, Slampa P, Kalábová R. Treatment of uterine sarcoma. A survey of 49 patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2002 Apr;266(2):92-5.

Bakas P, Liapis A, Vlahopoulos S, Giner M, Logotheti S, Creatsas G, Meligova AK, Alexis MN, Zoumpourlis V. Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1878-85.

Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432:324–331.

Berman DM, Desai N, Wang X, Karhadkar SS, Reynon M, Abate-Shen C, Beachy PA, Shen MM. Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol*. 2004; 267: 387-398.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851.

Bertsch E, Qiang W, Zhang Q, Espona-Fiedler M, Druschitz S, Liu Y, Mittal K, Kong B, Kurita T, Wei JJ. MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Mod Pathol*. 2014 Jan 3.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive

human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):172-80.

Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Leodolter S, Mayerhofer K. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine leiomyosarcoma and correlation with different clinicopathological parameters. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1B):729-32.

Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Mayerhofer K. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors. *Fertil Steril.* 2004 Apr;81(4):1062-6.

Bozzini N, Rodrigues CJ, Petti DA, Bevilacqua RG, Gonçalves SP, Pinotti JA. Effects of treatment with gonadotropin releasing hormone agonist on the uterine leiomyomata structure. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Apr;82(4):330-4. PubMed PMID: 12716317.

Brandon DD, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Jun;80(6):1876-81.

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 Mar;78(3):736-43.

Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*. 2010 Sep 29;2(51):51ra70.

Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13630-4.

Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*. 2008 Jan;111(1):144-51.

Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2007 Sep;14(5):344-52. Review.

Cheng CW, Liu YF, Yu JC, Wang HW, Ding SL, Hsiung CN, Hsu HM, Shieh JC, Wu PE, Shen CY. Prognostic significance of cyclin D1, β -catenin, and MTA1 in patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Ann Surg Oncol*. 2012 Dec;19(13):4129-39.

Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5442-7.

Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. *Vitam Horm* 2012;88:1-23. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00001-8. Review.

Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. *Vitam Horm*. 2012;88:1-23.

Ciarmela P, Islam MS, Reis FM, Gray PC, Bloise E, Petraglia F, Vale W, Castellucci M. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2011 Nov Dec;17(6):772-90.

Ciavattini A, Di Giuseppe J, Stortoni P, Montik N, Giannubilo SR, Litta P, Islam MS, Tranquilli AL, Reis FM, Ciarmela P. Uterine Fibroids: Pathogenesis and Interactions with Endometrium and Endomyometrial Junction. *Obstet Gynecol Int*. 2013;2013:173184.

Cohen DJ. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012 Jun;26(3):565-88.

Conceição, JCJ. Ginecologia Fundamental. Editora: Atheneu, 1º Edição, 2005

Crum, C, Contran, V.; Collins, T The female genital tract, in pathologic basis of disease. Editor 1999, WB Saunders, co: Philadelphia.

Cunningham G; Hoffman B; Halvorson, L.M. Williams Gynecology. 1a ed. Editora Mcgraw-Hill Brasil, 2008.

Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. Nature. 1997 Oct 23;389(6653):876-81.

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. Gynecol Oncol. 2010 Jan;116(1):131-9.

Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, Guijarro MV, Bisogna M, Wei J, Socci ND, Levine DA, Michor F, Hernando E. A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. Am J Pathol. 2010 Aug;177(2):908-17. Epub 2010 Jun 17.

Davies SR, Davies ML, Sanders A, Parr C, Torkington J, Jiang WG. Differential expression of the CCN family member WISP-1, WISP-2 and WISP-3 in human colorectal cancer and the prognostic implications. Int J Oncol. 2010 May;36(5):1129-36.

Dong W, Cui J, Tian X, He L, Wang Z, Zhang P, Zhang H. Aberrant sonic hedgehog signaling pathway and STAT3 activation in papillary thyroid cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Jul 15;7(7):1786-93.

Febrasgo, Manual de Orientação – Leiomioma Uterino, São Paulo.2004

Feng Y, Zhao X, Zhou C, Yang L, Liu Y, Bian C, Gou J, Lin X, Wang Z, Zhao X. The associations between the Val158Met in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM). *Gene*. 2013 Oct 25;529(2):296-9.

Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Ying-Song J, Konishi I. Overexpression of hedgehog signaling molecules and its involvement in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1389-98.

Gallet A, Therond PP. Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Dev Biol*. 2005 Jan 1;277(1):51-62.

Gao Y, Meng H, Zhang Y, Jiao T, Hui N. Retrospective analysis of 80 cases with uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma in China, 1988-2007. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Mar 15;7(4):1616-24.

Gökaslan H, Türkeri L, Kavak ZN, Eren F, Şişmanoğlu A, İlvan S, Durmuşoğlu F. Differential diagnosis of smooth muscle tumors utilizing p53, pTEN and Ki-67 expression with estrogen and progesterone receptors. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;59(1):36-40. Epub 2004 Sep 20.

GORLIN RJ, GOLTZ RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med.* 1960 May 5;262:908-12.

Graff, V. *Anatomia Humana*. Editora: Manole, 6ª Edição, 2003.

Griffiths A, D'Angelo A, Amso N. Surgical treatment of fibroids for subfertility: protocol for a Cochrane review. (Update software). *The Cochrane Library* 2003.

Grigoriadis C, Papaconstantinou E, Mellou A, Hassiakos D, Liapis A, Kondi-Pafiti A. Clinicopathological changes of uterine leiomyomas after GnRH agonist therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012;39(2):191-4.

Grings AO, Lora V, Ferreira GD, Brum IS, Corleta Hv, Capp E. Protein expression of estrogen receptors α and β and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest.* 2012;73(2):113-7. doi: 10.1159/000330700. Epub 2012 Feb 22. PubMed PMID: 22377971.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R,

Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996 Jun 14;85(6):841-51.

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Tonegawa S, Konishi I. Involvement of proteasome $\beta 1i$ subunit, LMP2, on development of uterin leiomyosarcma. *N Am J Med Sci*. 2011 Sep;3(9):394-9.

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Nishimura R, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological significance of calponin h1. *FEBS Lett*. 2012 Jun 21;586(13):1824-31.

Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Apr;6(4):306-17. Review. PubMed PMID: 15803137.

Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:513-37.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059-87. Review.

Ip PP, Cheung AN, Clement PB. Uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP): a clinicopathologic analysis of 16 cases. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jul;33(7):992-1005.

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

Ip PP, Tse KY, Tam KF. Uterine smooth muscle tumors other than the ordinary leiomyomas and leiomyosarcomas: a review of selected variants with emphasis on recent advances and unusual morphology that may cause concern for malignancy. *Adv Anat Pathol*. 2010 Mar;17(2):91-112.

Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, Usui H, Shozu M, Bulun SE. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 May;94(5):1752-6.

Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, Usui H, Shozu M, Bulun SE. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 May;94(5):1752-6.

Islam MS, Protic O, Stortoni P, Grechi G, Lamanna P, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P. Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2013 Jul;100(1):178-93.

Jacob J, Briscoe J. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep*. 2003 Aug;4(8):761-5.

Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, Yu MC, Hsiao HI, Chang FY. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma. *Onco Targets Ther* 2013; 7, 79-86.

Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008 Dec;15(6):801-12.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996 Jun 14;272(5268):1668-71.

Kameda C, Nakamura M, Tanaka H, Yamasaki A, Kubo M, Tanaka M, Onishi H, Katano M. Oestrogen receptor-alpha contributes to the regulation of the hedgehog signalling pathway in ERalpha-positive gastric cancer. *Br J Cancer*. 2010 Feb 16;102(4):738-47..

Kar S, Deb M, Sengupta D, Shilpi A, Bhutia SK, Patra SK. Intricacies of hedgehog signaling pathways: a perspective in tumorigenesis. *Exp Cell Res*. 2012 Oct 1;318(16):1959-72.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004 Oct 7;431(7009):707-12. Epub 2004 Sep 12.

Kasperczyk H, Baumann B, Debatin KM, Fulda S. Characterization of sonic hedgehog as a novel NF-kappaB target gene that promotes NF-kappaB mediated apoptosis resistance and tumor growth in vivo. *FASEB J*. 2009 Jan;23(1):21-33.

Katoh M, Hirai M, Sugimura T, Terada M. Cloning and characterization of MST, a novel (putative) serine/threonine kinase with SH3 domain. *Oncogene*. 1995 Apr 6;10(7):1447-51.

Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*. 2009 Sep;9(7):873-86.

Kelley TW, Borden EC, Goldblum JR. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas: an

immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004 Dec;12(4):338-41.

Khan AT, Shehmar M, Gupta JK. Uterine fibroids: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2014 Jan 29;6:95-114. doi: 10.2147/IJWH.S51083. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 24511243; PubMed Central PMCID: PMC3914832.

Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev*. 2013 Feb;34(1):130-62. doi: 10.1210/er.2012-1043. Epub 2013 Jan 9. Review. PubMed PMID: 23303565; PubMed Central PMCID: PMC3565104.

Kim JJ, Sefton EC. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jul 25;358(2):223-31.

Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod*. 2001 Nov;7(11):1085-91.

Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res*. 2004; 64: 6071-6074.

Kurachi O, Matsuo H, Samoto T, Maruo T. Tumor necrosis factor-alpha expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):2275-80.

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

Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, Dupont J, Hensley M, Sonoda Y, Barakat RR, Anderson S. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer.* 2004 Sep 15;101(6):1455-62.

Levanat S, Kappler R, Hemmerlein B, Döring P, Musani V, Komar A, Oreskovic S, Pavelic B, Hahn H. Analysis of the PTCH1 signaling pathway in ovarian dermoids. *Int J Mol Med.* 2004; 14:793-799.

Levy, B. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* v.121, n.1, p.1-8, 2000

Li T, Liao X, Lochhead P, Morikawa T, Yamauchi M, Nishihara R, Inamura K, Kim SA, Mima K, Sukawa Y, Kuchiba A, Imamura Y, Baba Y, Shima K,

Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Qian ZR. SMO Expression in Colorectal Cancer: Associations with Clinical, Pathological, and Molecular Features. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jul 15.

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

Lin J. F, Slomovitz B.M. "Uterine sarcoma 2008," *Current Oncology Reports*, vol. 10, no. 6, pp. 512–518, 2008.

Lin TL, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther*. 2012;5:47-58. doi: 10.2147/OTT.S21957. Epub 2012 Mar 9.

Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 2004 Jun 18;304(5678):1755-9. Review.maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):903-11.

Luo X, Yin P, Coon V JS, Cheng YH, Wiehle RD, Bulun SE. The selective progesterone receptor modulator CDB4124 inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma cells. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2668-73.

Mäkinen N, Heinonen HR, Moore S, Tomlinson IP, van der Spuy ZM, Aaltonen LA. MED12 exon 2 mutations are common in uterine leiomyomas from South African patients. *Oncotarget*. 2011 Dec;2(12):966-9.

Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms *Cancer Biol Ther*. 2005; 4: 728-733.

Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, Wang Y, Spitz IM, Johansson E. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids*. 2000 Oct-Nov;65(10-11):585-92.

Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jan;82(1):293-9.

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

McLellan JS, Zheng X, Hauk G, Ghirlando R, Beachy PA, Leahy DJ. The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):979-83.

Moore AB, Flake GP, Swartz CD, Heartwell G, Cousins D, Haseman JK, Kissling GE, Sidawy MK, Dixon D. Association of race, age and body mass

index with gross pathology of uterine fibroids. J Reprod Med. 2008 Feb;53(2):90-6.

Mueller SO, Clark JA, Myers PH, Korach KS. Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. Endocrinology. 2002 Jun;143(6):2357-65.

Murray FB, Samuel S, Robert GM, Brian OS Sarcomas of the soft tissue and bone In: de Vita JrV, Laurence TS, Rosenberg AS. DeVita, Hellman, Rosenberg's cancer principles e practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008. p.1741-94.

Ng JS, Han A, Chew SH, Low J. A clinicopathologic study of uterine smooth muscle tumours of uncertain malignant potential (STUMP). Ann Acad Med Singapore. 2010 Aug;39(8):625-8.

Niu Y, Li F, Tang B, Shi Y, Hao Y, Yu P. Clinicopathological correlation and prognostic significance of sonic hedgehog protein overexpression in human gastric cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Jul 15;7(8):5144-53.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980 Oct 30;287(5785):795-801.

Ochi H, Pearson BJ, Chuang PT, Hammerschmidt M, Westerfield M. Hhip regulates zebrafish muscle development by both sequestering Hedgehog and modulating localization of Smoothened. *Dev Biol.* 2006 Sep 1;297(1):127-40.

Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008 Aug;22(4):571-88.

Okolowsky N, Furth PA, Hamel PA. Oestrogen receptor-alpha regulates non-canonical Hedgehog-signalling in the mammary gland. *Dev Biol.* 2014 Jul 15;391(2):219-29.

Oliva E, Clement PB, Young RH. Mesenchymal tumours of the uterus: selected topics emphasizing diagnostic pitfalls. *Curr Diagn Pathol* 2002;8:268–282.

Onishi H, Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer. *Cancer Sci.* 2011 Oct;102(10):1756-60. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02010.x. Epub 2011 Jul 26. Review.

Ono M, Qiang W, Serna VA, Yin P, Coon JS 5th, Navarro A, Monsivais D, Kakinuma T, Dyson M, Druschitz S, Unno K, Kurita T, Bulun SE. Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *PLoS One.* 2012;7(5)

Ou YR, Liu J, Gao S, Jing GY, Cheng ZN, Dong XQ. [Expression of secreted frizzled related protein 1, β -catenin and E-cadherin in colorectal carcinoma and

its clinicopathological significances]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2014 Jul;43(4):397-405.

Paces-Fessy M, Boucher D, Petit E, Paute-Briand S, Blanchet-Tournier MF. The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. Biochem J. 2004 Mar 1;378(Pt 2):353-62.

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

Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. Nat Rev Cancer. 2003 Dec; 3 (12):903-11.

Pautier P, Genestie C, Rey A, Morice P, Roche B, Lhommé C, Haie-Meder C, Duvillard P. Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma. Cancer. 2000 Mar 15;88(6):1425-31.

Pérot G, Croce S, Ribeiro A, Lagarde P, Velasco V, Neuville A, Coindre JM, Stoeckle E, Floquet A, MacGrogan G, Chibon F. MED12 alterations in both human benign and malignant uterine soft tissue tumors. PLoS One. 2012;7(6):e40015.

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

Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, Tamez H, Zhang D, Bhan I, Karumanchi SA, Powe NR, Thadhani R. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med*. 2013 Nov 21;369(21):1991-2000.

Proctor AE, Thompson LA, O'Bryant CL. Vismodegib: an inhibitor of the Hedgehog signaling pathway in the treatment of basal cell carcinoma. *Ann Pharmacother*. 2014 Jan;48(1):99-106.

Qu Y, Ray PS, Li J, Cai Q, Bagaria SP, Moran C, Sim MS, Zhang J, Turner RR, Zhu Z, Cui X, Liu B. High levels of secreted frizzled-related protein 1 correlate with poor prognosis and promote tumourigenesis in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Nov;49(17):3718-28.

Rao UN, Finkelstein SD, Jones MW. Comparative immunohistochemical and molecular analysis of uterine and extrauterine leiomyosarcomas. *Mod Pathol*. 1999 Nov;12(11):1001-9.

Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(12):1026–33.

Ruch JM, Kim EJ. Hedgehog Signaling Pathway and Cancer Therapeutics: Progress to Date. *Drugs*. 2013 Apr 20.

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

Ruiz-Gómez A, Molnar C, Holguín H, Mayor F Jr, de Celis JF. The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):901-12.

Sabry M, Al-Hendy A. Medical treatment of uterine leiomyoma. *Reprod Sci.* 2012 Apr;19(4):339-53. doi: 10.1177/1933719111432867. Epub 2012 Feb 28. Review.

Sahebjam S, Siu LL, Razak AA. The utility of hedgehog signaling pathway inhibition for cancer. *Oncologist.* 2012;17(8):1090-9.

Sales CBS. Expressão de componentes da via de sinalização *sonic hedgehog* (hhp, ptch1 e shh) e vegf-a em carcinoma escamocelular oral: associação com imunomarcção de vegf-a e microdensidade vascular. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal da Bahia- Fundação Osvaldo Cruz. 2012.

Sankaran S, Manyonda IT. Medical management of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008 Aug;22(4):655-76.

Schreck KC, Taylor P, Marchionni L, Gopalakrishnan V, Bar EE, Gaiano N, Eberhart CG. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. *Clin*

Cancer Res. 2010 Dec 15;16(24):6060-70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1624.

Sekiguchi H, li M, Jujo K, Renault MA, Thorne T, Clarke T, Ito A, Tanaka T, Klyachko E, Tabata Y, Hagiwara N, Losordo D. Estradiol triggers sonic-hedgehog-induced angiogenesis during peripheral nerve regeneration by downregulating hedgehog-interacting protein. Lab Invest. 2012 Apr;92(4):532-42.

Shwayder J, Sakhel K. Imaging for Uterine Myomas and Adenomyosis. J Minim Invasive Gynecol. 2014 May - June;21(3):362-376.

Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009 May;144 Suppl 1:S2-10.

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz I, Altaba A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Apr 3;104(14):5895-900. Epub 2007 Mar 28.

Stewart EA. Uterine fibroids. Lancet. 2001 Jan 27;357(9252):293-8. Review.

Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM, Ingham PW. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol.* 2001 Apr 17;11(8):608-13.

Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K, Inoue M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology.* 2000 Oct;141(10):3852-61. PubMed PMID: 11014242.

Sun X, Mittal K. MIB-1 (Ki-67), estrogen receptor, progesterone receptor, and p53 expression in atypical cells in uterine symplastic leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010 Jan;29(1):51-4.

Takeda A, Imoto S, Mori M, Nakamura H. Successful pregnancy outcome after laparoscopic-assisted excision of a bizarre leiomyoma: a case report. *J Med Case Rep.* 2011 Aug 3;5:344.

Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma *Embo J.* 2002;21:114–124.

Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the

Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell*. 2006 May;10(5):647-56. Epub 2006 Apr 27.

Terry KL, De Vivo I, Hankinson SE, Missmer SA. Reproductive characteristics and risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril*. 2010 Dec;94(7):2703-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.065. Epub 2010 Jun 8.

Toftgård R. Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Nov;57(12):1720-31. Review.

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

Ünver NU, Acikalin MF, Öner Ü, Ciftci E, Ozalp SS, Colak E. Differential expression of P16 and P21 in benign and malignant uterine smooth muscle tumors. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Aug;284(2):483-90

van den Heuvel M, Ingham PW. smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):547-51.

Varjosalo M, Björklund M, Cheng F, Syvänen H, Kivioja T, Kilpinen S, Sun Z, Kallioniemi O, Stunnenberg HG, He WW, Ojala P, Taipale J. Application of active and kinase-deficient kinome collection for identification of kinases regulating hedgehog signaling. *Cell*. 2008 May 2;133(3):537-48.

Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet.* 2000 Nov;67(5):1047-54.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P, Wei JJ. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Apr;46(4):336-47.

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; 422:313-317.

Wei JJ, Chiriboga L, Arslan AA, Melamed J, Yee H, Mittal K. Ethnic differences in expression of the dysregulated proteins in uterine leiomyomata. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):57-67. Epub 2005 Sep 19.

Wicking C, McGlinn E. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2001 Nov 8;173(1):1-7. Review

Wilkinson SE, Furic L, Buchanan G, Larsson O, Pedersen J, Frydenberg M, leiomyosarcoma by array-based comparative genomic hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Jul;138(7):1173-86.

Williams AR, Bergeron C, Barlow DH, Ferenczy A. Endometrial morphology after treatment of uterine fibroids with the selective progesterone receptor modulator, ulipristal acetate. *Int J Gynecol Pathol*. 2012 Nov;31(6):556-69.

Wise LA, Palmer JR, Stewart EA, Rosenberg L. Age-specific incidence rates for self-reported uterine leiomyomata in the Black Women's Health Study. *Obstet Gynecol*. 2005 Mar;105(3):563-8. PubMed PMID: 15738025; PubMed Central PMCID: PMC1847590.

Wu JM, Wechter ME, Geller EJ, Nguyen TV, Visco AG. Hysterectomy rates in the United States, 2003. *Obstet Gynecol*. 2007 Nov;110(5):1091-5.

Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):90-2.

Yang SH, Hsu CH, Lee JC, Tien YW, Kuo SH, Cheng AL. Nuclear expression of glioma-associated oncogene homolog 1 and nuclear factor- κ B is associated with a poor prognosis of pancreatic cancer. *Oncology*. 2013;85(2):86-94.

Yin P, Lin Z, Cheng YH, Marsh EE, Utsunomiya H, Ishikawa H, Xue Q, Reierstad S, Innes J, Thung S, Kim JJ, Xu E, Bulun SE. Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4459-66.

You S, Zhou J, Chen S, Zhou P, Lv J, Han X, Sun Y. PTCH1, a receptor of Hedgehog signaling pathway, is correlated with metastatic potential of colorectal cancer. *Ups J Med Sci*. 2010 Aug;115(3):169-75.

Zhai YL, Kobayashi Y, Mori A, Orii A, Nikaido T, Konishi I, Fujii S. Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Pathol*. 1999 Jan;18(1):20-8.

Zhao J, Chen G, Cao D, Li Y, Diao F, Cai H, Jin Y, Lu J. Expression of Gli1 correlates with the transition of breast cancer cells to estrogen-independent growth. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan;119(1):39-51.

Zhao Z, Zhang L, Zhang J, Wang J. [Expressions of Sonic hedgehog and matrix metalloproteinase 2 in human esophageal squamous cell carcinoma and the clinicopathological implications]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013 Jul;33(7):1008-11.