BRUNA CRISTINE DE ALMEIDA

Análise funcional dos miRNAs *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR-181d-5p* em células de leiomioma e leiomiossarcoma uterino

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho
Coorientadora: Dra. Cláudia Malheiros
Coutinho Camillo

São Paulo

2021

BRUNA CRISTINE DE ALMEIDA

Análise funcional dos miRNAs *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR-181d-5p* em células de leiomioma e leiomiossarcoma uterino

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

Coorientadora: Dra. Cláudia Malheiros
Coutinho Camillo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Bruna Cristine de
Análise funcional dos miRNAs let-7f-5p, miR-10b-
5p, miR-34a-5p, miR-181b-5p e miR-181d-5p em
células de leiomioma e leiomiossarcoma uterino /
Bruna Cristine de Almeida. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.
Coorientadora: Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo.

Descritores: 1.Leiomiossarcoma uterino
2.Leiomioma uterino 3.MicroRNAs 4.Sarcoma uterino
5.Expressão gênica 6.Cultura celular 7.Epigenética

USP/FM/DBD-045/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este Trabalho é Dedicado

À Deus por seu amor infinito e incondicional, por sua misericórdia, e sobretudo por não me deixar desistir dos meus sonhos, por me conceder oportunidades gloriosas.

*Aos meus amados pais, **Mauro Pandolfo e Maria Aparecida Moura**, pelo amor, pela minha criação, e especialmente por todos os esforços realizados para a minha educação ao longo da vida.*

*Aos meus padrinhos, **Roberto e Célia Spanholi** que são meus segundos pais, pelos ensinamentos, exemplos, carinho e amor, e especialmente por auxiliarem na minha criação.*

*Ao meu esposo **Marcelo Carrião Reis** e sua mãe **Neusa Carrião Soares**, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo constantes a cada dia.*

*Ao meu amado irmão, **Rafael Antônio Pandolfo**, por me incentivar e me apoiar nos momentos de dificuldade, pelo seu amor e carinho de irmão que enche a minha vida de luz.*

Gratidão é o que sinto ao escrever essas palavras.

AGRADECIMENTOS

Os mais sinceros agradecimentos a todos que nos auxiliaram, incentivaram e tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À Prof (a). Dr (a). Kátia Cândido Carvalho, por conceder-me a oportunidade de aprendizado e orientar-me no desenvolvimento deste trabalho enriquecendo com suas contribuições científicas, que muito me engrandece. Por acreditar e apoiar as minhas idéias de cunho científico. Pela amizade e honra de ser sua aluna ao longo desses quatro anos, permitindo-me desfrutar dos seus valiosos ensinamentos ao longo do meu doutorado no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da FMUSP.

À Prof (a). Dr (a). Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, pela competência, colaboração e suporte no desenvolvimento das análises do presente trabalho e pela paciência em transmitir os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, por conceder-me a oportunidade de aprendizado no mundo acadêmico, pelo exemplo de profissionalismo como cientista que muito me engrandeceu com suas contribuições científicas, mormente pela amizade e honra de ter recebido seus valiosos ensinamentos no início da minha carreira.

Aos Professores Dr. Edmund Chada Baracat e Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel, pelo ensejo que me foi outorgado de fazer parte dessa grande equipe de profissionais da pesquisa da área das ciências médicas no Laboratório

de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Agradeço imensamente todo o suporte, incentivo e as orientações ao longo dessa jornada na pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Antonio Augusto Rocha** do Laboratório Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo apoio e preceitos científicos que muito elucidou para a condução da metodologia científica, e sobretudo pela paciência e entusiasmo em transmitir os seus conhecimentos.

À **Dr (a). Mara Hoshida** e aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Obstétrica – LIM 57, **Saete, Cristiane e Isaías**, pelo consentimento e confiança na utilização do espaço e materiais laboratoriais quando necessário.

À **Dr (a). Sueli Mieko Oba Shinjo, Dr (a). Roseli da Silva Soares e Talita Laurentino** do Laboratório de Investigação em Neurologia (LIM 15), pela anuência e confiança na utilização do espaço e materiais laboratoriais quando necessário. Pela confabulação e troca de experiência de cunho científico que enriqueceram o desenvolver das metodologias científicas.

À querida parceira e amiga **Dr (a). Miyuki Uno** do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (LIM 24), por compartilhar os seus preciosos conhecimentos de bioestatística que muito enriqueceram este trabalho, pela disposição e paciência.

À minha querida amiga **Dr (a). Tatiana Megale de Lima**, por incentivar-me a não desistir dos meus sonhos, encorajando-me na carreira profissional e sobretudo pela amizade sincera.

Aos meus queridos colegas e alunos da pós-graduação do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular, **Henderson Narciso**, **Anamaria Ricci**, **Dara Ferreira**, **Aline Aranha**, **Leonardo Tomiatti da Costa**, **Rodrigo Marcondes**, **Luísa Pimenta** e **Giulia Araújo**, por me ajudarem em todos os momentos que se fez necessário, pela paciência, amizade e momentos de descontração.

À minha querida amiga **Kelly Pedrozo Ferreira**, pelas confabulações de cunho científico, amizade, momentos de descontração e carinho que abarrotaram a minha vida acadêmica de alegria.

À minha querida colega **Giovana Maffazioli**, por compartilhar o seu conhecimento auxiliando no desenvolvimento do presente trabalho, pelas críticas construtivas e principalmente pela parceria que deu origem a publicações em congressos e revistas.

Às minhas queridas amigas **Isabela Faria** e **Laura Gonzalez dos Anjos**, por me auxiliarem em diversos momentos ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, pela paciência, dedicação, competência e amizade, que foram essenciais para meu crescimento e conclusão do doutorado, além da cumplicidade na realização de vários projetos que enriqueceram nossas vidas acadêmicas.

À colega **Natália Garcia**, por compartilhar sua expertise de cunho científico auxiliando no meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico. Sobretudo, por me ensinar alguns valores éticos e morais, fortalecendo e despertando em mim a autoconfiança, o espírito de trabalho de equipe e meus prolegômenos.

Ao ex-funcionário e amigo querido **Thiago Hideki**, pelos ensinamentos e todo auxílio durante sua permanência no laboratório, e principalmente por sua amizade.

Às funcionárias e amigas queridas **Juciara da Costa Silva** e **Marinalva Almeida** por todo auxílio e amparo em todos os momentos que se fez necessário, sobretudo pela paciência e amizade.

Aos amigos e funcionários da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Lucinda Cristina Pereira e Claudia Vieira, por todo auxílio e paciência ao longo desses quatro anos de doutorado.

À todos os amigos que nos auxiliaram e, que direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa a nível de doutorado e auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa (Processos FAPESP 2012/23652-0 e 2019/01109-2).

Por fim, porém não menos importante, agradeço a todos os meus familiares que de alguma forma me incentivaram e apoiaram através de gestos ou palavras que me tocaram a alma, renovando as minhas forças ao longo desses quatro anos de pós-graduação, para que eu nunca desistisse desse sonho.

“A conquista do conhecimento é um logro pessoal intransferível. Esse tesouro sempre se multiplica quando é repartido e ninguém pode usurpá-lo de quem o possui.”

Joanna de Ângelis

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Leiomioma uterino (LM)	6
1.2. Leiomiossarcoma uterino (LMS)	15
1.3. MicroRNAs (miRNAs)	25
1.4. Justificativa	42
 2. OBJETIVOS	 45
2.1. Geral	45
2.2. Específicos	45
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 47
3.1. Delineamento experimental	47
3.2. Seleção das amostras de pacientes e extração do ácido ribonucleico (RNA)	47
3.3. Cultura de células	49
3.4. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)	52

3.5. Autenticação celular	53
3.6. Síntese de DNA complementar (cDNA) para as reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em arrays de miRNAs	54
3.7. Transfecção com Mimics e siRNA	58
3.8. Extração do RNA total para avaliação da expressão gênica nas linhagens celulares após manipulação molecular	61
3.9. Síntese de cDNA para qRT-PCR utilizando o sistema de detecção por sondas <i>TaqMan</i> [®]	63
3.10. Curvas de proliferação e avaliação da viabilidade celular	70
3.11. Ensaios de migração (<i>Scratch ou Wound Healing</i>)	71
3.12. Análises <i>in silico</i>	72
3.13. Ensaios de expressão gênica para os genes alvo selecionados ...	72
3.14. Análise estatística	76
4. RESULTADOS	79
4.1. Características clínicas e anatomopatológicas das pacientes	79
4.2. Perfil de expressão basal dos miRNAs em amostras de pacientes e nas linhagens celulares, utilizando os <i>arrays</i>	82
4.3. Validação do perfil de expressão dos miRNAs nas amostras de pacientes e linhagens celulares, utilizando o sistema <i>TaqMan</i> de detecção	83
4.4. Análise funcional dos miRNAs selecionados - <i>miR-34a</i> e <i>miR-181b</i> <i>in vitro</i>	94
4.5. Análise <i>in silico</i> dos miRNAs selecionados e seleção de potenciais alvos	104
5. DISCUSSÃO	116

6. CONCLUSÕES	138
 7. ANEXOS	 141
Anexo A. Tabelas contendo os 84 miRNAs avaliados por qRT-PCR em <i>array</i>	141
Anexo B. Distribuição da idade das pacientes	143
Anexo C. Característica das pacientes	144
Anexo D. Aprovação do Comitê de ética	145
Anexo E. Publicação de artigos relacionados a tese	146
 8. REFERÊNCIAS	 151

APÊNDICES

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	<i>American Cancer Society</i>
AGO1	Proteína argonauta 1
AGO2	Proteína argonauta 2
AGO4	Proteína argonauta 4
Amel	Amelogenina
As	Adenossarcoma
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	<i>ATRX chromatin remodeler</i>
AXL	Receptor de tirosina quinase AXL
A20	Proteína 3 induzida por TNF alfa
BCL2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma2</i> - regulador de apoptose
B2M	Beta-2-Microglobulina
CA	Califórnia
CC	Controle celular
CCND1	Ciclina D1
CD	Células dendriticas
CDK4	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 6</i>
CDKN1A (P21)	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CDKN2A (P16)	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD44	Molécula CD44 (grupo sanguíneo indiano)
CD80	Molécula CD80
CD84	Molécula CD84
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
COL4A5	Cadeia alfa 5 de colágeno tipo IV
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CS	Carcinossarcoma

CTNNB1	β -catenina
CYLD	CYLD lisina 63 desubiquitinase
CYP19A1	<i>Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1</i>
DCC	<i>DCC netrin 1 receptor</i>
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
Drosha	<i>RNase III enzyme Drosha</i>
EGFP	Proteína verde fluorescente enriquecida
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELK1	Fator de transcrição ETS
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i> - Transição epitélio mesenquima
Endo-siRNA	RNAs endógenos curtos de interferência
Enso-shRNA	RNAs endógenos curto <i>hairpin</i>
ERCC1	Reparo de excisão ERCC 1, subunidade não catalítica de endonuclease
ERK	Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
ER α	Receptor de estrogênio alfa
ER β	Receptor de estrogênio beta
ESR1	Receptor de estrogênio 1
ETS1	ETS proto-oncogene 1 - fator de transcrição
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administração de Alimentos e Medicamentos
FGF7	Fator de crescimento de fibroblasto 7
FGF14	Fator de crescimento de fibroblasto 14
FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FR	<i>Fold regulation</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina 1
GNRHR	Receptor de hormônio liberador de gonadotrofina
HDAC8	Histona desacetilase 8
HER2	Receptor erb-b2 tirosina quinase 2
HMGA2	<i>High Mobility Group AT-Hook 2</i>
HOXA1	<i>Homeobox A1</i>
HOXD10	<i>Homeobox D10</i>
HR	<i>Harzard ratio</i>
IC95%	Intervalo de confiança 95%
IGF1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
IL12	Interleucina 12
Indels	Inserções e deleções
INPP4B	Inositol polifosfato-4-fosfatase tipo II B
Ki-67	Marcador de proliferação Ki-67
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
LAMP2	Proteína 2 associada à membrana lisossômial
LEF1	<i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i>
let-7	<i>Lethal-7</i>
LIM 58	Laboratório de investigação médica 58
LIN-28	<i>Lin-28 homolog A</i> – gene codificante de proteína de ligação ao RNA
LM	Leiomioma
LMOD1	<i>Leiomodin 1</i>
LMS	Leiomiossarcoma
MA	Massachusetts
MAPK	Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
MAPK13	Proteína quinase ativada por mitogênio 13
MED12	Subunidade complexa mediadora 12
MDM2	Proto-oncogene MDM2
MDM4	Regulador de p53
MELK	Quinase materna embrionária de leucina
MET	Proto-oncogene MET - receptor tirosina quinase

MGB	Sonda MGB TaqMan
MgCl ₂	Cloreto de Megnésio
MGMT	O-6-metilguanina-DNA metiltransferase
MIB	<i>Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase</i>
miR-Amp	Amplificação do microRNA
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitros
MM	Miométrio
mm	Milímetros
MMP2	Matriz metalopeptidase 2
MMP9	Matriz metalopeptidase 9
MO	Missouri
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRX34	Ativador de expressão lipossômico do <i>miR-34a</i>
MYC	<i>V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYH9	<i>Myosin heavy chain 9</i> - Cadeia pesada de miosina 9
MYH11	Cadeia pesada de miosina 11
MYLK	Quinase de cadeia leve da miosina
μL	Microlitros
μM	Micromolar
NA	Não avaliável
NFQ	Corante <i>quencher</i> ou supressor
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NOTCH1	<i>Notch Homolog 1, Translocation-Associated</i>
NOVA1	<i>NOVA alternative splicing regulator 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> - Fase de leitura aberta
nt	Nuclotídeos
PACT	Proteína ativadora de quinase R
pb	Pares de base
PAP	Polimerase poli(A)
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFRA	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PD-L1	Molécula CD274
PGR	Receptor de progesterona
pH	Potencial hidrogeniônico
PHLPP2	Domínio PH e proteína fosfatase 2 de repetição rica em leucina
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade catalítica beta
Pre-miRNA	MicroRNA precursor
Pre-mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro precursor
Pre-tRNA	Precursor do RNA transportador
Pri-miRNA	Transcrito primário de miRNA
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
p16	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
p53	Proteína tumoral p53
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
R ²	Regressão linear
Ran-GTP	Proteína nuclear relacionada ao RA ou de ligação a GTP Ran
RAS	<i>Resistance to audiogenic seizures</i>
RB1	Corepressor transcricional RB 1
RE	Receptor de estrogênio
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
rpm	Rotações por minuto
RQ	<i>Relative quantification</i> - Quantificação relativa
RT	Transcriptase reversa
SBP	Sociedade Brasileira de Patologia
SCE	Sobrevida câncer específica

SEE	Sarcoma de estroma endometrial
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SG	Sobrevida global
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> - RNA em formato de grampo curto
siRNA	RNA interferente pequeno
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SLD	Sobrevida livre de doença
SLMAP	Proteína associada ao sarcolema
SNAIL1	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>
SnoRNA	RNAs pequeno nucleolar
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STR	<i>Short tandem repeat</i> - Sequências de repetições curtas
TAP63	<i>TAp63 promoter of tumor protein p63</i>
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta 1
TIMP3	Inibidor tissular de metaloproteinase TIMP 3
TNFAIP3	Proteína 3 induzida por TNF alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
TRBP	Proteína de ligação a RNA de cadeia dupla
TWIST1	<i>Twist family bHLH transcription factor 1</i>
UTR	Região não codificadora
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VIPR2	Receptor 2 do peptídeo intestinal vasoativo
WI	Wisconsin
WNT	Proteínas de sinalização WNT
WT1	Fator transcricional WT1
YWHAE	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon</i>
xg	Força gravitacional centrífuga
Xpo5	<i>Exportin-5</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
34a si	siRNA do <i>miR-34a</i>
181b si	siRNA do <i>miR-181b</i>

34a M	Mimic do <i>miR-34a</i>
181b M	Mimic do <i>miR-181b</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura uterina mostrando em destaque o tecido miometrial	3
Figura 2 - Categorização dos LM de acordo com sua localização no útero	8
Figura 3 - Teoria da etiologia e crescimento dos LM uterinos a partir da desregulação das células-troncos / progenitoras	11
Figura 4 - miRNAs e seus genes alvos validados em tecido miometrial e no LM	13
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos epigenéticos envolvidos na origem dos LM e LMS	24
Figura 6 - Perfil de expressão dos miRNAs em amostras de pacientes e linhagens celulares de LM e LMS	25
Figura 7 - Estrutura molecular de um miRNA	26
Figura 8 - Via canônica da biogênese dos miRNAs	29
Figura 9 - Vias não canônicas da biogênese dos miRNAs	31
Figura 10 - miRNAs podem funcionar como supressores de tumores e / ou oncogenes	34
Figura 11 - Esquema do desenvolvimento metodológico e fluxo de trabalho	48

Figura 12 - Fotomicrografia das células de MM (PCS-460-011) em cultura (aumento de 40X)	50
Figura 13 - Fotomicrografia das células de LM (THESCs – CRL-4003) em cultura (aumento de 40X)	50
Figura 14 - Fotomicrografia das células de LMS (SK-UT-1 – HTB-114) em cultura (aumento de 40X)	51
Figura 15 - Conversão de miRNAs maduros em cDNA e sua detecção	55
Figura 16 - Desenho das placas <i>MIHS-109ZA</i> e <i>MIHS-102ZA</i> de 96 poços contendo 84 miRNAs, 6 controles e 6 normalizadores em cada uma delas	57
Figura 17 - Esquema de funcionamento das construções para indução (Mimic) e inibição (siRNA) da expressão dos miRNAs	59
Figura 18 - Síntese do cDNA	67
Figura 19 - Representação geral do ensaio de qRT-PCR para detecção de miRNAs	69
Figura 20 - Gel de agarose (2%) representativo do perfil de amplificação do GAPDH por PCR	74
Figura 21 - Perfil de expressão dos miRNAs <i>let-7f</i> , <i>miR-10b</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-181b</i> e <i>miR-181d</i>	83
Figura 22 - Validação do perfil de expressão dos miRNAs <i>let-7f</i> , <i>miR-10b</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-181b</i> e <i>miR-181d</i>	84

Figura 23 -	Curvas de sobrevida global (SG) das pacientes com LMS em função do perfil de expressão dos miRNAs avaliados ..	88
Figura 24 -	Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) das pacientes com LMS em função do perfil de expressão dos miRNAs avaliados	89
Figura 25 -	Curva de Kaplan-Meier das pacientes com LMS em função da presença ou ausência de metástase na SG	92
Figura 26 -	<i>Fold</i> de expressão do <i>miR-34</i> e <i>miR-181b</i> em células de LM e LMS	98
Figura 27 -	Proliferação celular das linhagens de LM e LMS	100
Figura 28 -	Ensaio de migração com as células transfectadas para <i>miR-34a</i>	102
Figura 29 -	Ensaio de migração com células transfectadas para <i>miR-181b</i>	103
Figura 30 -	Estrutura molecular do <i>miR-34a</i> e <i>miR-181b</i>	104
Figura 31 -	Rede de interações do <i>miR-34a</i>	105
Figura 32-	Rede de interações do <i>miR-181b</i>	107
Figura 33 -	Perfil de expressão dos genes alvos do <i>miR-34a</i> após a manipulação molecular	110
Figura 34 -	Perfil de expressão dos genes alvos do <i>miR-181b</i> após a manipulação molecular	113

Figura 35 - Comparação da idade das pacientes nos grupos MM, LM e LMS	143
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos tumores de músculo liso de acordo com a Organização Mundial da Saúde 2014	4
Tabela 2 - Critérios de diferenciação dos tumores de musculatura lisa	5
Tabela 3 - Critérios anátomopatológicos do leiomiossarcoma de tecido mole profundo	5
Tabela 4 - Estadiamento do leiomiossarcoma uterino – FIGO 2009 .	18
Tabela 5 - Condições utilizadas nas reações de autenticação celular	53
Tabela 6 - Condições utilizadas nas reações de qRT-PCR em <i>array</i>	57
Tabela 7 - Construções para transfecção celular dos miRNAs	59
Tabela 8 - Concentração dos reagentes utilizados no ensaio de transfecção celular	61
Tabela 9 - Condições utilizadas nas reações da cauda poli(A)	63
Tabela 10 - Condições utilizadas nas reações de ligação do adaptador	64
Tabela 11 - Condições utilizadas nas reações de transcrição reversa	65
Tabela 12 - Condições utilizadas nas reações de <i>miR-Amp</i>	66
Tabela 13 - miRNAs selecionados para o ensaio qRT-PCR	68

Tabela 14 - Condições utilizadas nas reações de qRT-PCR	68
Tabela 15 - Concentração dos reagentes para a transfecção celular .	70
Tabela 16 - Condições utilizadas nas reações de síntese de cDNA	73
Tabela 17 - Condições utilizadas nas reações de PCR para <i>GAPDH</i>	73
Tabela 18 - Condições utilizadas nas reações de expressão gênica ..	75
Tabela 19 - Comparação entre as médias de idade das pacientes por grupo histológico	79
Tabela 20 - Características clínicas das pacientes incluídas no estudo por tipo histológico	79
Tabela 21 - Frequência de distribuição das características clínicas e anatomopatológicas das pacientes com leiomiossarcoma	80
Tabela 22 - Grau de correlação da expressão dos miRNAs avaliados	85
Tabela 23 - Análise univariada para SG em relação à expressão dos miRNAs e as características das pacientes com LMS	90
Tabela 24 - Análise univariada para SLD em relação à expressão dos miRNAs e as características das pacientes com LMS	91
Tabela 25 - Análise multivariada de risco proporcional (modelo Cox) da recidiva, metástase e expressão dos miRNAs avaliados	93

Tabela 26 - Perfil de expressão dos miRNAs em <i>fold regulation</i> e quantificação relativa nas amostras de pacientes com LM e LMS uterinos e linhagens celulares	94
Tabela 27 - Detecção dos alelos nos <i>locus STR</i> e amelogenina nas três linhagens celulares utilizadas	95
Tabela 28 - Lista dos miRNAs avaliados e posição na placa de 96 poços <i>MIHS-109ZA</i>	141
Tabela 29 - Lista dos miRNAs avaliados e posição na placa de 96 poços <i>MIHS-102ZA</i>	142
Tabela 30 - Análise da idade dos pacientes de acordo com o perfil de expressão dos miRNAs	143
Tabela 31 - Análise das características clínicas e patológicas de pacientes com metástase e sem metástase	144

RESUMO

Almeida BC. *Análise funcional dos miRNAs let-7f-5p, miR-10b-5p, miR-34a-5p, miR-181b-5p e miR-181d-5p em células de leiomioma e leiomiossarcoma uterino* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A expressão anormal dos miRNAs está diretamente associada ao desenvolvimento de neoplasias por regular a expressão de genes supressores tumorais e oncogenes. Assim, sua desregulação está intimamente relacionada a um pior prognóstico e comprometimento da resposta terapêutica. Embora esteja bem estabelecido o papel dos miRNAs em diversos tipos de cânceres, pouco se sabe sobre sua função nos tumores de músculo liso uterinos. Os leiomiossarcomas (LMS) são tumores raros com altas taxas de mortalidade e recorrência, enquanto os leiomiomas (LM) são tumores frequentes com ampla variabilidade histológica. A origem desses tumores é incerta, sendo controversa a possível malignização de um LM, e seu diagnóstico diferencial ainda representa grande desafio na prática médica. Nosso grupo, em trabalho anterior, identificou uma série de miRNAs associados ao desenvolvimento de tumores com expressão diferencial entre LM e LMS uterinos. O principal objetivo desta tese foi selecionar e caracterizar miRNAs que pudessem ser aplicáveis para fins de diagnóstico diferencial, predição de prognóstico e resposta à terapêutica, ou ainda potenciais alvos para terapia específica nesses tumores. Cinco miRNAs (*let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR-181d-5p*) foram selecionados para análise e caracterização em amostras de pacientes e linhagens celulares. A partir desses resultados, *miR-34a* e *miR-181b* foram selecionados para análise dos efeitos de sua indução (Mimic) e inibição (siRNA) *in vitro*. Após a manipulação molecular desses miRNAs, foram avaliadas a proliferação e migração celular, bem como a expressão de alguns de seus genes alvo (*CCND1*, *MDM4*, *TP53* e *BCL2* para o *miR-34a*; e *TIMP3*, *FGFR1*, *ESR1* e *BCL2* para o *miR-181b*). Nossos resultados mostraram associação entre perda de expressão de *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a* e *miR-181d* e uma pior sobrevida global das pacientes. A expressão de *let-7f* e *miR-181d* foi associada a menor sobrevida livre de doença. A transfecção das células com *miR-34a*-Mimic e siRNA resultou em menor proliferação e migração das duas linhagens. *miR-181b*-Mimic induziu menor proliferação e migração no LM, enquanto o siRNA afetou somente a proliferação. No LMS, a proliferação foi inibida somente com o siRNA, enquanto a migração foi menor após transfecção com o *miR-181b*-Mimic e siRNA. Adicionalmente, *miR-34a* parece regular a expressão de *CCND1*, *MDM4*, *TP53* e *BCL2*, nos LMS, uma vez que sua maior expressão coincidiu com menores níveis de *CCND1* e sua inibição resultou no aumento de *MDM4*, *TP53* e *BCL2*. A inibição do *miR-181b* levou a maior expressão de *ESR1*, no LM, e de *BCL2*, no LMS. Embora estudos mais detalhados sejam necessários para definir a utilização de *miR-34a* e *miR-181b* para fins de diagnóstico, prognóstico e alvo terapêutico nesses tumores, nosso estudo demonstrou um potencial promissor dessas moléculas como biomarcadores moleculares no LMS uterino.

Descritores: Leiomiossarcoma uterino; Leiomioma uterino; MicroRNAs; Sarcoma uterino; Expressão gênica; Cultura celular; Epigenética.

ABSTRACT

Almeida BC. *Functional analysis of let-7f-5p, miR-10b-5p, miR-34a-5p, miR-181b-5p and miR-181d-5p miRNAs in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma cells* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Abnormal expression of miRNAs is directly associated with neoplasias development because they regulate the expression of tumor suppressor and oncogenes. Thereby, their deregulation are closely related to a worse prognosis and impairment of treatment response. Although the role of the miRNAs is well established in several cancer types, little is known about their function in uterine smooth muscle tumors. Leiomyosarcomas (LMS) are rare tumors with high rates of mortality and recurrence, while the leiomyoma (LM) are frequent tumors with wide histological variability. The origin of these tumors is uncertain, being controversial the possibility of malignancy of a LM, and its differential diagnosis represents a great challenge in medical practice yet. Our group, in a previous study identified several miRNAs associated with tumors development with differential expression between the LM and LMS. The main aim of this thesis was to select and characterize miRNAs that might be useful for differential diagnosis, prognostic prediction, and therapeutic response, or potential targets for specific therapy in these tumors. Five miRNAs (*let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* and *miR-181d-5p*) were selected for characterization and assessment in patients samples and cell lines. Based on these results, the *miR-34a* and *miR-181b* were selected for in vitro analysis of induction (Mimic) and inhibition (siRNA) of their expressions. After the molecular manipulation of these miRNAs, the cell proliferation and migration were evaluated, as well as the expression of some target-genes (*CCND1*, *MDM4*, *TP53* and *BCL2* for *miR-34a*; and *TIMP3*, *FGFR1*, *ESR1* and *BCL2* for *miR-181b*). Our results showed an association between loss expression of *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, and *miR-181d* and a worse overall survival of patients. Expression of *let-7f* and *miR-181d* were associated with the lowest disease-free survival. Cell tranfection with *miR-34a* Mimic and siRNA led to a decrease of proliferation and migration in both cell lines. *miR-181b* Mimic induced a decrease of proliferation and migration in LM, while the siRNA affected only the cell proliferation. In the LMS, the proliferation was inhibited only with the siRNA, while the cell migration was lower after *miR-181b* Mimic and siRNA. Additionally, *miR-34a* seems to regulate the *CCND1*, *MDM4*, *TP53* and *BCL2* expressions in LMS, since its greater expression corresponded with the lowest levels of *CCND1*, and its inhibition led to the increased of *MDM4*, *TP53*, and *BCL2*. Inhibition of *miR-181b* led to the greater expression of *ESR1* in LM, and *BCL2* in LMS. Although more detailed studies are necessary to define the use of *miR-34a* and *miR-181b* for diagnostic purposes, prognostic and therapeutic target in these tumors, our study demonstrated the promising potential of these molecules as molecular biomarkers in uterine LMS.

Descriptors: Uterine leiomyosarcoma; Uterine leiomyoma; MicroRNAs; Uterine sarcoma; Gene expression; Cell culture; Epigenetics.

1. INTRODUÇÃO

A estrutura do corpo uterino é composta por interface mucosa-muscular derivada dos ductos embrionários Müllerianos e apresenta uma divisão de acordo com as características teciduais, consistindo em endométrio interno e miométrio (MM) externo (Uduwela et al., 2000; Commandeur et al., 2015; Nothnick, 2016). A arquitetura estrutural do endométrio e MM passam por diferentes procedimentos de remodelação para acomodar os estágios reprodutivos importantes, sob a ação de esteroides sexuais (Figura 1) (Uduwela et al., 2000; Nothnick, 2016; Kuperman et al., 2020). Por apresentar alta plasticidade e capacidade regenerativa durante os eventos reprodutivos, acredita-se na existência de células-tronco no útero (Teixeira et al., 2008; Commandeur et al., 2015). Além disso, foi verificado, em um estudo de citometria de fluxo, que aproximadamente 3% das células miometriais apresenta propriedades de células-tronco (Commandeur et al., 2015).

O endométrio interno é composto por epitélio luminal, epitélio glandular e estroma endometrial. O MM, consiste principalmente em células musculares lisas, organizadas para a máxima eficiência das contrações e por uma extensa rede de grandes artérias, veias e vasos linfáticos (Commandeur et al., 2015).

A complexa estrutura do MM é regulada por vias endócrinas, parácrinas e mesenquimais (Ono et al., 2014), podendo passar por processos de transformação que levam à formação de tumores. Esses tumores são muito frequentes no trato genital feminino (Devereaux et al., 2019; Parra-Herran et al., 2019). A estimativa do American Cancer Society (ACS) para os tumores

mesenquimais do corpo uterino em 2020 é de 65.620 novos casos e 12.590 mortes (ACS, 2019).

FONTE: <https://www.hormones-australia.org.au/the-endocrine-system/ovaries/>
Figura 1 – Estrutura uterina mostrando em destaque o tecido miometrial.

Os tumores puros da musculatura lisa uterina são classificados com base em sua morfologia, de acordo com o fenótipo das células que os compõem. O tumor benigno é denominado leiomioma (LM) e o maligno leiomiossarcoma (LMS) (Dos Anjos et al., 2019; Gadducci et al., 2019; Parra-Herran et al., 2019). Conquanto, quando o diagnóstico exclui o LM e os critérios para o LMS não são atendidos, os tumores são denominados de tumor de musculo liso com potencial maligno incerto (do inglês *smooth muscle tumor of uncertain malignant potential* – *STUMP*). Esses tumores não podem ser definitivamente classificados como benignos ou malignos (Kobayashi, 2013; Conconi et al., 2017; Dvorská et al., 2019; Gadducci et al., 2019; Rubisz et al., 2019), assim a classificação dos tumores de musculatura lisa conforme a última revisão da Organização Mundial da Saúde (OMS) está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos tumores de músculo liso de acordo com a Organização Mundial da Saúde 2014

Neoplasias do miométrio			
Leiomíoma (Benigno)	Leiomíoma com apresentação incomum	Tumor de músculo liso de potencial maligno incerto (Potencial incerto)	Leiomiossarcoma (Maligno)
<ul style="list-style-type: none"> Leiomíoma celular Leiomíoma epitelióide Leiomíoma mixóide Leiomíoma atípico Lipoleiomíoma 	<ul style="list-style-type: none"> Leiomiomatose difuso Leiomiomatose intravenosa Leiomíoma metastático benigno 	<ul style="list-style-type: none"> Não há definições específicas 	<ul style="list-style-type: none"> Variante epitelióide Variante mixóide

FONTE: Rubisz et al., 2019.

Atualmente, foi determinado um grande número de critérios para diferenciação e diagnóstico final desses tumores (Tabela 2). Algumas características histológicas propostas pela Universidade de Stanford em 1994 (Tabela 3), auxiliam na identificação desses tumores, como citologia atípica, contagem mitótica e necrose celular (Gadducci et al., 2008; Chiang et al., 2013; Rubisz et al., 2019).

Tabela 2 – Critérios de diferenciação dos tumores de musculatura lisa

Tumor benigno	Tumor maligno
<ul style="list-style-type: none"> Baixo índice mitótico (< 5 valores mitóticos para 10 campos de alta potência) Sem atipia celular Sem necrose tumoral (com exceção da necrose isquêmica) Apresentação típica das células musculares lisas com forma e tamanho uniformes Nenhum componente intravascular Tumor bem demarcado 	<ul style="list-style-type: none"> Grande índice de mitótico (≥ 5 por 10 campos de alta potência) Significante número de atipia celular Áreas de necrose de células tumorais com apresentação semelhante a ilha

FONTE: Rubisz et al., 2019.

Tabela 3 - Critérios anátomopatológicos do leiomiossarcoma de tecido mole profundo

Leiomioma (requer tudo abaixo)	Tumor de músculo liso de potencial maligno incerto (usado para qualquer um dos itens abaixo)	Leiomiossarcoma (requer qualquer um dos itens abaixo)
<ul style="list-style-type: none"> Citologia fraca < 1 Índice mitótico / 50 campos de alta potência Sem necrose tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> Citologia fraca 1-4 Índice mitótico / 50 campos de alta potência Múltiplas recorrências, mas sem outras características atípicas 	<ul style="list-style-type: none"> Citologia com pleomorfismo ou atipia > 4 Índice mitótico / 50 campos de alta potência

FONTE: Rubisz et al., 2019; Stanford University, 2020.

Entretanto, a heterogeneidade tumoral mostra que a avaliação da malignidade não pode ser baseada somente nesses fatores. Uma grande variedade de características pode ser observada nos tumores de musculo liso, como pleomorfismo nuclear, hipercromatismo irregularidade nas membranas nucleares, núcleo aumentado e nucléolos proeminentes que são indicativos de malignidade. Esses critérios atualmente adotados para o diagnóstico de LM e LMS não são uniformes e foram revisados por Dos Anjos et al. (2019). O diagnóstico específico do LMS é obtido sempre após a cirurgia (Tantitamit et al., 2018; Dos Anjos et al., 2019; Suzuki et al., 2019).

1.1. Leiomioma uterino (LM)

Conhecido também como fibróide uterino, o LM possui grande quantidade de matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos, fibronectina e lamininas), envolvido por uma fina cápsula aureolar de tecido contendo vasos e fibras musculares (Santulli et al., 2013; Vilos et al., 2015; Islam et al., 2018; Baranov et al., 2019; Lazzarini et al., 2020). É a neoplasia benigna mais comum na idade reprodutiva, atingindo até 80% das mulheres (Kim et al., 2013; Delaney et al., 2017; Febrasgo, 2017; Tantitamit et al., 2018; Adams et al., 2019), sendo que a maior incidência ocorre nas afrodescendentes (McWilliams et al., 2017; Islam et al., 2018). Pode ser assintomático na sua maioria, quase 75% dos casos, sendo encontrado ocasionalmente durante exames abdominais, pélvico bimanual ou ultra-sonografia (Corleta et al., 2007; Sohn et al., 2018). Quando ocorrem sintomas, essas lesões podem interromper as funções do útero, causando sangramento excessivo, anemia, implantação defeituosa de um embrião, perda recorrente da gravidez, trabalho de parto prematuro, desconforto

pélvico e incontinência urinária, além de poder mascarar tumores malignos pela sua semelhança (Hassan et al., 2011; Bulun, 2013; Yang et al., 2016; Williams, 2017).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do LM incluem nuliparidade, menarca precoce, aumento da frequência menstrual, histórico de dismenorreia, histórico familiar, obesidade, idade e etnia. Adicionalmente, dois fatores clínicos, hipertensão e diabetes, parecem aumentar o risco de LM (Vilos et al., 2015).

A localização e tamanho do LM são fatores críticos e determinantes para as manifestações clínicas (Sohn et al., 2018). O tamanho tumoral ainda pode estar relacionado às variações nos marcadores moleculares, uma vez que as diferenças moleculares refletem nas diferentes taxas de crescimento tumoral (Ciavattini et al., 2013). São categorizados com base na sua localização no útero (Figura 2), podendo ser multifocais ou solitários (Sato et al., 2016; McWilliams et al., 2017). O LM submucoso cresce logo abaixo do revestimento uterino e na cavidade endometrial; intramural, cresce na parede do miométrio entre os músculos do útero; subseroso cresce na cavidade peritoneal, do lado de fora do útero. Alguns LM também são categorizados como pedunculados, por crescerem na superfície externa ou interna do útero, ligados apenas por uma estreita ramificação (Bulun, 2013; Park et al., 2013; Vilos et al., 2015; Sato et al., 2016; NIH, 2017; Kinkel et al., 2018). Independentemente do tamanho ou localização, os LM podem ter efeitos moleculares parácrinos no endométrio adjacente que são suficientemente extensos para causar sangramento uterino excessivo ou implantação defeituosa (Bulun, 2013).

FONTE: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/uterine/conditioninfo> (modificado).

Figura 2 - Categorização do LM de acordo com sua localização no útero.

A atividade ovariana é essencial para o crescimento do LM, pois uma das principais características é a dependência dos esteroides ovarianos, estrogênio e progesterona (Yin et al., 2010; Hassan et al., 2011; Kim et al., 2013; Tsigkou et al., 2015; McWilliams et al., 2017; Chodankar et al., 2019). Na regulação hormonal, as elevações e declínios acentuados nos níveis de estrogênio e progesterona, exercem um efeito dramático no crescimento do LM (Bulun, 2013; Borahay et al., 2015; Rubisz et al., 2019). Acredita-se que a progesterona pode ser um fator dominante na fisiopatologia do LM e no estímulo de seu crescimento (Rubisz et al., 2019). Com isso, a maioria dos LM diminui no período da pós-menopausa (Bulun, 2013; Borahay et al., 2015; Ciebiera et al., 2018), embora possam aumentar com o uso de altas doses de terapia de reposição hormonal (Kim et al., 2013). Outros fatores como o estradiol, que é a forma mais ativa do estrogênio e seus metabólitos, também podem atuar na iniciação e indução do crescimento tumoral (Hassan et al., 2011).

Embora a sua origem não seja bem caracterizada, vários estudos indicam que o LM é um tumor monoclonal (Kim et al., 2013; Ono et al., 2014; Tsigkou et al., 2015; Sato et al., 2016; Ciebiera et al., 2020), em que cada LM se origina da transformação de uma única célula-tronco somática do MM sob a influência hormonal (Kim et al., 2013; Ono et al., 2014; Commandeur et al., 2015; Ikhen et al., 2018). No entanto, essa hipótese ainda não foi comprovada.

Modelos experimentais revelaram que o crescimento do LM requer a presença de células-tronco somáticas multipotentes (Bulun, 2013; Ono et al., 2014). Em comparação com as células normais miometriais, as células-tronco fibroides expressam níveis mais baixos de receptores para estrogênio e progesterona (Chodankar et al., 2019). Para o crescimento de células-tronco fibroides é necessária a presença de células miometriais maduras com maior expressão de receptores hormonais e seus ligantes (iniciação tumoral), indicando que a ação dos hormônios esteroides nessas células-tronco pode ser mediada pelas células do MM por interação parácrina (Bulun, 2013; Chodankar et al., 2019). É muito provável que a interação parácrina com células circundantes dê sustentação para auto-renovação das células-tronco fibroides, levando à sua divisão descontrolada e posterior diferenciação em células de músculo liso fibroide maduras (manutenção do crescimento). Durante esse mecanismo, as células podem adquirir muitas alterações epigenéticas e fenotípicas. Assim, uma única célula-tronco fibroide transformada, eventualmente origina um tumor benigno que se expande dentro do tecido miometrial (Figura 3). A formação da matriz extracelular contribui substancialmente para a expansão do LM (Bulun, 2013). Seu crescimento é lento

e geralmente é cercado por uma área vascular extremamente densa, constituída por fibras musculares compridas que suprem o tumor (Laganà et al., 2017).

Ao longo dessa transformação, algumas alterações complexas nas vias de sinalizações genéticas associadas ao LM podem ocorrer, envolvendo fatores esteroides e de crescimento (Zeng et al., 2017; Ciebiera et al., 2018) bem como, por mutações germinativas causadas pela deficiência de fumarato hidratase que predispõe ao desenvolvimento de múltiplos LM no útero. As mutações também são frequentemente encontradas em genes como *MED12* e *COMT*. Alterações a níveis transcricionais podem ser encontradas em genes da família *COL4A5* e *HMGA2* entre outros (Williams, 2017; Baranov et al., 2019; Dos Anjos et al., 2019; Mas et al., 2019; Ciebiera et al., 2020). Uma variedade de rearranjos cromossomais vem sendo descritos em mais de 40% dos LM, entre eles estão *HMGA2*. Outras alterações moleculares de ordem epigenéticas estão sendo identificadas, como metilação de DNA, modificação de histonas e vias de sinalização de pequenos e longos RNAs não codificantes, sendo que deste ultimo o principal e mais estudado são os microRNAs (miRNAs) (Bulun, 2013; Ciavattini et al., 2013; Navarro et al., 2014; Ono et al., 2014; Segars et al., 2014; McWilliams et al., 2017; Chuang et al., 2018; Chodankar et al., 2019; Lazzarini et al., 2020; Lu et al., 2020a).

FONTE: Commandeur et al., 2015 (modificado).

Figura 3 - Teoria da etiologia e crescimento dos LM uterinos a partir da desregulação das células-tronco / progenitoras. A) As células-tronco / progenitoras miométriais normais respondem aos hormônios esteroides ovarianos por auto-renovação e diferenciação de novas células musculares lisas do MM durante o ciclo normal, gravidez e reparo pós-parto (¹células miométriais ativamente em divisão; ²células maduras do músculo liso miométrial). B) As células-tronco / progenitoras do MM podem sofrer

desregulação após um evento ou impacto genético tornando-se uma célula de músculo liso fibróide e uma célula tronco / progenitora de matriz extracelular (³células miometriais ativamente em divisão; ⁴células maduras do músculo liso do fibroide). C) As células-tronco / progenitoras do músculo liso fibroide não respondem corretamente aos estímulos ou fatores locais para manter a homeostase do tecido e assim, inicia-se o processo de formação tumoral (⁵célula-tronco mutada do MM ou fibroide; ⁶matriz extracelular do tecido fibroide; ⁷células fibroides ativamente em divisão; ⁸células maduras do músculo liso fibroide; ⁹células maduras do músculo liso miometrial).

O perfil de marcadores epigenéticos são altamente homogêneos no MM normal, ao contrário do observado para o LM (Ciavattini et al., 2013; Sato et al., 2016). Fato que leva a crer que o LM nem sempre se origina e desenvolve da mesma forma ou pelo mesmo mecanismo, indicando que uma complexa rede de interações genéticas e epigenéticas estão envolvidas na sua patogenesia (Sato et al., 2016). Cerca de 50 a 100 miRNAs são diferencialmente expressos em fibroides comparados com o MM em amostras pareadas de pacientes (Zota et al., 2020).

Os miRNAs são agentes reguladores pós-transcricionais que estão frequentemente alterados em tumores (Yang et al., 2016). Algumas propriedades do LM são reguladas por diferentes miRNAs (Yang et al., 2016), alterando seu efeito na homeostase estrutural do trato genital feminino (Ciebiera et al., 2018). Muitos miRNAs que regulam os mecanismos celulares de proliferação, apoptose, adesão celular, renovação da matriz extra-celular, sinalização da via *WNT*, *MAPK* e insulina, e promovem a ativação de *NF-κB* estão desregulados nessas neoplasias em comparação ao tecido normal. Alguns estão diretamente associados ao desenvolvimento patogênico do LM (Yang et al., 2016; Chuang et al., 2019; Zota et al., 2020). Vários miRNAs estão significativamente desregulados no tumor em relação ao MM normal (Figura 4), sendo os mais conhecidos e melhores descritos na literatura membros da família *let-7*, *miR-21*,

miR-29, *miR-93*, *miR-106b* e *miR-200* (Ciavattini et al., 2013; Santamaria et al., 2014; Nothnick, 2016; Yang et al., 2016; Islam et al., 2018; Baranov et al., 2019; Ciebia et al., 2020; Lazzarini et al., 2020).

FONTE: Nothnick, 2016 (modificado).

Figura 4 - miRNAs e seus genes alvos validados em tecido miometrial e no LM. Os miRNAs indicados nas tabelas foram validados em células humanas.

O tratamento padrão é a remoção cirúrgica por meio de histerectomia, miomectomia e embolização da artéria uterina que consiste em um tratamento minimamente invasivo. A escolha cirúrgica depende do tamanho, número e a extensão desses fibróides (Hassan et al., 2011; Bradley et al., 2019; Dos Anjos et al., 2019). Como opção para tratamento não invasivo, a cirurgia de ultrassom focalizada de alta intensidade vem sendo recomendada (Corleta et al., 2007; Dos Anjos et al., 2019). Não existe uma opção ideal de tratamento médico que tenha sido aprovada pela Agência Federal de Medicamentos (do inglês Food and Drug Administration - FDA) para o LM. O tratamento não cirúrgico tem sido ministrado

para o aliviar os sintomas ou retardar o desenvolvimento do tumor (Zeng et al., 2017). As principais terapias são realizadas com agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (do inglês Gonadotropin-Releasing Hormone - GnRH) que suprimem os níveis de estradiol circulantes e progesterona, ou com esteroides sintéticos com ação antiprogesterona e medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (Hassan et al., 2011; Segars et al., 2014; Chuang et al., 2017; Lethaby et al., 2017; Zeng et al., 2017; Xie et al., 2018).

O LM é uma lesão benigna com prognóstico favorável, mas devido a prevalência e consideráveis similaridades aos tumores malignos que também derivam do corpo do útero, as avaliações histopatológicas detalhadas ainda são necessárias para a exclusão e diagnóstico de LMS. Como auxiliares, vários marcadores diagnósticos são utilizados na identificação das lesões neoplásicas, dentre elas o antígeno Ki-67, a proteína p53 e os receptores de esteroides. Esses marcadores são utilizados para avaliar a biologia das lesões miometriais e para o diagnóstico diferencial de tumores com aparência atípica. No entanto, a avaliação histopatológica às vezes permanece inconclusiva, devido à extensa sobreposição histológica e muitas variantes morfológica do LM (Juhasz-Böss et al., 2018; Lintel et al., 2018). Além disso, algumas variações do LM apresentam características singulares do LMS, como atipia citológica grave ou aumento da atividade mitótica (Devereaux et al., 2019), motivando a constante busca por marcadores precisos (Lintel et al., 2018; Rubisz et al., 2019).

Assim, mesmo com todas as alterações genéticas e epigenéticas encontradas até o momento, ainda não foi estabelecido um tratamento com biomarcadores específicos para o LM uterino. Estratégias com marcadores moleculares estão sendo estudadas para fins de diagnóstico, tratamento, e

diferenciação dos demais sarcomas uterinos, sobretudo para diferenciação do LM não convencional de um LMS que não pode ser distinguido clinicamente por nenhuma das técnicas de imagem (Vilos et al., 2015; Williams, 2017; Roberts et al., 2018; Tantitamit et al., 2018; Dvorská et al., 2019; Glorie et al., 2019; Oh et al., 2019; Suzuki et al., 2019).

1.2. Leiomiossarcoma uterino (LMS)

O tumor maligno da musculatura lisa do útero, conhecido como LMS, cresce a partir do miométrio e frequentemente não atinge a superfície da cavidade endometrial (Tantitamit et al., 2018). É extremamente raro e apresenta uma incidência anual baixa, de 0,36 por 100.000 mulheres por ano, com o acometimento a partir dos 40 anos de idade. Representa aproximadamente 70% de todos os sarcomas uterinos (Benson et al., 2017; Seagle et al., 2017; Bogani et al., 2018; Juhasz-Böss et al., 2018; Ray-Coquard et al., 2018; Meng et al., 2020).

Em 2018, foram estimados cerca de 5.058 novos casos com diagnóstico de LMS (Costales et al., 2020). Apesar de ser altamente agressivo e heterogêneo, é o mais comum entre os sarcomas de corpo do útero, representando 1-2% de todas as malignidades uterinas (Mittal et al., 2009; Seagle et al., 2017; Bogani et al., 2018; Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018; Yasutake et al., 2018; Patel et al., 2019).

A origem dos LMSs é incerta, entretanto estudos de clonalidade indicam que a maioria desses tumores surgem *de novo* (Zhang et al., 2006; Mittal et al., 2007; Chen et al., 2008; Banas et al., 2017; Williams, 2017; Oh et al., 2019).

Mesmo sendo um evento extremamente raro, alguns autores defendem a hipótese de que os LMSs se originam a partir da transformação maligna de um LM não convencional pré-existente (Mittal et al., 2009; D'Angelo et al., 2010; Loizzi et al., 2011; Williams, 2017; Devereaux et al., 2019), podendo ocorrer em menos de 5% (Oh et al., 2019). O surgimento de um LMS dentro do LM foi observado em alguns estudos, bem como a presença de áreas similares a LM associados com alguns LMSs uterinos (Mittal et al., 2000, 2007, 2009), entretanto existem controvérsias em relação a essas conjecturas.

Esses tumores estão associados a um pior prognóstico mesmo quando diagnosticados em estágio precoce, ou tumor restrito ao útero, causando uma proporção significativa de mortes por câncer de útero devido ao seu fenótipo agressivo, metástase precoce e altas taxas de recorrência (Bogani et al., 2018; Ray-Coquard et al., 2018; Roberts et al., 2018; Tsuyoshi; Yoshida, 2018; Meng et al., 2020). A taxa de recorrência atinge de 53 - 75%, incluindo os estágios iniciais da doença com recidiva locorregional ou a distância nos primeiros dois anos após o diagnóstico (Hoang et al., 2014; Bogani et al., 2018; Desai et al., 2018; Friedman et al., 2018; Mbatani et al., 2018; Ray-Coquard et al., 2018; Stope et al., 2018; Li et al., 2019; Rizzo et al., 2019). Na maioria das pacientes com doença extrauterina, a recorrência pode ocorrer dentro de 6 a 18 meses a partir do diagnóstico inicial (Hoang et al., 2014).

A sobrevida global é de 2,6 anos e a sobrevivência aos 2, 5 e 10 anos é de aproximadamente 57%, 24% e 12%, respectivamente (Hoang et al., 2014; Bogani et al., 2018; Desai et al., 2018; Ray-Coquard et al., 2018; Stope et al., 2018). Estudos indicam que a sobrevida global em 5 anos pode ser abaixo de 51% em pacientes no estágio I da doença e menor de 25% no estágio II (Abeler

et al., 2009; Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018; Rizzo et al., 2019; Suzuki et al., 2019). Todas as pacientes com doença extra pélvica foram a óbito dentro de 5 anos (Abeler et al., 2009; Mbatani et al., 2018). A taxa de sobrevida relativa em 5 anos de acordo com a extensão da propagação do tumor, foi estimada pelo ACS juntamente com o banco de dados *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) - National Cancer Institute (2019) nos Estados Unidos da América entre os anos de 2009 e 2015. Sendo, 64% a taxa de sobrevida para tumores restritos ao útero (local), 36% para tumores com extensão fora do útero abrangendo estruturas próximas ou linfonodos (regional) e 14% para os tumores com extensão em outras regiões do corpo (distante), como pulmão e fígado (ACS, 2020).

O principal tipo de disseminação é a hematogênica, ocorrendo principalmente para pulmões e fígado. Cerca de 10% das pacientes apresentam metástase pulmonar como sinal inicial da doença (Almeida et al., 2015; Amant et al., 2015; Barlin et al., 2015; Ben-Ami et al., 2017; Elvin et al., 2017; Stope et al., 2018). As definições do estadiamento clínico dos LMS foram revisadas em 2019 pelo ACS (2017) e podem ser visualizadas na Tabela 4.

Os sinais e sintomas dos LMSs são muito semelhantes aos do LM, podendo ocorrer sangramento vaginal (56%), massa pélvica palpável (54%) e / ou dor pélvica em 22% dos casos (D'Angelo et al., 2010; Loizzi et al., 2011; Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018; Oh et al., 2019). Os LMSs são tipicamente volumosos com diâmetro médio de 10 cm, apenas 25% podem medir menos de 5 cm (Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018).

O diagnóstico depende da presença de atípias citológicas e nuclear, hipercelularidade ou alto índice mitótico e necrose coagulativa das células

tumorais (Matsuda et al., 2014; Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018). As principais características histológicas que diferenciam o LMS dos demais tumores uterinos são a presença de células fusiformes, com núcleos facilmente rompíveis, vacuolização perinuclear e citoplasma eosinofílico disposto em fascículos em interseção. A atipia citológica varia de moderada à severa, enquanto a atipia nuclear é severa. Frequentemente há necrose tumoral com índice mitótico variável e muitas vezes com figuras mitóticas atípicas (D'Angelo et al., 2010; Loizzi et al., 2011; Gockley et al., 2014; Benson et al., 2017; Cui et al., 2017; Arend et al., 2018).

Tabela 4 - Estadiamento do leiomiossarcoma uterino – FIGO 2009

Estádio	Características tumorais
I	Tumor limitado ao útero
Ia	Maior diâmetro até 5 cm
Ib	Diâmetro superior a 5 cm
II	Tumor com extensão além do útero, dentro da pelve
Ila	Acometimento anexial
Ilb	Acometimento de outros tecidos pélvicos extrauterinos
III	Tumor invade tecidos abdominais (não saliente no abdômen)
IIla	Um sítio de acometimento
IIlb	Mais de um sítio
IIlc	Metástase pélvica e/ou para-aórtica gânglios linfáticos
IV	
IVa	Invasão de bexiga e/ou reto
IVb	Metástase à distância

FONTE: ACS, 2017; Mbatani et al., 2018; Roberts et al., 2018; SBP, 2021.

Os LMS frequentemente exibem coexpressão positiva para desmina, h-caldesmon, actina de músculo liso e histona desacetilase 8 (HDAC8) (Loizzi et al., 2011; Chiang; et al., 2013; DeLair, 2013; Guled et al., 2014; Benson et al.,

2017; Cui et al, 2017; Lintel et al., 2018; Ptáková et al., 2018; Devereaux et al., 2019). Uma revisão dos painéis utilizados nos tumores mesenquimais uterinos constatou que o h-caldesmon é mais específico para músculo liso, porém menos sensível que a desmina, que também marca em músculo esquelético. Esses dois marcadores tendem a ser positivos em ambos os tumores, benigno e maligno, apresentando menor grau de positividade nos malignos (Lintel et al., 2018). O índice proliferativo (avaliado com o anticorpo contra Ki-67), as proteínas dos genes supressores de tumores p16 e p53 e várias isoformas do receptor de hialuronato CD44 vem sendo utilizados para diferenciar LMS de LM convencional ou celular (Koivisto-Korander et al., 2011; Dos Anjos et al., 2019). Outras proteínas como PDGFRA, WT1, GNRHR, BCL2, ESR, PGR e LAMP2, também foram avaliadas para a tentativa de distinção entre o LMS e o LM (Dos Anjos et al., 2019).

Seu desenvolvimento, aparentemente, é independente da condição hormonal ou do uso de contraceptivos hormonais orais (Kobayashi et al., 2013), muito embora os receptores de progesterona e estrogênio sejam expressos em até 80% e 87% dos casos, respectivamente (Chiang et al., 2013; Kobayashi et al., 2013; Ducie et al., 2016; Baek et al., 2018; Friedman et al., 2018; Slomovitz et al., 2019). A ação estrogênica pode levar à proliferação celular e crescimento tumoral, devido a sua capacidade de atuar como um fator de crescimento (Slomovitz et al., 2019). Pequenos estudos que utilizaram bloqueio hormonal foram realizados em pacientes com LMS uterino e mostraram uma maior sobrevida livre de progressão, especialmente em pacientes que apresentaram forte expressão de ambos receptores (Costales et al., 2020).

A excisão cirúrgica é a base do tratamento para esse tipo de tumor e a quimioterapia adjuvante é frequentemente recomendada para todos os estágios da doença. Geralmente a histerectomia total e a salpingo-ooforectomia bilateral são os padrões utilizados para as cirurgias de LMS em estágio inicial (Amant et al., 2015; Ducie et al., 2016; Benson et al., 2017; Cui et al., 2017; Roberts et al., 2018; Li et al., 2019; Patel et al., 2019). Contudo, mesmo após a cirurgia radical cerca de 50% das pacientes apresentam recidivas intraperitoneais e / ou a distância (Cuppens et al., 2018).

As terapias adjuvantes como quimioterapia e radioterapia, são frequentemente usadas para reduzir a recorrência, mas sua eficácia é incerta nos LMSs, por apresentar resistência a terapias padrão especialmente na fase inicial da doença (Kim et al., 2009; Barlin et al., 2015; Roberts et al., 2018; Stope et al., 2018). Todavia, alguns estudos indicam que o uso da terapia adjuvante não oferece vantagem significativa na sobrevida da paciente (Ricci et al., 2013; Barlin et al., 2015; Friedman et al., 2018; Cordoba et al., 2019; De Almeida et al., 2019; Slomovitz et al., 2019). Não há tratamento efetivo do LMS avançado ou recorrente. Além disso, a dissecação linfonodal é controversa, por ser pouco frequente. Mulheres com linfonodos positivos apresentam redução na sobrevida câncer específica (SCE) (Seagle et al., 2017).

Esses tumores miometriais exibem uma gama de peculiaridades moleculares, onde constam cariótipos com alterações complexas e inespecíficas, como variações de nucleotídeo único, pequenas inserções e deleções, amplificações e fusões de genes (D'Angelo et al., 2009; Mas et al., 2019). Mais especificamente, os LMS podem também apresentar a perda da heterozigosidade e a alteração da expressão de genes, cujos produtos são

considerados relevantes para explicar o desenvolvimento e progressão da doença (Chuang et al., 2015). Perdas cromossômicas são mais frequentes que ganhos cromossômicos, principalmente associados aos genes *MYC* e ao *miRNA-221* (Mittal et al., 2009).

Essas instabilidades podem refletir em uma grande variação de mudanças de padrões no DNA, sugerindo que as propriedades de crescimento necessárias para desenvolver o fenótipo maligno nesses tumores, podem ser um conjunto variado de alterações genéticas (Mittal et al., 2009). O LMS é um tumor característico da ativação excessiva das vias de sinalização da proliferação celular e perda de fragmentos cromossômicos que contêm genes supressores de tumor (Deng et al., 2019). Com toda essa pluralidade genética, recentemente, dois subtipos moleculares foram definidos com base nas diferenças na assinatura da expressão gênica, sendo o subtipo I (baixo grau) que apresenta padrões de expressão similar a células normais de músculo liso com maior expressão dos genes *LMOD1*, *SLMAP*, *MYLK* e *MYH11*; e o subtipo II (alto grau) categorizado pela maior expressão de genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (do inglês *epithelial–mesenchymal transition* – *EMT*) e tumorigenese, como *CDK6*, *MAPK13* e *HOXA1* (Dos Anjos et al., 2019). Do ponto de vista clínico, o LMS de baixo grau é raro e teroricamente se distingue do LMS de alto grau por apresentar um comportamento clínico relativamente favorável (Zivanovic et al., 2009). Atualmente, não existe um sistema de classificação uniforme para LMS e o sistema de estadiamento FIGO (2009) não inclui a graduação histológica (Zivanovic et al., 2009; George et al., 2018). Alguns patologistas não consideram o LMS de baixo grau um LMS verdadeiro, mas sim

um LM atípico, outros ainda utilizam o sistema de classificação estabelecido para os LMSs extra-uterinos (Zivanovic et al., 2009).

Genes importantes são frequentemente mutados no LMS, como *ATRX*, *PTEN*, *VIPR2*, *YWHAE*, *TP53*, *MDM2*, *RB1*, *PTEN* e *DCC* (Yang et al., 2015; Arend et al., 2018; Roberts et al., 2018; Dos Anjos et al., 2019; Mas et al., 2019). Entretanto, algumas dessas moléculas não são específicas para neoplasias do músculo liso, e os mecanismos moleculares subjacentes à tumorigenese permanecem desconhecidos (Mas et al., 2019). O *TP53*, *MIB*, *ESR* e *PGR* podem auxiliar na diferenciação dos LMS dos demais sarcomas uterinos e LM (Benson et al., 2017). Além disso, pacientes que apresentam mutações germinativas nas fumarato hidratases podem ter um risco maior de desenvolvimento do LMS (D'Angelo et al., 2009; Schunemann et al., 2012). Algumas alterações também foram encontradas no gene *MED12*, que vêm sendo intensamente estudadas nos LMSs. As mutações nesse gene ocorrem em 70% dos LMS (Pérot et al., 2012; Brany et al., 2015) e parecem ser específicas de tumores de musculatura lisa do útero (Chiang et al., 2013). Desta maneira, considera-se que esse gene é um possível biomarcador de diagnóstico tumoral com um prognóstico favorável (Tsuyoshi et al., 2018; Dos Anjos et al., 2019).

Dentre todas as alterações moleculares encontradas até o momento, sabe-se que além dos fatores genéticos, os processos epigenéticos também podem influenciar fortemente a mudança de fenótipo, mediado pela expressão gênica desregulada (Laganà et al., 2017; Lu et al., 2020). Esses fatores são considerados os principais mecanismos de regulação durante a progressão tumoral e a tumorigenese, e são caracterizados pela reversibilidade e suscetibilidade a fatores externos (Laganà et al., 2017; De Almeida et al., 2019;

Lu et al., 2020a). Os três principais processos dessa maquinaria epigenética que atuam na modelação da expressão gênica dos tumores são metilação do DNA, modificações nas histonas e os miRNAs (pequenos RNAs não codificantes), como mencionado previamente (Navarro et al., 2014; Laganà et al., 2017; Lu et al., 2020a).

Mudanças no padrão de metilação do DNA e alterações complexas na estrutura da cromatina contribuem para o desenvolvimento tumoral, estimulando a proliferação e metástase (Dos Anjos et al., 2019). A acetilação e metilação das caudas de histonas podem determinar a ativação ou a repressão da transcrição de um gene. Já os miRNAs, desempenham um papel central no processo de regulação transcricional e não transcricional nas moléculas de RNA mensageiro (mRNA) (Laganà et al., 2017; De Almeida et al., 2019). Atuam ainda em vários processos biológicos, e quando alterados podem levar a transformação celular e consequentemente à tumorigenese (Figura 5) (De Almeida et al., 2017). Assim como o LM, o LMS apresenta alterações epigenéticas que estão fortemente associadas ao seu desenvolvimento.

Diversos trabalhos demonstram que a expressão de miRNAs está associada com uma ampla variedade de doenças, envolvendo inflamação, fibrose tecidual, tumorigênese e metástase. Dessa forma, tornaram-se biomarcadores de cânceres múltiplos, considerando que seus níveis de expressão anormais podem indicar o estágio da patologia e prognóstico (Schickel et al., 2008; Chuang et al., 2015; Sandiford et al., 2018; Lu et al., 2020a). Esses pequenos e não codificantes RNAs têm um papel crucial no processo de diferenciação do músculo liso. Sua expressão e processamento são necessários para outros processos de diferenciação de linhagens

mesenquimais, incluindo osteócitos, adipócitos, músculo esquelético e músculo cardíaco (Danielson et al. 2010).

FONTE: Yang et al., 2016 (modificado).

Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos epigenéticos envolvidos na origem dos LM e LMS. Metilação do DNA, modificação de histonas e miRNAs que exercem papéis cruciais na modulação do padrão da expressão gênica na patogênese dos tumores uterinos.

No corpo uterino, foram identificados uma ampla gama de miRNAs com expressão alterada tanto nos LM quanto nos LMS (Figura 6). Porém, maior número e frequência de alteração dessa expressão foram observadas nos LMS (Torres et al., 2011; Kowalewska et al., 2013; De Almeida et al., 2017, 2019; Abeshouse et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018).

A biogênese, estrutura e funções dessas pequenas moléculas não codificantes, bem como sua atividade regulatória sobre genes alvos específicos serão abordados a seguir.

FONTE: De Almeida et al., 2017 (modificado).

Figura 6 - Perfil de expressão dos miRNAs em amostras de pacientes e linhagens celulares de LM e LMS.

1.3. MicroRNAs (miRNAs)

Os miRNAs foram descritos, inicialmente, em *Caenorhabditis elegans* em 1993. Essas pequenas moléculas são reconhecidas por desempenharem importantes papéis multifacetados no controle das funções celulares, como diferenciação, proliferação, apoptose, invasão, migração, inflamação, resistência a drogas e angiogênese (Figura 7) (MacFarlane et al., 2010; Christopher et al., 2016; Guan et al., 2016; Rupaimoole et al., 2016, 2017; Tan et al., 2018; Ciebiara et al., 2020; Lazzarini et al., 2020). Acredita-se que os miRNAs correspondem de 1-5% do genoma humano (MacFarlane et al., 2010), regulando significativamente a expressão gênica de mais de 60% dos genes codificadores de proteínas (Daugaard et al., 2017; Ankasha et al., 2018; Tan et al., 2018; Lazzarini et al., 2020; Lu et al., 2020a).

Os genes de miRNAs em humanos estão localizados em contextos genômicos variados que incluem regiões de RNA não-codificante intergênicas e intragênicas. Algumas vezes podem ser encontrados dentro de exons dos transcritos e em transcritos anti-senso (MacFarlane et al., 2010; Rupaimoole et al., 2016, 2017).

FONTE: Kadri et al., 2009; Farrell, 2017 (modificado).

Figura 7 - Estrutura molecular de um miRNA. A) Identificação das regiões do *miR-18a-5p*, comumente encontrada nos demais miRNAs. B) O miRNA precursor possui quatro regiões: *loop* em azul escuro, constituído por uma protuberância sem pareamento, possui apenas um substrato que produz inserções e deleções chamadas de *indels*. Extensão em laranja, é uma região de comprimento variável entre o miRNA duplex e o *loop*. miRNA em vermelho escuro, representa o duplex sem protuberância 3'. Pri-extensão em azul claro, é a porção final do *hairpin*. Estes três últimos podem produzir incompatibilidade e *indels*. M: região de combinação; N: Incompatibilidade; I: Inserção ou deleção.

As unidades transcricionais do miRNA e sua regulação variam com os *loci* gênicos. Os miRNAs intrônicos estão localizados dentro de um gene hospedeiro, na mesma orientação, e são transcritos juntamente com o transcrito primário pelo mesmo promotor. Por outro lado, os miRNAs intergênicos presumivelmente dependem de seus próprios promotores, porém a natureza das unidades de transcrição desses miRNAs ainda não foi totalmente elucidada (MacFarlane et

al., 2010). Mais de 50% dos genes de miRNAs estão localizados próximos as ilhas de CpG, que são suscetíveis a outras modificações epigenéticas (Lu et al., 2020a). Assim, estima-se que aproximadamente 10% da expressão dos miRNAs seja controlada por meio da metilação de DNA (MacFarlane et al., 2010). As interações entre diferentes mecanismos epigenéticos podem alterar sinergicamente ou antagonisticamente a expressão genética (Lu et al., 2020a).

Os miRNAs representam menos de 0.02% do RNA total das células e desempenham o importante papel de reguladores pós-transcricionais (Daugaard et al., 2017; De Almeida et al., 2019). A estabilidade da expressão gênica é regulada em vários níveis e um dos responsáveis por essa regulação é o grupo dessas pequenas moléculas. Embora sejam considerados reguladores negativos de expressão, podem também agir na indução da tradução (Ankasha et al., 2018).

A biogênese pela via canônica de um miRNA maduro é um processo criteriosamente regulado. Inicia-se com a transcrição dos genes de miRNA, a partir das regiões intergênicas ou intragênicas de transcritos de RNA não codificadores, sendo mediado pela RNA polimerase II ou III. A essa molécula primária, denomina-se pri-miRNA, que é composta por 70 - 90 nucleotídeos (nt). O pri-miRNA longo é clivado no núcleo pelo complexo enzimático Drosha–DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome Critical Region 8 protein* – DGCR8) para formar o miRNA precursor (pre-miRNAs) de aproximadamente 60 nt de comprimento. Os pre-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma através da ação da *Exportin-5–Ran-GTP* (Xpo5). No citoplasma, a ribonuclease Dicer associa-se com outras proteínas, como a proteína de ligação ao RNA TAR (do inglês *TAR RNA binding protein* – TRBP) e a proteína ativadora de quinase

R (do inglês *kinase R-activating protein* - PACT) para aumentar sua estabilidade e atividade de processamento. Assim, forma-se o complexo que cliva o *loop* do pré-miRNA *hairpin* deixando-o na forma “madura”, com aproximadamente 17 - 24 nt de comprimento. A fita funcional do miRNA maduro é carregada juntamente com as proteínas Argonauta 2 (Ago2) para serem incorporados ao complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que irá direcionar todo o complexo para a ligação com o transcrito alvo, principalmente na região 3' UTR (região não traduzida). Uma pequena sequência *seed* (semente) na região 5' do miRNA (posição 2 - 8) permite que um único miRNA se ligue a centenas de mRNAs alvo. Destarte, realizando o silenciamento dos mRNAs alvo por meio da repressão translacional, clivagem do mRNA ou deadenilação (Figura 8) (Winter et al., 2009; Chegini, 2010; Berezikov, 2011; Barca-Mayo et al., 2012; Romero-Cordoba et al., 2014; Christopher et al., 2016; Rupaimoole et al., 2016, 2017; Ma et al., 2018; Chuang et al., 2019).

A quebra do mRNA alvo ou sua repressão translacional levam à uma menor expressão gênica do transcrito. Existe, porém, uma significativa diferença entre os efeitos desses dois processos que é a reversibilidade. O processo de diminuição do mRNA através da clivagem é irreversível, enquanto a repressão translacional é reversível, devido a estabilidade do mRNA, que volta a ser traduzido após a eliminação da inibição da tradução (MacFarlane et al., 2010; Romero-Cordoba et al., 2014).

FONTE: Daugaard et al., 2017 (modificado).

Figura 8 - Via canônica da biogênese dos miRNAs. Esquema ilustrando a ação das enzimas Drosha, Expo-5, Dicer e Ago2 durante o processo de maturação do miRNA.

O destino do mRNA alvo é determinado pela extensão do emparelhamento de bases com o miRNA que o direcionará à destruição, se a complementariedade for perfeita, bloqueando a expressão do transcrito. Entretanto, quando a complementariedade não é perfeita o miRNA pode conduzir a uma diminuição dos níveis de expressão do mRNA através dos mecanismos de repressão (Pillai, 2005; Romero-Cordoba et al., 2014)

Essas pequenas moléculas podem ser produzidas ainda por três vias não canônicas. Na primeira, denominada de biogênese dependente das enzimas Drosha - DGCR8 e independente da enzima Dicer, é similar à biogênese convencional. O miRNA passa pelo processamento das enzimas Drosha -

DGCR8, resultando na estrutura de pre-miRNA *hairpin* com aproximadamente 17 pares de bases (pb), que é incompatível com a Dicer. Dessa maneira, o processo de maturação é concluído quando o pré-miRNA é diretamente carregado para Ago2, que atua como um cortador catalítico clivando a fita 3' e produzindo um intermediário de 30 nt. A fita 5' de 30 nt sofre um corte na região 3' por uma enzima ribonuclease poli(A) específica, produzindo o miRNA maduro de 23 nt (Figura 9A) (Daugaard et al., 2017).

A segunda via de biogênese não canônica, denominada biogênese independente das enzimas Drosha - DGCR8 e dependente da enzima Dicer, foi a primeira a ser descoberta. Os mirtrons são derivados de *splicing* de introns com potencial *hairpin*. A etapa inicial do processamento dos mirtrons é feita pelo *spliceosome* (grande complexo de RNA-proteína que catalisa a remoção de introns do pré-miRNA nuclear) e pela enzima *lariat debranching* (responsável pela quebra de glicogênio) que dão origem a estrutura clássica de pre-miRNA com estrutura *hairpin*. O pre-miRNA *hairpin* entra na via canônica quando é exportado para o citoplasma pela Xpo5 e o processo de maturação se completa na enzima Dicer (Figura 9B) (Barca-Mayo et al., 2012; Daugaard et al., 2017). Os mirtrons podem ser subdivididos em quatro categorias dependendo da natureza de suas saliências. Os pequenos RNAs conhecidos como RNAs endógenos curtos de interferência (Endo-siRNA), RNAs pequenos nucleolar (snoRNA), RNAs endógenos *hairpin* (Enso-shRNA) e 3' pre-tRNAs (terminal 3' precursor e RNA transportador) se ligam diretamente à enzima Dicer para que ocorra o corte de suas moléculas, e em seguida são carregados para a Ago1-4 para a maturação final (Figura 9B) (Daugaard et al., 2017).

FONTE: Daugaard et al., 2017 (modificado).

Figura 9 - Vias não canônicas da biogênese dos miRNAs. A) Biogênese dependente das enzimas Drosha / DGCR8 e independente da enzima Dicer. B) Biogênese dependente da enzima Dicer e independente das enzimas Drosha / DGCR8. Várias moléculas de pequenos RNAs tornam-se maduras pela via de maturação do miRNA independente da atuação do complexo enzimático Drosha / DGCR8, porém são dependentes da enzima Dicer para o seu processamento. Neste grupo estão os mirtrons, que são pequenos *hairpins* intrônicos liberados por eventos de *splicing* tradicional. C) Biogênese independente de Drosha / DGCR8 e Dicer, recentemente descoberto nos agotrons.

O terceiro processo da biogênese é conhecido como independente das enzimas Drosha - DGCR8 e independente da enzima Dicer, ocorre principalmente com os agotrons. Recentemente descobertos, os agotrons são uma classe de miRNAs que se associam com as proteínas Ago (Figura 9C). Assim como os mirtrons, eles se originam a partir de pequenos introns que não passam pelo processamento Drosha - DGCR8 e após o *splicing*, são exportados

para o citoplasma por um mecanismo ainda desconhecido. Uma vez no citoplasma, também escapam da ação da Dicer e são carregados para a Ago como um íntron completo (Barca-Mayo et al., 2012; Daugaard et al., 2017).

Genes codificantes de miRNAs têm sido localizados em sítios cromossômicos frágeis e em várias regiões com anormalidades citogenéticas (Chuang et al., 2015). Mais de 50% desses genes estão em regiões genômicas associadas ao câncer e formam pontos nodais centrais nas vias de desenvolvimento tumoral, salientando o seu papel na patogênese do câncer (Tan et al., 2018). A expressão alterada dessas moléculas está correlacionada com a estabilidade de oncogenes envolvidos em diversas transformações celulares (Chuang et al., 2015).

miRNAs são frequentemente alterados em doenças devido à eventos genômicos, tais como mutações, amplificação das deleções ou alterações transcricionais. Ainda podem ocorrer alguns defeitos em sua biogênese devido a mutações, ou menor expressão, de enzimas que modulam o seu processamento. Algumas alterações autônomas do gene da célula cancerígena, além do microambiente tumoral influem diretamente nos níveis de expressão dos miRNAs (Rupaimoole et al., 2016). Embora o perfil de expressão seja diferente entre cânceres resistentes e sensíveis, estressores ambientais podem influenciar a expressão dos miRNAs em qualquer tipo de tumor (He et al., 2016). Essas modificações geralmente ocorrem como resultado dos defeitos da biogênese sob influência da hipóxia ou mudanças transcricionais do miRNA. Apesar dos defeitos da biogênese e a menor expressão global, muitos miRNAs oncogênicos estão significativamente aumentados em cânceres (Rupaimoole et al., 2016).

Por estarem envolvidos em uma variedade de processos biológicos e patológicos, como a regulação da carcinogênese no qual realizam o papel de supressores tumorais ou oncogenes, também podem ser chamados de *oncomirs* (Figura 10). A expressão em diferentes tipos de tumores aponta para os miRNAs como potenciais marcadores para diagnóstico, prognóstico e preditores de tratamento (Farazi et al., 2013; Kowalewska et al., 2013; Svoronos et al., 2016; Ankasha et al., 2018).

Alguns miRNAs desempenham papéis duplos em um mesmo tipo de câncer. A família *miR-181*, que é composta por quatro membros (*miR-181a*, *miR-181b*, *miR-181c* e *miR-181d*) exibe expressão inconsistente em muitos cânceres sólidos, indicando que eles podem exercer funções como *oncomirs* ou supressores tumorais (Xia et al., 2014; Lu et al., 2020a). Os membros dessa família de miRNAs estão localizados em diferentes grupos de cromossomos e sujeitos a diferentes alterações moleculares, sugerindo que a biogênese do miRNA pode ser modificada por outras transformações epigenéticas (Lu et al., 2020a).

Esses miRNAs atuam em importantes aspectos como crescimento, desenvolvimento e ativação celular. Apesar de possuírem a mesma sequência *seed*, os genes alvos são distintos para cada miRNA. Evidências apontam a relevância desses miRNAs na inflamação vascular, no qual controlam vias de sinalização críticas e alvos relevantes para a ativação de células endoteliais e a homeostase imune (Esquela-Kerscher et al., 2006; Sun et al. 2014; Sandiford et al., 2018). Foi demonstrado, *in vitro*, que células mesenquimais que se diferenciam em células musculares lisas, alteram os padrões de expressão do *miR-181a / miR-181c* (Jonigk et al., 2013).

FONTE: Esquela-Kerscher et al., 2006 (modificado).

Figura 10 - miRNAs podem funcionar como supressores de tumores e / ou oncogenes. A) A redução ou deleção de um miRNA que funciona como supressor de tumor leva a formação tumoral. Uma redução ou eliminação dos níveis de miRNAs maduros pode ocorrer devido a defeitos em qualquer estágio da biogênese (indicado por pontos de interrogação) levando a expressão inadequada da oncoproteína alvo (quadrados roxos). O resultado geral pode envolver o aumento da proliferação, invasividade ou angiogênese, diminuição dos níveis de apoptose ou indiferenciação tecidual ou desdiferenciação iniciando a formação tumoral. B) A amplificação ou supressão de um miRNA que tem um papel oncogênico também resulta na formação tumoral. Nessa condição, o aumento na quantidade de miRNA, que pode ser produzido em tempos ou em tecidos inadequados, eliminaria a expressão de um gene supressor de tumor alvo do miRNA (rosa) e conduziria a progressão tumoral. O aumento nos níveis de miRNA maduro pode ocorrer devido a amplificação do gene miRNA ou à ativação constitucional do promotor, aumentando a eficiência no processamento do miRNA ou aumentando sua estabilidade (indicado por pontos de interrogação). mRNA: RNA mensageiro; ORF: *Open Reading frame* (fase de leitura aberta).

Mais especificamente, o *miR-181b-5p* localizado no cromossomo 1q32.1, é caracterizado como pró-inflamatório e por isso, é denominado como inflama-miR (Sandiford et al., 2018). Têm sido amplamente estudado em diversos tipos de cânceres como leucemia linfocítica crônica, leucemia mielogênica aguda, colorretal, linfoma de Burkitt e ovário (Berindan-Neagoe et al., 2014; Xia et al., 2014; Li et al., 2017; Gu et al., 2018; Markopoulos et al., 2018; Sandiford et al., 2018). Há evidências de uma correlação inversa entre a proteína NOVA1 e a baixa expressão do *miR-181b-5p*, que está associado à um pior prognóstico em câncer neuroepitelial. Neste tipo de tumor, sua a expressão reduzida é relacionada com pior resultado de sobrevida, demonstrando seu papel como supressor tumoral durante o desenvolvimento e progressão câncer. Por outro lado, esse miRNA pode apresentar propriedades oncogênicas e níveis elevados de expressão em cânceres de mama, cervical, ovário e próstata (Xia et al., 2014).

O aumento da expressão do *miR-181d*, localizado no cromossomo 19p13.12, promove a maturação de células dendríticas (CDs), eleva a expressão de CD80 e CD83. Essa molécula é importante para a maturação dos CDs, pois regula a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL12 e TNF- α da via NF- κ B (Su et al., 2017). Adicionalmente, sua maior expressão foi associada à melhora da sobrevida global em glioblastoma e inibe a proliferação de células cancerosas pancreáticas (Huang et al., 2018). Em LMS uterino, os membros dessa família, apresentaram de modo geral, diminuição na expressão em relação ao MM, com excessão do *miR-181d-5p* que teve uma expressão elevada (Dos Anjos et al., 2018).

A família de supressores tumorais *miR-34*, composta pelo *miR-34a*, *miR-34b* e *miR-34c* também pode exibir funções opostas em cânceres, uma vez que

se encontra alterada em diversos tipos de tumores (Li et al., 2014; Rupaimoole; Slack, 2017; LU et al., 2020a). Essa família de miRNAs são componentes importantes da rede supressora de tumor do p53. Após a ativação de *TP53* no cenário de estresse genotóxico ou de hiperatividade do oncogene, o gene interage diretamente com as unidades de transcrição do *miR-34a* e *miR-34b / miR-34c*, que são capazes de mediar alguns aspectos da resposta celular da ativação de p53, incluindo a parada do ciclo celular e apoptose (Mendell et al., 2013; Tan et al., 2018; Welponer et al., 2020).

Outrossim, foi observado que a perda de expressão dos membros da família *miR-34*, reduziu a resposta à danos no DNA, dependentes de p53 e MAPK e levou à oncogênese. A perda de expressão foi associada com a metástase e recorrência em câncer de próstata. Enquanto que, em câncer de pâncreas, a indução da expressão do *miR-34* está associada ao crescimento, invasão, além disso à apoptose e ativação da resposta celular à quimioterapia e radioterapia (Tan et al., 2018).

O *miR-34a-5p*, localizado no cromossomo 1p36.22, é descrito em diversos tipos de cânceres como o colorretal metastático, de pulmão, mama, endométrio, ovário e tumores sólidos (Li et al., 2014; Schirmer et al., 2014; Gao et al., 2015; Rupaimoole et al., 2017; Jia et al., 2019; Welponer et al., 2020). A inativação desse miRNA ocorre por metilação das ilhas CpG em sua região promotora (Rupaimoole et al., 2017; Tao et al., 2018). Esse miRNA desempenha um papel relevante na apoptose mediada por p53 quando ocorrem danos no DNA, mediante a ativação do seu alvo direto, a proteína anti-apoptótica Sirtuin 1 (SIRT1) (Rupaimoole et al., 2017; Wang; et al., 2018b).

Estudos sugerem a associação do *miR-34a-5p* com importantes vias metabólicas, onde atua na regulação de genes relevantes, promovendo ou suprimindo sua expressão e contribuindo para a transformação celular (Ng et al., 2014). O seu papel como supressor tumoral é evidenciado pela rede de interações com mRNAs alvo, que afeta a expressão de proteínas do ciclo celular (CDK4 e CDK6), proliferação (MYC) proteínas anti-apoptóticas (BCL2), proteínas relacionadas a metástase e muitas outras (MET, NOTCH, WNT e AXL) (Li et al., 2014; Rupaimoole et al., 2017; Wang; et al., 2018b; ZHANG et al., 2020).

Recentemente, o MRX34, um ativador de expressão lipossômico do *miR-34a* entrou em fase de teste clínico I em pacientes com tumores sólidos avançados e neoplasias hematológicas (Berindan-Neagoe et al., 2014; Li et al., 2014; Rupaimoole et al., 2017; Tao et al., 2018; Lu et al., 2020a). Acredita-se que *miR-34 Mimic* (ativador de expressão) pode ser uma opção terapêutica promissora, para restauração da regulação normal de uma variedade de genes envolvidos na morte celular e na sobrevivência das células tumorais (Li et al., 2014). O uso desse indutor de expressão foi recentemente avaliado em linhagens celulares de LMS uterino, e observou-se por meio da manipulação genética de *miR-34a*, que o nível de expressão desse miRNA está negativamente correlacionado com o nível de expressão do oncogene *MELK* (Zhang et al., 2020).

Outro miRNA que pode exercer função ambígua a depender do tipo tecidual é o *miR-10b*. Essa molécula pode atuar como supressor tumoral em câncer do colo do útero (Yu et al., 2018). Por outro lado, em doenças malignas gastrointestinais, (incluindo cancer gástrico, hepatocelular e pancreático) e

células de glioblastoma exerce o papel de oncogene e promotor de metástase (Guessous et al., 2013; Zhu et al., 2016; Sheedy et al., 2018).

A expressão aumentada de *miR-10b* foi observada em tumores de mama metastático, promovendo a migração e invasão de células tumorais (Heymann et al., 2010, 2015). A ativação do fator de transcrição *TWIST1* pode elevar a sua expressão e consequentemente, aumentar o tamanho e potencial de invasividade tumoral (Vimalraj et al., 2013). Ademais, a expressão desse miRNA mostrou associação com expressão de biomarcadores já conhecidos para o câncer de mama. Estudos mostraram que independentemente da condição metastática, a expressão do *miR-10b* apresenta correlação positiva com a expressão de HER2 e negativa com a positividade dos receptores de estrogênio e progesterona (Sheedy et al., 2018).

Paradoxialmente, a menor expressão de *miR-10b* foi identificada também em tumores de mama primários independente da recidiva, comparado com tecido normal (Biagioni et al., 2013; Heymann, 2015). Porém, 50% das pacientes com metástase apresentaram níveis elevados de *miR-10b* no tumor primário quando comparadas às pacientes sem metástase, demonstrando que esse miRNA pode ser altamente expresso em células de câncer de mama metastático (Heymann, 2015).

Em adenocarcinoma endometrial foi observada a correlação entre a menor expressão de *miR-10b* com invasão vascular e diminuição da sobrevida (Hawkins et al., 2011). Recentemente avaliado em sarcomas, o *miR-10b* apresentou expressão diminuída em sarcoma de estroma endometrial, adenossarcoma, carcinosarcoma e LMS (Dos Anjos et al., 2018).

Situado no cromossomo 2q31.1, o *miR-10b* geralmente encontra-se desregulado em alguns tipos de cânceres e está associado com múltiplos desfechos, incluindo metástase, aumento de potencial invasivo, angiogenese e aumento da proliferação (Sheedy et al., 2018). A associação entre a expressão alterada de *miR-10b* e o risco de surgimento do câncer foi avaliada por Lu et al. (2014), que verificaram que este miRNA é um valioso fator de diagnóstico para câncer. Foi constatada a participação dessa molécula na carcinogênese e na progressão do câncer em diferentes tipos de vias, sendo um promissor biomarcador para prognóstico (Huang et al., 2017).

A família *lethal-7*, mais conhecida como *let-7*, possui um papel bem definido na literatura como supressor tumoral em vários tipos de cânceres (Li et al., 2014; Tan et al., 2018). É composta por dez isoformas *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7i*, *miR-98*, e *miR-202*, todos os membros contêm sequências *seed* idênticas e regiões variáveis de *stem-loop* (Wang et al., 2012; Cinkornpumin et al., 2017; De Almeida et al., 2019). A expressão dos membros dessa família pode ser controlada por mecanismos de regulação direta do pre-*let-7*, pela proteína de ligação do miRNA LIN-28 ou por metilação da região promotora do gene, mediada pela metiltransferase (Rupaimoole et al., 2017). A ligação da proteína LIN-28 com o pri-miR de *let-7* pode suprimir o mecanismo de *splicing* das enzimas Drosha e Dicer, duas importantes enzimas de restrição envolvidas no processamento de todos os miRNAs (Wang et al., 2018a).

miRNAs como os da família *let-7* têm demonstrado recorrentes deleções no *loci* que os codificam (Appasani, 2007; Broderick et al., 2011; Rupaimoole et al., 2017). Sua expressão é frequentemente reduzida em muitos tumores e frequentemente associada com pior sobrevida (Tan et al., 2018).

Existe uma correlação entre a expressão reduzida e pior diagnóstico em câncer de pulmão, fundamentada pela observação de que a expressão ectópica de *let-7* pode inibir o crescimento celular (Appasani, 2007). A perda da expressão em células cancerosas resulta na progressão acelerada do tumor devido a perturbações nas redes de sinalizações envolvendo a família de proteínas RAS (Li et al., 2014; Rupaimoole et al., 2017; Tan et al., 2018). Essa diminuição da expressão do *let-7* pode levar também ao aumento da expressão do gene *HMG2* (do inglês *high-mobility group AT-hook protein 2*), que melhora o crescimento celular e a transformação tumoral (Li et al., 2014). Contrariamente, ainda no que diz respeito ao câncer de pulmão, o aumento da expressão do *let-7* parece inibir o crescimento das células cancerígenas (Tan et al., 2018), exibindo um efeito dúbio em um mesmo tipo tumoral.

Notadamente, a maior expressão de *let-7f* (localizado no cromossomo 9q22.32) pode inibir a invasão e migração de células do câncer gástrico, através da regulação direta do gene associado a metástase tumoral *MYH9* (Liang et al., 2011). Sua maior expressão reduz a migração de células endometriais e diminui a produção de estrogênio pelo bloqueio da aromatase nas pacientes com endometriose (Cho et al., 2016).

A maioria ou quase todos os membros da família *let-7* são regulados negativamente em muitos tipos de cânceres. Esse tipo de regulação já foi descrito em sarcomas uterinos por Kowalewska et al. (2013). A avaliação dos níveis de expressão desses miRNAs em diferentes tipos de sarcomas uterinos, mostrou uma expressão reduzida de *let-7f* e *let-7e* em sarcoma de estroma endometrial. Além do mais, a menor expressão dos *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7g* e *let-7i* também foi verificada em tumores mesenquimais mistos. Essa

diminuição dos níveis de expressão de membros da família *let-7* sustenta a idéia de que eles podem funcionar como supressores tumorais nos sarcomas uterinos, influenciando na sobrevida das pacientes (Kowalewska et al. 2013). A perda da função regulatória em genes alvo específicos da família também parecem estar associados com a progressão e patologia dos LMS (Chuang et al. 2015). Outros estudos observaram uma menor expressão dos membros dessa família em sarcomas uterinos (Dos Anjos et al., 2018; De Almeida et al., 2019). Dentre eles, o *let-7f* apresentou uma expressão significativamente menor associada com a sobrevida global e sobrevida cancer específica em sarcoma de estroma endometrial (Dos Anjos et al., 2018).

Atualmente, devido a relevância desses miRNAs nos mecanismos de regulação biológica de diferentes cânceres, a *Mirna Therapeutics* está desenvolvendo a tecnologia para a utilização do *let-7* como uma potencial molécula terapêutica (Li et al., 2014).

De modo geral, existem poucos tratamentos eficazes para pacientes diagnosticadas com LMS irresssecável e metastático. Ensaios funcionais e clínicos que investigam a eficácia de outros alvos e agentes citotóxicos, que exploram vias de sinalização oncogênicas específicas desreguladas nos LMS, são de extrema relevância (Ducie et al., 2016). Ressalta-se assim, a importância da identificação da participação dos miRNAs descritos previamente no processo de iniciação e progressão do LM e LMS uterinos. Sabe-se que eles regulam diferentes mRNAs alvos, acarretando em níveis de expressão alterados de genes essenciais e que, possivelmente, estão localizados em regiões críticas do genoma.

1.4. Justificativa

Considerando o exposto anteriormente, os miRNAs artificialmente projetados (silenciadores e expressores) representam uma nova estratégia promissora para o tratamento do câncer, oferecendo maior segurança e menor toxicidade. Com isso, salienta-se a importância da validação funcional dos achados de expressão dos miRNAs, visando sua futura aplicação diagnóstica e terapêutica. A manipulação *in vitro* desses miRNAs, e de seus genes alvo, possibilitará a avaliação dos mecanismos de controle da expressão gênica, apresentando efeitos altamente específicos e com rápida modificação genética e epigenética. Por apresentar alta taxa de eficiência, a manipulação molecular dos miRNAs permite corrigir alterações que influenciam diretamente na carcinogênese, bem como no desenvolvimento e recorrência tumoral, pela reprogramação funcional das células. Ademais, a manipulação dessas moléculas em cultura de células pode levar ao desenvolvimento de terapias alvo-específicas e monitoramento da disseminação do tumor.

O perfil de expressão diferencial de miRNAs em amostras de LMS, LM e MM foi avaliado por nosso grupo, em quatro estudos de *screening* (De Almeida et al., 2017, 2019; Dos Anjos et al., 2018; Schiavon et al., 2019). Esses trabalhos mostraram que as amostras de pacientes incluídas em parafina, bem como as linhagens celulares avaliadas, apresentaram miRNAs com perfis de expressão específico para cada tecido avaliado. Destarte, com base nos resultados dessas análises, selecionamos o *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR181d-5p*, bem como alguns de seus genes alvo, para validação.

O presente estudo pretende contribuir para a identificação de uma assinatura molecular nos tumores de músculo liso uterino. Pois, poderá ajudar a

esclarecer mecanismos que envolvem a ação e os efeitos genotípicos e fenotípicos desses potenciais biomarcadores para fins de diagnóstico, prognóstico e tratamento exclusivos para esses tumores. A reprogramação de redes desses miRNAs em células de LM e LMS, pode contribuir para uma série de estratégias eficazes para o desenvolvimento a médio e longo prazo de novas terapias.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o papel dos miRNAs *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR181d-5p*, e de alguns dos seus principais alvos, em cultura de células de leiomiossarcomas uterino, em comparação com células de leiomioma e miométrio.

2.2. Específicos

1. Avaliar e comparar o perfil de expressão basal dos miRNAs *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR181d-5p* nas linhagens celulares e em amostras de pacientes portadoras de LMS e LM uterinos;
 2. A partir dos dados de expressão desses cinco miRNAs, inativar e induzir aqueles que apresentarem regulação diferencial entre as linhagens celulares avaliadas;
 3. Avaliar os efeitos da manipulação genética dos miRNAs selecionados (inativação e indução de expressão) no comportamento das células em cultura;
 4. Avaliar o efeito da manipulação genética desses miRNAs na expressão de seus genes alvo;
 5. Em paralelo, verificar a associação entre os dados clínicos e anatomotológicos das pacientes e a expressão dos miRNAs.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Todas as técnicas foram realizadas no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58), da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após a aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (Nº 1.517.306, Anexo D).

3.2. Seleção das amostras de pacientes e extração do ácido ribonucleico (RNA)

As amostras de pacientes, fixadas em formol e incluídas parafina, obtidas do Departamento de Patologia do AC Camargo Cancer Center e do Ambulatório de Miomas da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram utilizadas para a verificação do perfil de expressão dos miRNAs.

As amostras de pacientes FFPE (*Formalin Fixed Paraffin embedded tissues*), cedidas pelo Departamento de Anatomia Patológica do A C Camargo Cancer Center e pelo Ambulatório de Miomas da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram utilizadas para a verificação do perfil de expressão dos miRNAs.

Este estudo deriva das análises realizadas por Dos Anjos et al. (2018) que utilizaram 37 amostras de LMS, 11 de LM e 2 MM para *screening* do perfil de expressão de 84 sequencias de miRNAs. Nas etapas de validação, na presente

pesquisa, para a extração de RNA total, foram utilizadas novas amostras que totalizaram 12 MM normal provenientes de pacientes submetidas à histerectomia total, 10 LM (submucosos) e 15 LMS (tumor primário). A Figura 11 apresenta o fluxograma do estudo, discriminando o numero de amostras utilizado em cada etapa deste estudo.

Figura 11 – Esquema do desenvolvimento metodológico e fluxo de trabalho.

O material genético foi extraído do tecido parafinado com o *kit ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System kit* (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração e pureza das amostras obtidas foram avaliadas em espectrofotômetro tipo *NanoDrop (Thermo Fisher Scientific™, Fremont, CA, EUA)* e as concentrações dos miRNAs foram confirmadas em fluorômetro *Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific™, MA, EUA)*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras de RNA total foram estocadas em freezer -80 °C para uso posterior.

3.3. Cultura de células

As linhagens celulares estabelecidas para o estudo foram as de MM (PCS-460-011), LM (THESCs - CRL-4003) e LMS uterinos (SK-UT-1 - HTB-114), adquiridas da *American Type Culture Collection (ATCC, VA, EUA)*. Cada linhagem celular foi cultivada em garrafa de cultura de 75 cm² estéril com meio específico para cada uma e em condições recomendadas pela *ATCC* como, temperatura a 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂.

A linhagem celular de MM foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 D8900 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanha)*, suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco, CA, EUA*), L-glutamina, ácido ascórbico, bicarbonato de sódio, glucose, *fenol red* e antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina β) na concentração de 1:1000 com o pH 7,6 (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografia das células de MM (PCS-460-011) em cultura (aumento de 40X).

O meio de cultura utilizado para a linhagem de LM foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 D2906* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanha), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, CA, EUA) - tratado com carvão ativado para remoção de componentes – inativado, bicarbonato de sódio, glucose, ácido piruvico e antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina β) na concentração de 1:1000 com o pH 7,6 (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografia das células de LM (THESCs – CRL-4003) em cultura (aumento de 40X).

Para o cultivo das células de LMS foi utilizado o meio de cultura *Basal Medium Eagle B9638* (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Alemanha) com 10% de soro fetal bovino inativado, bicarbonato de sódio, glucose e antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina β) na concentração de 1:1000 com o pH 7,8 (Figura 14).

Os meios de cultura das células eram trocados a cada 48 horas (h) e as células eram repicadas quando apresentavam até 90% de confluência. Para os ensaios de inibição e indução da expressão de miRNAs, análise da expressão gênica, proliferação e migração as células foram semeadas entre a 6^o e 8^o passagem.

Figura 14 - Fotomicrografia das células de LMS (SK-UT-1 – HTB-114) em cultura (aumento de 40X).

Ensaaios para detecção de possível contaminação com micoplasmas foram realizados periodicamente para garantir a integridade celular, antes da realização de todos os experimentos. A detecção foi realizada por PCR convencional utilizando a sequência de primers GPO3 *sense* 5' GGGAGCAAACACGATAGATACCCT 3', MGSO *antisense* 5'

TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC 3', cujo o produto de amplificação possui 270 pb, conforme descrito por (Timenetsky et al., 2006).

3.4. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração de DNA genômico das linhagens celulares cultivadas foi realizada para o ensaio de autenticação celular. O material genético foi obtido com o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Após o cultivo, as células foram tripsinizadas e centrifugadas para formação de um precipitado celular com um total de 5×10^6 células.

O precipitado de células foi lavado com 200 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x e adicionou-se a proteinase K. No mesmo microtubo foram adicionados 200 μ L de *Buffer AL* e o conteúdo foi homogeneizado e incubado por 10 minutos na temperatura de 56 °C. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de etanol 100% com homogeneização do material. Todo o conteúdo foi transferido para a coluna, centrifugado a 8000 rotações por minutos (rpm) por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Adicionou-se 500 μ L de *Buffer AW1* e realizou-se nova centrifugação. Após essa etapa, adicionou-se o tampão de lavagem *Buffer AW2*, a centrifugação foi realizada por 3 minutos a 14000 rpm, e o filtrado foi descartado. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 100 μ L de *Buffer AE* no centro da membrana, com incubação por 1 minuto em temperatura ambiente e posterior centrifugação por 8000 rpm. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro tipo *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher ScientificTM*, Fremont, CA, EUA) e armazenado a -20 °C.

3.5. Autenticação celular

A verificação genética da autenticidade das linhagens utilizadas foi realizada em duplicata e se deu pela avaliação da amplificação das regiões de sequências de repetições curtas - *short tandem repeat* (STR) do DNA genômico. A metodologia utilizada consistiu na análise em dez *loci* *TH01*, *TPOX*, *vWA*, *Amelogenina*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317*, *D5S818* e *D21S11*, para a confirmação da identidade das células de acordo com ATCC (*American Type Culture Collection*, VA, EUA).

A autenticidade das linhagens foi confirmada com o *kit GenePrint 10 System* (*Promega*, WI, EUA). O DNA celular previamente extraído foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoDrop*, *Thermo Fisher Scientific*TM, *Fremont*, CA, EUA) e utilizou-se 10 ng de DNA de cada linhagem. Para a reação de pré-amplificação foram adicionados 5 µL de iniciador e 5 µL do *Master mix* no microtubo. As amostras foram submetidas aos ciclos de temperaturas recomendado pelo fabricante, descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições utilizadas nas reações de autenticação celular

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	96 °C	1 minutos	1
Desnaturação	94 °C	10 segundos	30
Anelamento/Extensão	59 °C	1 minuto	
	72 °C	30 segundos	
Parada da reação	60 °C	10 minutos	1
<i>Hold</i>	4 °C	Infinito	1

FONTE: <https://www.promega.com.br/products/cell-authentication-sample-identification/cell-line-authentication/geneprint-10-system/?catNum=B9510>

Após a ciclagem de temperaturas, foi realizada a reação de pós-amplificação. Na reação foram utilizados 10 µL de formamida, 1 µL do reagente *ILS600*, 1 µL do produto de PCR. As amostras foram acondicionadas em uma placa de 96 poços e submetidas à desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguida de incubação a -20 °C por 2 minutos. As amostras foram sequenciadas no aparelho *3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA)* e os fragmentos sequenciados (contendo os 9 STR *loci* e Amelogenina) foram analisados com o auxílio do *software Gene Mapper V. 4.1*. Os resultados baseados em similaridades foram conferidos com o banco de dados fornecido pela ATCC (<https://www.atcc.org/>).

3.6. Síntese de DNA complementar (cDNA) para as reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em arrays de miRNAs

A transcrição reversa, que consiste na síntese de cDNA, para análise de expressão dos miRNAs foi realizada a partir do RNA total, previamente extraído de amostras de pacientes (37 LMS, 11 LM e 2 MM) e das linhagens celulares.

Para o ensaio de qRT-PCR em *array* (placa de 96 poços contendo oligonucleotídeos iniciadores para 84 sequências de miRNAs) foi utilizado o *kit miScript II RT (Qiagen, Hilden, Alemanha)* (Figura 15). Os reagentes foram descongelados em temperatura ambiente e a mistura de reação foi preparada no gelo nas seguintes concentrações: 4 µL de 5x *miScript HiSpec Buffer*, 2 µL de 10x *Nucleics Mix*, 2 µL de *miScript Reverse Transcriptase Mix*, 250 ng de DNA molde e água livre de RNase para completar o volume final de reação de 20 µL. A mistura foi incubada a 37 °C por 60 minutos, depois a 95 °C por 5 minutos e

em seguida, em gelo para inativar a reação. O cDNA foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

As reações de qRT-PCR em *array* realizadas com o sistema de detecção *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen, Hilden, Alemanha), avaliaram o perfil de expressão de 84 sequências de oncomirs (vide lista das sequências no Anexo A, Tabelas 28 e 29) nas linhagens celulares e amostras de pacientes com LM e LMS uterinos.

FONTE: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=1cf66631-fcaa-4e7e-b56e-c48e770fe1a9&lang=en> (modificado).

Figura 15 - Conversão dos miRNAs maduros em cDNA e sua detecção. Os miRNAs maduros são poliadenilados e transcritos reversamente, utilizando os oligos-dT. Esses iniciadores possuem uma região 3' degenerada e uma sequência universal na extremidade 5' permitindo à amplificação do miRNA maduro na etapa do qRT-PCR. A combinação de poliadenilação e adição de marcadores universais garante que não haja amplificação de o DNA genômico.

O cDNA previamente sintetizado foi diluído em 200 μ L de água livre de RNase, para cada 20 μ L de reação de transcriptase reversa. Os reagentes 2x *QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix* e 10x *miScript Universal Primer* foram descongelados em gelo. Em um tubo de 5 mL adicionou-se 1.375 μ L de 2x *QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix*, 275 μ L de 10x *miScript Universal Primer*, 1 mL de água livre de RNase e 100 μ L de cDNA, totalizando um volume final de 2.750 μ L.

A mistura de reagentes foi homogeneizada e 25 μ L da reação foram adicionados em cada poço das placas pré-desenhadas *MIHS-109ZA* e *MIHS-102ZA* (*Qiagen*, Hilden Alemanha) de 96 poços, contendo as 84 sequências de miRNAs (Figura 16). As placas foram seladas e centrifugadas por 1 minuto a 3000 rpm em temperatura ambiente, colocada no aparelho *7500HT Real Time PCR System* (*Applied Biosystem*, CA, EUA) e submetidas às ciclagens de temperatura recomendada pelo fabricante, descritas na Tabela 6. Para as linhagens celulares, as reações foram realizadas em duplicatas. Então, os dados obtidos foram compilados e analisados no site *GeneGlobe Data Analysis Center* <https://geneglobe.qiagen.com/br/analyze/> (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) por meio do método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os normalizadores estabelecidos foram *SNORD61* e *SNORD68* para a placa *MIHS-109ZA* e *SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96A* e *RNU6-2* para *MIHS-102ZA* (De Almeida et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018).

De acordo com o *GeneGlobe Data Analysis Center*, os valores considerados são a média dos valores de ΔCt dos grupos testes e referência para o cálculo do *fold* de expressão. O valor do ΔCt foi calculado subtraindo o Ct de cada miRNA do grupo teste ou referência pela média do Ct dos controles

normalizadores selecionados. Então, os valores de *fold change* e *fold regulation* (FR) foram calculados. A fórmula utilizada para o *fold change* foi $2^{-\Delta Ct \text{ (teste)}}/2^{-\Delta Ct \text{ (controle)}}$, sendo representado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor do FR é o inverso negativo do *fold change* para valores com menor expressão ($-1/\text{valor do } fold \text{ change}$) e o valor do *fold change* é o mesmo do FR para a maior expressão. Os valores de expressão utilizados para as análises foi o *fold change*, também conhecido como *relative quantification* (RQ) (Livak et al., 2001).

Tabela 6 - Condições utilizadas nas reações de qRT-PCR em *array*

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação inicial	95 °C	15 minutos	40
Desnaturação	94 °C	15 segundos	
Anelamento	55 °C	30 segundos	
Extensão	70 °C	30 segundos	

FONTE: <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=1cf66631-fcaa-4e7e-b56e-c48e770fe1a9&lang=en>

FONTE: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=1cf66631-fcaa-4e7e-b56e-c48e770fe1a9&lang=en> (modificado).

Figura 16 - Desenho das placas *MIHS-109ZA* e *MIHS-102ZA* de 96 poços contendo 84 miRNAs, 6 controles e 6 normalizadores em cada uma delas.

Após a identificação do perfil de expressão dos 84 miRNAs em cada uma das placas, 5 foram selecionados (*let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR-181d-5p*) para serem validados pelo sistema de detecção por sondas *TaqMan*[®] *Advanced miRNA* (*Applied Biosystems*, CA, EUA), tanto nas linhagens celulares como nas amostras de pacientes. As sondas customizadas do sistema *TaqMan Advanced miRNA*, possuem uma maior especificidade para os ensaios de qRT-PCR. Assim, a expressão dos miRNAs a partir dos dados do qRT-PCR em *array*, foram avaliados por esse sistema.

A metodologia utilizando as sondas *TaqMan*[®] está descrita no item 3.9, de síntese de cDNA e qRT-PCR para miRNAs, por ter sido usada também para avaliar a expressão nas células após a manipulação molecular.

3.7. Transfecção com Mimic e siRNA

Os miRNAs *miR-34a-5p* e *miR-181b-5p* apresentaram perfis de expressão basal diferencial tanto em amostras de pacientes como nas células. Assim, eles foram selecionados para a validação funcional com construções previamente inventoriadas, *MISSION microRNA Mimic* (*Sigma Aldrich*, MO, EUA) para indução da expressão (Mimic) e *MISSION Synthetic miRNA Inhibitors* (*Sigma Aldrich*, MO, EUA) para inibição da expressão (siRNA), de acordo com os miRNAs específicos (Tabela 7). Essas construções são constituídas de pequenas moléculas de RNA de fita dupla, projetadas para indução ou inibição das moléculas de miRNA maduras endógenas específicas, que quando introduzidas nas células ligam-se ao miRNA em cada uma das fitas (Figura 17). As construções foram ressuspensas em 500 µL de água ultrapura para a concentração final de 10 µM.

Tabela 7 – Construções para transfecção celular dos miRNAs

miRNA alvo	Referência	Sequência madura do miRNA
<i>miR-34a-5p</i>	HMI0508 Mimic	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
<i>miR-34a-5p</i>	HSTUD0508 siRNA	
<i>miR-181b-5p</i>	HMI0270 Mimic	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU
<i>miR-181b-5p</i>	HSTUD0270 siRNA	
<i>EGFP</i>	EHUEGFP	Controle negativo

FONTE: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=siRNA+MISSION&interf ace=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>

FONTE: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/miRNA_Targets_and_Functional_Analysis.php (modificado).

Figura 17 - Esquema de funcionamento das construções para a indução (Mimic) e inibição (siRNA) da expressão dos miRNAs. A molécula endógena (fita verde) se liga ao seu alvo específico, levando ao silenciamento genético. Os Mimics são RNAs de fita dupla sintéticos projetados para induzir a expressão imitando um miRNA endógeno. A fita em laranja regula seu alvo da mesma forma que o miRNA endógeno. Os inibidores de miRNAs ou siRNA (em roxo) são projetados para se ligar especificamente, impedindo que o miRNA ligado interaja com o seu alvo e o silencie.

As linhagens celulares de LM e LMS foram cultivadas até atingirem 80% de confluência nos meios de cultura específicos, em garrafas de cultura de 75 cm² sem antibióticos. Na 8ª passagem, as células foram removidas das garrafas de cultura com Tripsina-EDTA (0,05%) (Gibco, CA, EUA) e então transferidas para um tubo tipo *Falcon* de 15 mL que foi centrifugado a 2000 rpm por 10

minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura completo. Para contagem, em um microtubo foi adicionado 10 µL de azul de tripan (0,4%) (*Gibco*, CA, EUA) e 10 µL da suspensão de células (1:1). Um volume de 10 µL de solução foi adicionado nas lâminas específicas do aparelho *Coutness* (*Invitrogen*, CA, EUA) para a contagem e avaliação da viabilidade celular.

As células de LM e LMS apresentaram uma viabilidade celular acima de 95%. Então, foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 por poço e cultivadas por 24h, antes da transfecção com as construções Mimic e siRNA. O meio de cultura foi removido e 450 µL de meio com soro reduzido *Opti-MEM* (*Gibco*, CA, EUA) foram adicionados em cada poço. A transfecção foi realizada com *Lipofectamina RNAiMAX* (13778500) (*Invitrogen*, CA, EUA). Para cada construção a mistura de reação foi preparada como descrito na Tabela 8.

Após a preparação da *Mistura de reação 3*, os microtubos foram agitados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente para a formação das micelas e 50 µL dessa reação foram adicionados em cada poço. As reações foram realizadas em triplicatas para todos os ensaios. Nos tempos de 24, 48, 72 e 96h as células transfectadas foram raspadas das placas de cultura com PBS 1x e armazenadas em freezer -80 °C para posterior extração de RNA.

Como controle negativo (CN) da transfecção celular foi utilizado o *MISSION esiRNA EGFP* (EHUEGFP, *Sigma Aldrich*, MO, EUA), que tem como alvo a proteína verde fluorescente enriquecida (do inglês *enhanced Green Fluorescent Protein – eGFP*). Esse constructo pode ser utilizado tanto como CN

em sistemas sem EGFP, como controle positivo de silenciamento em sistemas que o expressam.

Tabela 8 – Concentração dos reagentes utilizados no ensaio de transfecção celular

Passos	Reagente	Volume
Mistura de reação 1	Opti-MEM	75 µL
	Lipofectamina	4,5 µL
Mistura de reação 2	Opti-MEM	75 µL
	Mimic ou siRNA	1,5 µL
Mistura de reação 3	Mistura 1 + Mistura 2 (50 µL por poço com 10 µM)	

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?http%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FLipofectamine_RNAiMAX_Reaq_protocol.pdf&title=TGlwb2ZIY3RhbWluZS ZyZWc7IFJOQ WINQVggUmVhZ2VudCBQcm90b2NvbA==

3.8. Extração do RNA total para avaliação da expressão gênica nas linhagens celulares após manipulação molecular

O RNA total foi extraído das células após serem realizadas as transfecções, para a avaliação dos efeitos desta no perfil de expressão dos miRNAs e expressão dos genes alvo com o kit de extração *mirVana miRNA Isolation* (Ambion, CA, EUA). As células coletadas foram lavadas com 1 mL de PBS 1x, centrifugadas novamente para formar o precipitado e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se no microtubo 300 µL de *Lise/Binding Solution* para a concentração celular de 10^7 células, seguida de homogeneização para garantir o rompimento celular.

Adicionou-se 1/10 do volume do reagente *miRNA Homogenate Additive* nas células rompidas e, após a homogeneização, o conteúdo foi incubado no gelo por 10 minutos. Um volume de 300 µL de Ácido – Fenol:Clorofórmio com

pH 4,3 (AM9720, *Ambion*, CA, EUA) – proveniente do kit - foi adicionado no tubo, homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 9.450 rpm, em temperatura ambiente para separação das fases aquosas e orgânicas. Após nova centrifugação, a fase aquosa (superior) foi removida cuidadosamente, sem mexer na fase inferior, e transferida para um tubo novo.

Adicionou-se um volume na proporção de 1,25 de etanol 100%, isto é, se o volume coletado na fase anterior foi de 300 µL o volume de etanol adicionado foi 375 µL, em temperatura ambiente. A amostra com o volume de 675 µL foi transferida para a coluna e centrifugada a 9.450 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado e foram adicionados 700 µL de tampão de lavagem *miRNA Wash Solution 1* à coluna, que foi novamente centrifugada a 9.450 rpm por 1 minuto. Seguiu-se a adição de 500 µL de *Wash Solution 2/3* e centrifugação a 9.450 rpm por 1 minuto. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Finalmente, 100 µL de *Elution Solution*, aquecido a 95 °C, foram adicionados diretamente na membrana da coluna com centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm.

A concentração e pureza das amostras obtidas foram avaliadas em espectrofotômetro tipo *NanoDrop (Thermo Fisher ScientificTM, CA, EUA)* e as concentrações dos miRNAs foram confirmados com o fluorômetro *Qubit 2.0 (Thermo Fisher ScientificTM, MA, EUA)*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.9. Síntese de cDNA para qRT-PCR utilizando o sistema de detecção por sondas *TaqMan*[®]

A síntese de cDNA foi realizada por meio da transcrição reversa para miRNAs com o kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (A28007) (*Applied Biosystems*, CA, EUA) para as amostras de RNA total de pacientes e linhagens celulares.

3.9.1. Reação de Adição da Cauda de Poli(A)

Nessa reação, a enzima poli(A) polimerase adiciona uma cauda de adenosina na região 3' do miRNA. As amostras de RNA molde e reagentes foram previamente descongeladas em gelo. Em um microtubo adicionou-se 0,5 µL de 10x *Poly (A) Buffer*, 0,5 µL de reagente ATP, 0,3 µL de *Poly (A) Enzyme*, 0,25 µL *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, CA, EUA), 1,45 µL de água livre de RNase e 10 ng de RNA, estabelecido pelo fabricante. Após homogeneização e breve centrifugação, o tubo de reação foi acondicionado em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystem*, CA, EUA) e submetido as ciclagens descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições utilizadas nas reações da cauda poli(A)

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Poliadenilação	37 °C	45 minutos	1
Parada da reação	65 °C	10 minutos	1
<i>Hold</i>	4 °C	Infinito	-

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGFXTWFlUEFkdmluY2VklG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

Em seguida as amostras foram submetidas a uma nova etapa da reação de transcrição como descrito a seguir.

3.9.2. Reação de ligação do adaptador

Nesta etapa, o miRNA com a cauda poli(A) foi submetido a ligação do adaptador na extremidade 5'. Esse adaptador atua como o iniciador da fita senso no sítio de ligação para a reação de amplificação denominada de miR-Amp. Para a reação de ligação do adaptador foram adicionados para cada amostra 3 µL de 5x *DNA Ligase Buffer*, 4,5 µL de 50% *PEG 8000*, 0,6 µL de 25x *Ligation Adaptor*, 1,5 µL de *RNA Ligase*, 0,4 µL de água livre de RNase. Todo volume foi transferido para o microtubo contendo o produto da reação da ligação da cauda Poli(A), as amostras foram homogeneizadas e submetidas aos ciclos descritos na Tabela 10. Após as ciclagens, a reação de transcrição reversa continuou como descrito no próximo item 3.9.3.

Tabela 10 - Condições utilizadas nas reações de ligação do adaptador

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ligação	16 °C	60 minutos	1
Hold	4 °C	Infinito	-

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGxTWFluEFkdmFuY2VkIG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

3.9.3. Reação de transcrição reversa (RT)

Neste ciclo da reação, o iniciador RT universal liga-se à cauda de poli(A) 3' e o miRNA é reversamente transcrito. O cDNA resultante pode ser utilizado para todos os ensaios de qRT-PCR.

No mesmo microtubo contendo o produto de reação de ligação do adaptador adicionou-se 6 µL de 5x *Mix RT Buffer*, 1,2 µL de *dNTP Mix* (25 mM), 1,5 µL de 20x *Universal RT Primer*, 3 µL de 10x *RT Enzyme Mix*, 1,25 µL *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, CA, EUA) e água livre de RNase para o volume final de 30 µL. As amostras foram homogeneizadas, brevemente centrifugadas e submetidas aos ciclos de temperaturas descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições utilizadas nas reações de transcrição reversa

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	42 °C	15 minutos	1
Parada da reação	85 °C	5 minutos	1
<i>Hold</i>	4 °C	Infinito	-

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGFXTWFluEFkdmFuY2VkIG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

3.9.4. Reação de amplificação dos miRNAs (*miR-Amp*)

Por se tratarem de pequenas moléculas, as amostras foram submetidas a reação de amplificação dos miRNAs. Essa reação aumenta significativamente o número de moléculas de cDNA.

Inicialmente, foi preparada a mistura de *miR-Amp Reaction* que para cada amostra continha 25 µL de 2x *miR-Amp Master Mix*, 2,5 µL de 20x *miR-Amp*

Primer Mix, 17,5 µL de água livre de RNase e 5 µL do produto da reação de RT realizada anteriormente (volume final de 50 µL). Após homogeneização e breve centrifugação, as amostras foram submetidas às ciclagens descritas na Tabela 12. Posteriormente, o produto da reação não diluído foi armazenado a -20 °C para a utilização nos ensaios de qRT-PCR.

Tabela 12 - Condições utilizadas nas reações de *miR-Amp*

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	95 °C	5 minutos	1
Desnaturação	95 °C	3 segundos	14
Anelamento/Extensão	60 °C	30 segundos	
Parada da reação	99 °C	10 minutos	1
<i>Hold</i>	4 °C	Infinito	-

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FDFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGxTWFuIEFkdmdFuY2VklG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

A Figura 18 mostra as etapas da transcrição reversa esquematicamente para os miRNAs desde a adição da cauda poli(A) até a etapa final a reação de amplificação do miRNA.

FONTE: https://assets.thermofisher.com/TFSSAssets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf (modificado).

Figura 18 - Síntese do cDNA. Adição da cauda poli(A) na região 3' e adaptador na região 5' para a transcrição reversa e amplificação dos miRNAs. PAP: Polimerase Poli(A); Lig: Ligase; RT: Transcriptase reversa; P: DNA polimerase *Hot-start*.

3.9.5. Ensaio de qRT-PCR para análise do perfil de expressão de miRNAs maduros – sistema TaqMan Advanced miRNA

O perfil de expressão dos miRNAs *let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR-181d-5p* foram avaliados pelo sistema *TaqMan® Advanced miRNA* (Applied Biosystems, CA, EUA) (Tabela 13), em triplicata. Primeiramente, o cDNA de cada amostra foi diluído na proporção de 1:10 em água livre de RNase. A reação foi preparada seguindo a orientação do fabricante. Uma placa de 96 poços foi utilizada para a reação, onde foi adicionado 10 µL de

TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x), 1 µL de *TaqMan Advanced miRNA Assay* (20x), 4 µL de água livre de RNase e 5 µL de cDNA diluído, para cada amostra. A placa foi selada com *MicroAmp Optical Adhesive Film* (*Applied Biosystem*, CA, EUA), centrifugada e colocada no aparelho no aparelho *7500HT Real Time PCR System* (*Applied Biosystem*, CA, EUA) obedecendo as ciclagens descritas na Tabela 14.

Tabela 13 - miRNAs selecionados para o ensaio qRT-PCR

Nome do ensaio	Ensaio	Sequência alvo
<i>hsa- let-7f-5p</i>	478578_mir	5'-UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU-3'
<i>hsa- miR-10b-5p</i>	478494_mir	5'-UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG-3'
<i>hsa-miR-34a-5p</i>	478048_mir	5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3'
<i>hsa-miR-181b-5p</i>	478583_mir	5'-AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU-3'
<i>hsa-miR-181d-5p</i>	479517_mir	5'-AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU-3'

FONTE: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/?pearUXVerSuffix=pearUX2&elcanoForm=true#!/microna/assays/microna_advanced/?keyword=mirna

Tabela 14 - Condições utilizadas nas reações de qRT-PCR

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	95 °C	20 segundos	1
Denaturação	95 °C	3 segundos	40
Anelamento/Extensão	60 °C	30 segundos	

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FFTFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGxTWFuIEFkdmlFuY2VklG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

A Figura 19 mostra a representação esquemática das etapas e princípios do método de qRT-PCR para detecção dos miRNAs utilizando as sondas *TaqMan*TM.

FONTE: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf (modificado).

Figura 19 - Representação geral do ensaio de qRT-PCR para detecção de miRNAs. A) Síntese de cDNA. B) Anelamento das sondas e iniciadores às fitas de cDNA. Durante a PCR, os iniciadores se ligam ao cDNA molde desnaturado. C) Polimerização inicial e clivagem do iniciador na região ligada ao repórter fluorescente. Durante a polimerização, a DNA polimerase cliva apenas as sondas que hibridizam com a sequência alvo. A separação da fluorescência repórter do corante “*quencher* ou supressor” resulta no aumento da fluorescência do repórter. Uma vez que a sonda é complementar à sequência alvo a ser amplificada durante a PCR. Assim, nenhuma amplificação inespecífica é detectada. D) Conclusão da polimerização. A polimerização da fita continua, porque a extremidade 3’ da sonda está bloqueada, nenhuma extensão da sonda ocorre durante a PCR. P: DNA polimerase *Hot-start*; R: Fluorescência repórter; NFQ: Corante “*quencher* ou supressor” não fluorescente; MGB: sonda MGB *TaqMan*.

Após a ciclagem de temperaturas, os dados foram coletados e analisados.

Os genes normalizadores das reações foram selecionados e estabelecidos de acordo com o *software* de análise de algoritmo RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). O normalizador selecionado foi o *miR-*

320a (478594_mir) com sequência alvo 5'-AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA-3' de acordo com o quadro de endógenos fornecido pelo fabricante. A quantificação dos transcritos foi realizada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o *software* SDS 3.0 (Applied Biosystems, CA, EUA). Objetivando uma melhor apresentação dos resultados, os valores de expressão dos miRNAs estão descritos como RQ (*relative expression*) ou FR (*fold regulation*). O valor de corte para as análises de expressão dos miRNAs foi estabelecido em >1 para RQ, e em $\geq +1$ and ≤ -1 para FR.

3.10. Curvas de proliferação e avaliação da viabilidade celular

As células foram semeadas em placa de cultura celular de 96 poços nas concentrações 2×10^4 em quadruplicata e transfectadas com as construções Mimic e siRNA como descrito previamente (item 3.7), o volume e as concentrações dos reagentes estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Concentração dos reagentes para a transfecção celular

Passos	Reagente	Volume
Mistura de reação 1	Opti-MEM	25 μ L
	Lipofectamina	1,5 μ L
Mistura de reação 2	Opti-MEM	25 μ L
	Mimic ou siRNA	0,5 μ L
Mistura de reação 3	Mistura 1 + Mistura 2 (10 μ L por poço com 10 μ M)	

FONTE: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGxTWFuIEFkdmluY2VklG1pUk5BIEFzc2F5cyAtIFNpbmdsZS10dWJlIGFzc2F5cw==

A proliferação celular foi avaliada nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96h. Em cada tempo determinado, foram adicionados 100 µL do reagente *PrestoBlue Cell Viability* (Invitrogen, CA, EUA), na proporção 1:10 (*PrestoBlue Cell Viability* em meio de cultura), em cada poço. As placas foram incubadas por 2h a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. As leituras das placas foram realizadas no aparelho *GloMax Plus* (Promega, EUA) e analisados. A reação reduz rapidamente a atividade metabólica celular possibilitando a quantificação das células viáveis. O aparelho fornece a quantidade de fluorescência relativa ao número de células para cada um dos poços das placas.

3.11. Ensaios de migração (*Scratch ou Wound Healing*)

Cada linhagem foi semeada em placa de cultura de 24 poços na concentração de 3×10^5 em triplicata e cultivadas por 24h. Com uma ponteira de 200 µL foi realizado um risco no fundo da placa para a remoção das células aderidas, como descrito por Liang et al. (2007). O meio de cultura foi aspirado e 450 µL de *Opti-MEM* (Gibco, CA, EUA) foram adicionados para a reação de transfecção celular com as construções Mimic e siRNA como descrito anteriormente no item 3.7.

Após a transfecção, as células foram cultivadas com meio de cultura específico contendo 1% de soro fetal bovino para inibir a proliferação.

A migração celular foi avaliada nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96h. O cálculo da área migrada foi realizado com base na hora 0 (momento em que foi realizado o risco) para cada poço. As microfotografias foram realizadas nos tempos estabelecidos, com auxílio do microscópio óptico invertido (*Zeiss, Alemanha*) e analisadas no software *ImageJ* (V1.53b).

3.12. Análises *in silico*

As redes de interações epigenéticas e genéticas de cada miRNA estudado, foram avaliadas por meio de análises *in silico* (computacional), realizadas nos *websites* <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (De Almeida et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018) e <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/index.php> (Hamberg et al., 2016). Essas análises permitiram a identificação de alguns de seus principais genes alvos, além de preditores que são regulados por esses miRNAs e que estão fortemente relacionados à tumorigênese.

3.13. Ensaios de expressão gênica para os genes alvo selecionados

3.13.1. Síntese de cDNA para expressão gênica

As amostras de RNA total previamente extraídas (item 3.8) após a transfecção celular, foram utilizadas para o ensaio preliminar de expressão dos genes alvo selecionados (*CCND1*, *BCL2*, *MDM4*, *TP53*, *FGFR1*, *TIMP3*, *ESR1*) na análise *in silico*.

A transcrição reversa foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). Na reação, para todas as amostras, foram adicionados 2 µL de 10x *RT Buffer*, 0,8 µL de 25x *dNTP Mix*, 2 µL de 10x *Random Primers*, 1 µL *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 0,5 µL de *RNase Inhibitor* e os RNAs nas concentrações máximas obtidos ($\cong$ 90 ng).

As amostras foram submetidas à ciclagem de temperatura de acordo com a Tabela 16. Após a ciclagem todas as amostras foram diluídas em 1:10 e água livre de RNase para qRT-PCR.

Tabela 16 - Condições utilizadas nas reações de síntese de cDNA

Temperatura	Tempo	Ciclos
25 °C	10 minutos	1
37 °C	120 minutos	1
85 °C	5 minutos	-
4 °C	Infinito	-

FONTE: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042557.pdf

Para a verificação da eficiência da síntese de cDNA e descartar contaminação com DNA genômico nas amostras, foi utilizada a reação de PCR convencional para o gene *GAPDH* (iniciador senso 5'-GAAGGTGAAGGTCGGA-3' e anti-senso 3'-GGGTCATTGATGGCAAC-5'). Na reação foram adicionados 2,5 µL de *Buffer* 10x *Mg*, 0,5 µL de *dNTPs*, 0,75 µL de *MgCl₂*, 0,5 µL de *primer* senso, 0,5 µL de *primer anti-senso*, 0,1 µL de *Taq* polimerase (*Taq Platinum*, *Invitrogen*, SP, Brasil), 1 µL de amostra de cDNA (concentração $\cong$ 5 ng) e água ultrapura para o volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas aos ciclos de temperaturas descritos na Tabela 17. A eletroforese em gel de agarose 2% foi realizado com o produto do PCR que gerou um amplicon de 105 pb (Figura 20).

Tabela 17 - Condições utilizadas nas reações de PCR para *GAPDH*

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	94°C	2 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	35
Anelamento/Extensão	55°C	30 segundos	
Parada da reação	72°C	1 minuto	
<i>Hold</i>	4°C	Infinito	-

FONTE: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/BID/manuals/MAN0017535_Platinum_II_HS_PCR_MM_UG.pdf

Figura 20 – Gel de agarose (2%) representativo do perfil de amplificação do GAPDH por PCR. A) Amplificação de *GAPDH* utilizando o cDNA das células de LMS (amplicon de 105 pb). B) Amplificação de *GAPDH* utilizando o cDNA das células de LM (amplicon de 105 pb). M, marcador de peso molecular 100 pb; CP1, controle positivo 1; CP2, controle positivo 2; CN1, controle negativo 1; CN2, controle negativo 2; CN3, controle negativo do PCR.

Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de qualidade necessária para a realização dos ensaios de expressão gênica por qRT-PCR. Assim, os ensaios foram realizados como descrito a seguir.

3.13.2. Reações de qRT-PCR para os genes alvo dos miRNAs manipulados

O ensaio de expressão dos genes alvo foi realizado com sondas inventoriadas *TaqMan*TM (Applied Biosystems, CA, EUA) para expressão gênica. Foram selecionados 4 genes alvo para cada um dos miRNAs estudados com base no banco de dados da análise *in silico* realizada previamente. Para o *miR-34a-5p* os genes alvo foram *Ciclina D1* (*CCND1*) (Hs00765553_m1), *BCL2* regulador de apoptose (HS00608023_m1), *MDM4* regulador de p53 (HS00159092_m1) e *TP53* (HS01034249_m1) e para o *miR-181b-5p* foram selecionados os genes *Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos*

(*FGFR1*) (HS00241111_m1), *Inibidor tissular de metalopeptidase TIMP 3* (*TIMP3*) (HS00165949_m1), *Receptor de estrogênio 1* (*ESR1*) (HS01046816_m1) e *BCL2* (HS00608023_m1). O gene da *Beta-2-Microglobulina (B2M)* (4326319E) humana, já estabelecido em nosso laboratório como melhor endógeno para análise de expressão gênica nas linhagens celulares por meio do software de análise de algoritmo RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), foi utilizado para a normalização dessas reações.

Nas reações de PCR realizadas em duplicatas, para cada amostra, foram adicionados 10 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 1 µL *TaqMan Gene Expression assay* e 9 µL de cDNA diluído (1:10). A reação de qRT-PCR foi realizada em placas de 96 poços seladas com *MicroAmp Optical Adhesive Film* (*Applied Biosystem*, CA, EUA) e submetidas a ciclagem de temperaturas no aparelho *7500HT Real Time PCR System* (*Applied Biosystem*, CA, EUA) (Tabela 18). Todos os dados relativos de expressão gênica obtidos, foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabela 18 - Condições utilizadas nas reações de expressão gênica

Ciclagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Incubação	50 °C	2 minutos	1
Ativação da Polimerase	95 °C	10 minutos	1
Denaturação	95 °C	15 segundos	40
Anelamento/Extensão	60 °C	1 minuto	

FONTE: https://thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4304449_TqManPCRM_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVGxTWFuJnJlZzgvVW5pdnVyc2FsIFBDUiBNYXN0ZXIgdWl4

3.14. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com programas auxiliares *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software*, CA, EUA) e *SPSS versão 21* (*IBM Corp.*, NY, EUA) para Windows. A distribuição dos dados contínuos foi analisada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. O teste t de *Student* ou análise de variância (ANOVA) foram utilizados para comparações entre grupos para variáveis paramétricas e *Mann-Whitney U* ou *Kruskal-Wallis* para variáveis não paramétricas. A distribuição da idade das pacientes nos três grupos (MM, LM e LMS) estudados foi avaliada com o teste análise unidirecional de variância ANOVA com o pós-teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. A idade das pacientes foi representada pela média e desvio padrão (média $\pm$ DP).

As diferenças no perfil de expressão dos cinco miRNAs, comparados entre os grupos LM e LMS, foram acessados pelo teste de *Mann-Whitney U*. A expressão dos cinco miRNAs em cultura celular após a transfecção, assim como o perfil de expressão dos genes alvo, o ensaio de migração e proliferação celular foram avaliados com o teste *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*.

O coeficiente de correlação de Pearson e / ou Spearman foi utilizado para medir a força da relação linear entre duas variáveis aleatórias, para os dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente (Kumari et al., 2012).

As variáveis qualitativas foram analisadas com os testes Qui-quadrado de *Pearson* ou o teste exato de *Fisher* quando pertinente.

A curva de *Kaplan-Meier* da sobrevida global em 5 anos (SG) foi analisada com o teste *log-rank* (*Mantel Cox*) e a análise multivariada com o teste de regressão de Cox, por meio do modelo de risco proporcional de Cox. As taxas

de sobrevida foram calculadas com base no tempo ou período em meses. O tempo de sobrevida foi calculado entre a data da cirurgia e a data de óbito ou a data da última informação (acompanhamento). A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada a partir da data de cirurgia até a data da recidiva em meses (Kumari et al., 2012; De Almeida et al., 2019). Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas e anatomopatológicas das pacientes

Dados como idade, uso de contraceptivos, paridade, entre outros foram avaliados nos três grupos (MM, LM e LMS). Observou-se diferenças significativas na comparação entre a idade das pacientes com LMS ($P = 0,0025$) e LM ($P = 0,0003$; Tabela 19) com os MM normais. Maior média de idade, em relação aos demais grupos, foi observada no grupo LMS (Anexo B – Figura 35). As demais características não apresentaram diferenças significativas e estão descritas na Tabela 20.

Tabela 19 - Comparação entre as médias de idade das pacientes por grupo histológico

Idade	MM n = 12	LM n = 10	LMS n = 15	P*
Média $\pm$ DP	45,45 $\pm$ 4,74	42,90 $\pm$ 6,88	58,87 $\pm$ 16,27	0,0025
Min - Máx	39 - 53	31 - 51	32 - 91	

DP: Desvio padrão; Min: Idade mínima; Máx: Idade máxima. *Teste ANOVA com comparação múltipla de Bonferroni.

Tabela 20 - Características clínicas das pacientes incluídas no estudo por tipo histológico (n= 37)

Variáveis	MM (n = 12)	LM (n = 10)	LMS (n = 15)	P*
Contraceptivo				
Sim	27% (3)	50% (5)	7% (1)	0,0742
Não	73% (8)	50% (5)	80% (12)	
NA	-	-	13% (2)	

Continua

				Conclusão
Paridade				
0	18% (2)	40% (4)	7% (1)	0,1278
1	18% (2)	20% (2)	0	
>1	64% (7)	40% (4)	73% (11)	
NA	-	-	20% (3)	
Tabagismo				
Sim	18% (2)	0	0	0,1054
Não	64% (7)	50% (5)	33% (5)	
Ex-fumante	18% (2)	50% (5)	-	
NA	-	-	67% (10)	

NA: não avaliável. *Teste Qui-quadrado.

A frequência de distribuição das variáveis clínicas das pacientes com LMS mostrou que 67% tinham idade acima de 50 anos, 87% não fizeram terapia hormonal e 60% não apresentaram sangramento pós-menopausa. Nas características anatomopatológicas foi observado que 67% dos tumores apresentaram alto grau histológico, 47% com estadiamento (FIGO) I e 87% das pacientes realizaram terapia adjuvante. A ocorrência de metástase incidiu em 80% das pacientes e destas, 73% foram à distância, além disso, 87% vieram a óbito (Tabela 21).

Tabela 21 – Frequência de distribuição das características clínicas e anatomopatológicas das pacientes com LMS

Variáveis	População geral (n = 15)	Frequências percentuais
Idade		
≤ 50	5	33%
> 50	10	67%

Continua

			Conclusão
Terapia hormonal			
Sim	0	0	
Não	13	87%	
NA	2	13%	
Patologia de base			
Sim	7	47%	
Não	6	40%	
NA	2	13%	
Sangramento pós-menopausa			
Sim	4	27%	
Não	9	60%	
NA	2	13%	
Grau histológico			
Baixo	5	33%	
Alto	10	67%	
Estadimento clínico FIGO			
I	7	47%	
II	6	40%	
III	2	13%	
IV	0	0	
Terapia adjuvante			
Sim	13	87%	
Não	2	13%	
Metástase			
Local ^a	1	7%	
Distante ^b	11	73%	
Sem metástase	3	20%	
Óbito			
Sim ^c	13	87%	
Não	0	0	
NA	2	13%	

NA: não avaliável, FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia.

^aRegião pélvica, excessão óssos. ^bAs pacientes desenvolveram metástase ao longo do seguimento. ^cApenas uma das pacientes foi a óbito após o período de 5 anos (60 meses).

4.2. Perfil de expressão dos miRNAs em amostras de pacientes e nas linhagens celulares, utilizando os arrays

Os cinco miRNAs (*let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d*) incluídos no presente estudo, como citado anteriormente, foram selecionados a partir de uma lista de 84 sequências avaliadas previamente por nosso grupo. Seus perfis de expressão foram avaliados em amostras de pacientes e linhagens celulares, por qRT-PCR nos array *MIHS-102ZA* e *MIHS-109ZA*, respectivamente (De Almeida et al., 2017, 2019; Dos Anjos et al., 2018).

Nas amostras de pacientes com LM e LMS (array *MIHS-102ZA*) foram observadas diferenças na expressão de *let-7f* (Quantificação relativa [RQ]: 0,18; P = 0,0321 e RQ: 0,12; P = 0,0039, respectivamente) e *miR-10b* (RQ: 0,22; P = 0,0244 e RQ: 0,11; P = 0,0022, respectivamente), quando comparados ao MM, sendo que ambos apresentaram expressão diminuída em quase quatro vezes. A maior expressão de *miR-34a* foi observada nos LM (RQ: 3,57), embora sem valor significativo. *miR-181b* e *miR-181d* mostraram níveis aumentados de expressão nos LMS (RQ: 2,0 e 3,07, respectivamente), comparado ao MM e LM (Figura 21A).

Para as linhagens celulares (painel *MIHS-109ZA*), havia disponibilidade de quatro miRNAs dos cinco selecionados, *let-7f*, *miR-10b*, *miR-181b* e *miR-181d*. A avaliação da expressão de *miR-34a* nas células foi realizada diretamente com ensaio *TaqMan*, devido à ausência de sua sequência no array. Diferenças nos perfis de expressão foram observadas para *let-7f*, *miR-10b*, *miR-181b* e *miR-181d* nas células. De modo geral, as células de LM apresentaram maior expressão dos quatro miRNAs (*let-7f* [RQ: 2,09], *miR-181b* [RQ: 2,13] e *miR-181d* [RQ: 1,97]) quando comparado ao MM. Porém, apenas para o *miR-10b* foi

observada diferença significativa (RQ: 1,69; $P = 0,0033$). A perda significativa de expressão foi observada para *let-7f* (RQ: 0,66; $P = 0,0033$), *miR-10b* (RQ: 0,33; $P < 0,0001$), *miR-181b* (RQ: 0,38; $P < 0,0001$) e *miR-181d* (RQ: 0,71; $P = 0,0260$) nas células de LMS em comparação com MM (Figura 21B).

Figura 21 - Perfil de expressão dos miRNAs *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d*. A) Comparação da expressão diferencial nas amostras de pacientes com LM e LMS em relação ao MM normal (amostra referência – linha tracejada) avaliadas pelo software *Gene Globe Qiagen* na placa *MIHS-102ZA* com os normalizadores *SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96A* e *RNU6-2* (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,005$). B) Comparação da expressão diferencial nas linhagens celulares de LM e LMS em relação ao MM (amostra referência - linha tracejada), avaliadas pelo software *Gene Globe Qiagen* na placa *MIHS-109ZA* com os normalizadores *SNORD61* e *SNORD68* (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ e *** $P < 0,0001$). O *miR-181d* apresentou uma tendência a significância para o LM ($P = 0,055$). Os resultados são expressos como média, o software *GeneGlobe Data Analysis Center* não fornece os valores de desvio ou erro padrão. Valores abaixo da linha são considerados hipoeexpressos e valores acima da linha hiperexpressos. RQ: Quantificação relativa (do inglês *relative quantification*).

4.3. Validação do perfil de expressão dos miRNAs nas amostras de pacientes e linhagens celulares, utilizando o sistema *TaqMan* de detecção

Para garantir a acurácia da análise de expressão dos miRNAs, realizou-se a validação da expressão diferencial pelo método *TaqMan* de detecção por sondas fluorescentes. Trata-se de um sistema de detecção que garante a

especificidade das reações de amplificação. Os resultados dessas análises nas amostras de pacientes com LMS, apresentaram menor expressão de *let-7f* (RQ: 0,54; $P = 0,0037$), *miR-10b* (RQ: 0,61; $P = 0,0098$) e *miR-34a* (RQ: 1,96; $P < 0,0001$), relativo ao LM (Figura 22A). Os miRNAs *181b* (RQ: 3,18; $P = 0,4112$) e *181d* (RQ: 4,0; $P = 0,0923$) não apresentaram diferença significativa de expressão.

A linhagem de LM exibiu uma maior expressão para *miR-34a* (RQ:4,47), *miR-181b* (RQ: 3,45) e *miR-181d* (RQ: 5,32), similar às amostras de pacientes. O LMS apresentou menor expressão para *miR-10b* (RQ: 0,13; $P = 0,100$), *miR-34a* (RQ: 0,04; $P = 0,100$) e *miR-181b* (RQ: 0,52; $P = 0,100$), semelhante ao encontrado nas amostras de pacientes, embora sem valor significativo quando comparado ao LM (Figura 22B).

Figura 22 - Validação do perfil de expressão dos miRNAs *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d*. A) Comparação do perfil de expressão em amostras de pacientes com LM e LMS (em relação a amostra referência MM normal, igual a 0) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ e *** $P < 0,0001$). B) Comparação do perfil de expressão nas linhagens celulares. As células de MM foram utilizadas como referência (igual a 0). Valores abaixo da linha são considerados hipoexpressos e valores acima da linha hiperexpressos. RQ: Quantificação relativa (do inglês *relative quantification*).

O grau de correlação da expressão dos miRNAs selecionados foi avaliado com o coeficiente de correlação de Spearman, que mostrou uma forte correlação positiva entre *let-7f* e *miR-181d* ($P < 0,0001$), e entre o *miR-181b* e *miR-181d* ($P < 0,0001$). Para o *let-7f*, observou-se também correlação positiva moderada com o *miR-34* ($P = 0,016$) e *miR-181b* ($P = 0,011$). O *miR-10b* apresentou correlação positiva moderada com *miR-181b* ($P = 0,044$) e *miR-34a* ($P = 0,052$), apesar de não significativo para o *miR-34a*. Além disso, foi possível verificar esse mesmo tipo de correlação entre o *miR-34a* e *miR-181d* ($P = 0,038$) (Tabela 22).

Tabela 22 – Grau de correlação da expressão dos miRNAs avaliados

miRNAs		Coeficiente de correlação (r)	P*
<i>let-7f</i>	<i>miR-10b</i>	0,521	0,046
	<i>miR-34a</i>	0,607	0,016
	<i>miR-181b</i>	0,632	0,011
	<i>miR-181d</i>	0,886	<0,0001
<i>miR-10b</i>	<i>miR-34a</i>	0,511	0,052
	<i>miR-181b</i>	0,525	0,044
	<i>miR-181d</i>	0,493	0,062
<i>miR-34a</i>	<i>miR-181b</i>	0,243	0,383
	<i>miR-181d</i>	0,539	0,038
<i>miR-181b</i>	<i>miR-181d</i>	0,800	<0,0001

*Correlação de Spearman.

Em seguida, foram avaliados os dados clínicos das pacientes com LMS em relação ao perfil de expressão de cada miRNA (sendo categorizadas em

menor expressão e maior expressão). No entanto não houve diferenças significativas para nenhum dos miRNAs avaliados (Anexo B, Tabela 30).

Nas análises de correlação, entre a expressão dos miRNAs e a sobrevida global (SG) das pacientes com LMS, notou-se que as pacientes com menor expressão de *let-7f* (50%) apresentaram média de sobrevida de $5,42 \pm 2,26$ meses (Figura 23A). As pacientes com maior expressão (50%) tiveram uma média de SG de $32,00 \pm 12,06$ ($P = 0,007$). Assim como para o *let-7f*, uma menor expressão (50%) de *miR-10b* e *miR-34a* foi observada em pacientes com médias de sobrevida menores ($6,54 \pm 2,46$ e $4,85 \pm 1,45$ meses, respectivamente) (Figura 23B e C). Enquanto aquelas com expressão aumentada para ambos miRNAs exibiram maior média de sobrevida com $30,85 \pm 12,42$ meses ($P = 0,050$) e $32,57 \pm 11,98$ meses ($P = 0,007$), respectivamente.

A sobrevida das pacientes com menor expressão de *miR-181b* e *miR-181d* (43%) foi de $6,83 \pm 2,53$ e $6,00 \pm 2,59$ meses, respectivamente. Para aquelas com maior expressão (57%), observou-se sobrevida de $27,62 \pm 11,28$ ($P = 0,077$) e $28,25 \pm 11,10$ ($P = 0,031$) meses, respectivamente, (Figura 23D e E).

A sobrevida livre de doença (SLD) foi avaliada para 10 pacientes com LMS. As curvas de Kaplan-Meier descrevem os perfis de expressão dos miRNAs em relação ao tempo de recidiva. Para os miRNAs *let-7f* e *miR-34a*, 70% das pacientes apresentaram menor expressão e menor tempo de recidiva, sendo $4,57 \pm 2,31$ e $4,57 \pm 2,80$ meses para *let-7f* ($P = 0,050$) e *miR-34a* ($P = 0,360$) respectivamente (Figura 24A e C). Já as pacientes com maior expressão (30%) exibiram SLD de $14,66 \pm 5,36$ e $14,66 \pm 3,38$ meses, respectivamente.

O tempo de SLD nas pacientes com maior expressão de *miR-10b* ($P = 0,141$) e *miR-181d* ($P = 0,015$) (40%) foi de $12,50 \pm 3,92$ e $15,25 \pm 3,83$ meses respectivamente (Figura 24B e E), entretanto, esse tempo diminuiu para $4,33 \pm 2,98$ e $2,50 \pm 1,23$ meses (respectivamente) nas pacientes com menor expressão (60%). Apenas para o *mir-181d* foi observada diferença significativa. O *miR-181b* também foi associado a menor tempo da SLD quando menos expresso (50%), com $2,80 \pm 1,46$ meses (Figura 24D), enquanto as pacientes com maior expressão (50%) exibiram um aumento no tempo de sobrevida para $12,40 \pm 4,11$ meses ($P = 0,053$).

De modo geral, nossos resultados indicam que uma menor expressão de *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d* acarretaram em menor tempo de SLD. Na presente casuística, 100% dessas pacientes tiveram recidiva em menos de 25 meses.

Figura 23 – Curvas de sobrevida global (SG) das pacientes com LMS em função do perfil de expressão dos miRNAs avaliados. Em A) *let-7f* ($P = 0,007$), B) *miR-10b* ($P = 0,050$), C) *miR-34a* ($P = 0,007$) o número de óbitos para a hipoexpressão totalizou 7 pacientes e nenhum vivo-censurado. Na hiperexpressão desses miRNAs também foi observado 7 óbitos e nenhum vivo-censurado. O D) *miR-181b* ($P = 0,077$) e E) *miR-181d* ($P = 0,031$) hipoexpressos totalizaram 6 óbitos e nenhum vivo-censurado, enquanto na hiperexpressão observou-se 8 óbitos e nenhum vivo-censurado. O valor de p foi determinado pelo teste *log-rank* que se refere ao perfil da expressão correspondente ($n = 14$, 14 óbitos e nenhum vivo-censurado).

Figura 24 – Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) das pacientes com LMS em função do perfil de expressão dos miRNAs avaliados. Em A) *let-7f* ($P = 0,050$), B) *miR-10b* ($P = 0,141$), C) *miR-34a* ($P = 0,360$), D) *miR-181b* ($P = 0,053$) e E) *miR-181d* ($P = 0,015$). O valor de p foi determinado pelo teste *log-rank* que se refere ao status de expressão correspondente ($n = 10$, 10 recidivas e nenhum censurado – sem recidiva).

Na sequência, uma análise univariada foi realizada tanto para SG (Tabela 23) como para a SLD (Tabela 24). Não obstante, apenas os dados de metástase apresentaram diferenças significativas quanto à SG.

Tabela 23 - Análise univariada para SG em relação à expressão dos miRNAs e as características das pacientes com LMS

Variável	Média ± Erro Padrão	IC 95%	P
Idade 50			
≤ 50	25,00 ± 21,67	0,00 - 67,47	0,755
> 50	16,20 ± 5,72	4,98 - 27,41	
Estadiamento FIGO			
I e II	20,75 ± 7,97	5,11 - 36,38	0,272
III e IV	6,50 ± ,50	0,00 - 17,28	
Grau histológico			
Baixo grau	24,00 ± 22,00	0,00 - 67,12	0,903
Alto grau	16,60 ± 5,61	5,59 - 27,60	
Terapia adjuvante			
Sim	19,08 ± 8,01	0,00 - 41,00	0,858
Não	16,50 ± 12,50	3,37 - 34,79	
Metástase			
Sim	9,25 ± 2,55	4,24 - 14,25	0,017
Não	75,50 ± 14,50	47,08 - 103,92	

IC 95%: Intervalo de confiança 95%.

Tabela 24 - Análise univariada para SLD em relação à expressão dos miRNAs e as características das pacientes com LMS

Variável	Média ± Erro Padrão	IC 95%	P
Idade 50			
<50	8,33 ± 4,33	0,00 – 16,82	0,925
≥ 50	7,28 ± 3,44	0,54 – 14,03	
Estadiamento FIGO			
I e II	6,87 ± 2,57	1,83 – 11,91	0,398
III e IV	10,50 ± 10,50	0,00 – 31,08	
Grau histológico			
Baixo grau	6,00 ± 5,50	0,00 - 16,79	0,314
Alto grau	8,28 ± 3,16	5,59 – 14,48	
Terapia adjuvante			
Sim	8,00 ± 2,88	02,35 – 13,64	0,750
Não	4,00 ± 0,00	4,00 – 4,00	
Metástase			
Sim	7,60 ± 2,60	2,48 – 12,71	-
Não	-	-	

IC 95%: Intervalo de confiança 95%.

Uma pior taxa de sobrevida foi observada para 86% das pacientes que tiveram metástase antes do período de 3 anos – $9,25 \pm 2,55$ meses. Para 14% das pacientes que não apresentaram metástase em até 3 anos pós-cirurgia (Figura 25), a média foi de $75,50 \pm 14,50$ meses ($P = 0,017$). Além disso, 100% das pacientes apresentaram ocorrência de metástase em algum período do tratamento.

Figura 25 - Curva de Kaplan-Meier das pacientes com LMS em função da presença ou ausência de metástase na SG. Total de 12 casos com metástase e 2 casos sem metástase (n = 14; 14 óbitos e nenhum vivo-censurado), determinado com teste *log-rank* (P = 0,017).

Adicionalmente, a análise multivariada foi realizada objetivando uma melhor compreensão quanto a potencial influência do perfil de expressão de *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a* e *miR-181d* na ocorrência de metástases dos LMSs. O modelo de regressão de Cox mostrou que a expressão desses miRNAs não representa um fator prognóstico independente (Tabela 25). Observou-se que as pacientes com menor expressão de *let-7f* podem ter um risco três vezes maior de desenvolver a doença ou tumor (Hazard ratio [HR] = 3,52), em relação as pacientes com maior expressão. Para *miR-10b* e *miR-181d*, uma menor expressão, pode representar um risco quase duas vezes maior de desenvolvimento da doença (HR = 1,92; HR = 2,44, respectivamente). Para *miR-34a*, observou-se um risco de ocorrência do tumor quatro vezes maior nas pacientes com menor expressão (HR = 4,43). Contudo, no modelo de Cox não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com maior ou menor expressão dessa molécula (Tabela 25).

Tabela 25 - Análise multivariada de risco proporcional (modelo Cox) da recidiva, metástase e expressão dos miRNAs avaliados

miRNA	SG		
	Variável	HR (IC 95%)	P
<i>let-7f</i>	Metástase ¹	0,0 (0,00 – 9,13)	0,941
	Condição de expressão ²	3,52 (0,88 – 14,00)	0,073
<i>miR-10b</i>	Metástase ¹	0,0 (0,00 – 4,33)	0,939
	Condição de expressão ²	1,92 (0,548 – 6,74)	0,307
<i>miR-34a</i>	Metástase ¹	0,0 (0,0 – 1,91)	0,939
	Condição de expressão ²	4,43 (0,88 – 22,17)	0,069
<i>miR-181d</i>	Metástase ¹	0,0 (0,00 – 2,07)	0,940
	Condição de expressão ²	2,44 (0,67 – 8,79)	0,171

¹Comparado com pacientes que apresentaram metástase. ²Comparado com a maior expressão. SG: Sobrevida global, HR: Hazard ratio, IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

As pacientes com LMS foram categorizadas quanto a presença (80%) e ausência de metástase (20%) para a avaliação qualitativa das características clínicas e patológicas. A idade e grau histológico não mostraram diferenças significativas, mesmo com 60% das pacientes com metástase apresentando idade acima de 50 anos, assim como tumores com alto grau histológico. Porém, não foram observadas diferenças significativas (Anexo C, Tabela 31). Para as demais variáveis as análises foram comprometidas devido ao número de amostras.

A Tabela 26 mostra o perfil de expressão geral dos miRNAs baseado no *fold regulation* (FR) e quantificação relativa (RQ) nas amostras de pacientes e linhagens celulares para os ensaios de qRT-PCR em *array* e *TaqMan*.

Tabela 26 - Perfil de expressão dos miRNAs em *fold regulation* e quantificação relativa nas amostras de pacientes com LM e LMS uterinos e linhagens celulares

		Amostras de pacientes		Linhagens celulares	
miRNA		LM	LMS	LM	LMS
		FR (RQ)	FR (RQ)	FR (RQ)	FR (RQ)
qRT-PCR em array	<i>let-7f</i>	-5,58 (0,18)	-8,67 (0,12)	2,09 (2,09)	-1,52 (0,66)
	<i>miR-10b</i>	-4,48 (0,22)	-8,94 (0,11)	1,69 (1,69)	-3,07 (0,33)
	<i>miR-34a</i>	3,57 (3,57)	1,11 (1,11)	-	-
	<i>miR-181b</i>	-1,10 (0,91)	2,15 (2,15)	2,13 (2,13)	-2,62 (0,38)
	<i>miR-181d</i>	-1,50 (0,67)	3,15 (3,15)	1,97 (1,97)	-1,41 (0,71)
qRT-PCR em TaqMan	<i>let-7f</i>	-0,35 (0,92)	-1,44 (0,54)	1,16 (2,27)	0,06 (1,06)
	<i>miR-10b</i>	-0,31 (1,04)	-1,38 (0,61)	0,51 (1,43)	-2,87 (0,13)
	<i>miR-34a</i>	2,60 (8,62)	-0,52 (1,96)	2,16 (4,47)	-4,56 (0,04)
	<i>miR-181b</i>	0,71 (2,18)	0,94 (3,18)	1,78 (3,46)	-0,92 (0,52)
	<i>miR-181d</i>	2,16 (5,55)	1,24 (4,00)	2,39 (5,32)	0,83 (1,79)

*Valor de corte estabelecido em +1 e -1. FR: *fold regulation*; RQ: quantificação relativa ou *relative quantification*.

4.4. Análise funcional dos miRNAs selecionados - *miR-34a* e *miR-181b* *in vitro*

Com base nos resultados descritos, dentre os cinco miRNAs avaliados, dois (*miR-34a* e *miR-181b*) foram selecionados para a validação funcional, utilizando cultura de células de LM e LMS. Os experimentos consistiram na manipulação da expressão dessas moléculas *in vitro*, por transfecção com constructos de Mimics e siRNA inventoriados pela *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Alemanha).

Inicialmente, foi verificada a pureza e a condição das células para as três linhagens (MM, LM e LMS) pelo ensaio de autenticação. Os resultados obtidos mostraram 100% de compatibilidade em todos os *locus STR* amplificados (Tabela 27), com a ausência de contaminação cruzada e estabilidade genética das linhagens celulares utilizadas no presente estudo. Em paralelo, também foi

realizado o teste para detecção de contaminação por micoplasmas que resultou negativo para todas as células.

Tabela 27 – Detecção dos alelos nos *locus STR* e amelogenina nas três linhagens celulares utilizadas

<i>Locus STR</i>	MM		LM		LMS	
Marcador	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
AMEL	X		X		X	
CSF1PO	10	12	10	12	10	11
D13S317	11	13	12	13	13	
D16S539	9	11	12	14	13	14
D21S11	31.2	32.2	30	31.2	29	32.2
D5S818	11	12	8		10	11
D7S820	8	9	10		9	10
TH01	8	9	7	8	7	
TPOX	8	9	9	11	8	
vWA	17	19	16	18	15	16

Após as transfecções, as células foram cultivadas e avaliadas quanto a eficiência do Mimic e siRNA na expressão dos miRNAs. Em seguida, foram analisados os efeitos dessa manipulação molecular na capacidade de proliferação, ou seja, crescimento, e migração celular (motilidade), bem como sobre a expressão dos potenciais genes alvos desses dois miRNAs.

A eficiência da transfecção com o Mimic e siRNA, bem como seus efeitos, foi avaliado com base nos seus transcritos para *miR-34a* e *miR-181b* em quatro tempos distintos (24, 48, 72 e 96h) por meio de qRT-PCR.

A transfecção com o 34a Mimic nas células de LM foi altamente eficaz, mostrando um aumento significativo nos níveis de expressão em mais de 2 vezes

em todos os tempos avaliados (24, 48, 72 e 96h), com média de *FR* de 3, 2,56, 2,39 e 2,35 respectivamente, comparados aos CN (EGFP) ($P < 0,002$).

Para o tratamento com 34a siRNA, maior eficiência foi observada após 72h ($P = 0,002$), com a menor média de expressão (*FR*: -2,86). Em 24, 48 e 96h também foi notada a diminuição significativa na expressão do *miR-34a* para -2,10 (para 24 e 48h) e -2,24 (para 96h), em relação ao CN ($P = 0,002$) (Figura 26A).

A manipulação com 34a Mimic no LMS, exibiu um aumento significativo na expressão do *miR-34a* em mais de 6 vezes nos quatro tempos observados, após 24 (*FR*: 11,29; $P = 0,002$), 48 (*FR*: 10,43; $P = 0,002$), 72 (*FR*: 7,88; $P = 0,002$) e 96h (*FR*: 6,49; $P = 0,002$) em comparação ao CN (Figura 26B).

O 34a siRNA apresentou padrões similares nas células de LM e LMS, mostrando maior eficiência na inibição do miRNA no LMS após 48h com *FR* de -3,98 ($P = 0,179$), porém estatisticamente não significativo. Entretanto, observou-se após 24h de tratamento que a expressão foi significativamente reduzida (*FR*: -3,02; $P = 0,026$). Nos demais tempos estabelecidos 72 e 96h, as células tratadas com o siRNA quase não exibiram variações nos seus níveis de expressão (*FR*: -3,75 e -3,39, respectivamente).

No que diz respeito ao *miR-181b*, a transfecção com o Mimic nas células de LM levou ao aumento dos níveis de expressão gradativo ao longo dos tempos de 24, 48 e 72h. Após às 24h de manipulação molecular, observou-se aumento na expressão para *FR*: 1,04 ($P = 0,002$), em 48h para *FR*: 1,44 ($P = 0,004$) e 72h com *FR*: 4,82 ($P = 0,002$), atingindo sua maior expressão em relação ao CN (Figura 26C). Em 96h foi possível observar a diminuição no efeito do Mimic na expressão do miRNA, *FR*: 3,38 ($P = 0,002$). O 181b siRNA exibiu uma maior

capacidade de inibição após 24h com FR: -3,02 ($P = 0,002$). Nos tempos consecutivos o efeito do siRNA diminuiu, elevando significativamente os níveis de expressão do *miR-181b* para FR: -2,24 às 48h ($P = 0,004$), e FR: -2,44 após 72h ($P = 0,002$). Não houve diferenças significativas em 96h (FR: -1,49; $P = 0,064$).

A transfecção com o 181b Mimic nas células de LMS atingiu os mais altos níveis de expressão do miRNA após 24, 48 e 72h com a média de FR de 8, 8,36 e 8,32, respectivamente ($P = 0,002$), em relação ao CN. Embora seja possível observar uma diminuição na expressão em 96h (FR: 6,49; $P = 0,002$), ainda assim, os níveis de expressão se mantêm em mais de 6 vezes quando comparado ao CN, salientando a eficácia da indução da expressão do *miR-181b*.

O tratamento com o 181b siRNA levou as células de LMS ao menor nível de expressão em 48h com FR de -1,98 ($P = 0,002$). Nos demais tempos do ensaio 24, 72 e 96h, foi observada uma pequena variação na expressão, embora significativa (Figura 26D).

Figura 26 – Fold de expressão do *miR-34* e *miR-181b* em células de LM e LMS. A) Expressão relativa do *miR-34a* após a transfecção com 34a Mimic e siRNA em células de LM (* $P < 0,005$). B) Expressão relativa do *miR-34a* após a transfecção com 34a Mimic e siRNA em células de LMS (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,005$). C) Expressão relativa do *miR-181b* após a transfecção com 181b Mimic e siRNA em células de LM (* $P < 0,005$). D) Expressão relativa do *miR-181b* após a transfecção com 181b Mimic e siRNA em células de LMS (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,005$). Os valores estão expressos em FR (fold regulation). As amostras foram normalizadas com o gene endógeno (*miR-320a*) e amostras referência controle celular (CC) – células cultivadas em meio sem tratamento. Teste utilizado Mann-Whitney.

Com base nos resultados de expressão, que confirmaram as eficiências da transfecção com Mimic e siRNA, tanto na indução como na inibição molecular dos miRNAs, iniciou-se o ensaio de avaliação dos seus efeitos na proliferação celular. As duas linhagens foram transfectadas com os Mimics e siRNAs de expressão de cada miRNA (*miR-34a* e *miR-181b*), e em seguida avaliadas nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

Na análise de proliferação celular, após o tratamento do LM com o 34a Mimic, foi constatado a redução no crescimento das culturas em 24 ($P = 0,036$), 48 ($P = 0,066$), 72 ($P = 0,019$), e 96h ($P = 0,043$) pós-tratamento, quando comparado ao CC (Figura 27A). O 34a siRNA reduziu a proliferação significativamente após 48 ($P = 0,048$) e 72h ($P = 0,034$).

Nas células de LMS, o tratamento com 34a Mimic induziu redução significativa da proliferação após 48 ($P = 0,050$), 72 ($P = 0,027$), 96 ($P = 0,042$) e 120h ($P = 0,040$), em relação ao CC (Figura 27B). O siRNA mostrou maior efeito na proliferação após 72h ($P = 0,050$) e 96h ($P = 0,048$) de transfecção.

Os resultados encontrados após o tratamento com 181b Mimic em LM mostrou menor taxa de proliferação celular após 72h ($P = 0,034$), comparados ao CC (Figura 27C). Para o 181b siRNA, notou-se que o menor ponto de proliferação foi após 48h ($P = 0,022$) de tratamento.

As células de LMS apresentaram menor taxa de proliferação às 72h ($P = 0,050$) pós-transfecção com o 181b siRNA (Figura 27D), seguido de um aumento significativo após 96h, em comparação ao CC ($P = 0,034$). Nas demais condições e tempos de tratamento para o LM e LMS não foram observadas diferenças significativas. Além disso, para ambas as linhagens o CN apresentou um crescimento progressivo sem qualquer alteração ao longo do período avaliado.

Figura 27 - Proliferação celular das linhagens de LM e LMS. A) Taxa de proliferação celular após a transfecção com 34a Mimic e siRNA em células de LM. B) Taxa de proliferação celular após a transfecção com 34a Mimic e siRNA em células de LMS. C) Taxa de proliferação celular após a transfecção com 181b Mimic e siRNA em células de LM. D) Taxa de proliferação celular após a transfecção com 181b Mimic e siRNA em células de LMS. CC: Controle celular, CN: Controle negativo, 34a M: Mimic *miR-34a*, 34a si: siRNA *miR-34a*, 181b M: Mimic *miR-181b*, 181b si: siRNA *miR-181b*. Análise de variância com Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (* $P < 0,05$).

Na sequência, objetivou-se verificar os efeitos no comportamento migratório das células (comportamento ou característica associada a capacidade metastática), para isso foram realizados os ensaios de migração celular (*scratch* ou *wound healing*). Após as transfecções com os Mimics e siRNAs do *miR-34a* e *miR-181b*, foram avaliadas as áreas migradas pelas células nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96h.

As células de LM transfectadas com 34a Mimic mostraram redução na área migrada em 24 ($P = 0,006$), 48 ($P = 0,018$), 72 ($P = 0,019$) e 96h ($P = 0,031$)

de 18, 30, 38 e 59% respectivamente, quando comparadas ao CN (Figura 28A e C), em 48h também foi possível observar a redução significativa em relação CC. As células tratadas com 34a siRNA apresentaram uma área migrada significativamente menor após 24h (23%) e 72h (58%), em comparação ao CN ($P = 0,010$ e $P = 0,013$, respectivamente). Foi possível constatar também uma diferença na migração após 72h em relação ao CC.

A área migrada pelas células de LMS transfectadas com 34a Mimic e 34a siRNA, apresentaram aumento gradativo ao longo do período de avaliação (0, 24, 48, 72 e 96h). Porém, uma diminuição significativa da área migrada foi observada em 48, 72 e 96h, para ambos os tratamentos em comparação ao CC. O tratamento com 34a Mimic diminuiu a migração celular em 20 ($P = 0,026$), 29 ($P = 0,027$) e 53% ($P = 0,032$) da área delimitada, respectivamente. Para o siRNA o percentual da área migrada foi reduzido em 33 ($P = 0,049$), 36 ($P = 0,043$) e 60% ($P = 0,032$), respectivamente (Figura 28B e C).

Quanto ao tratamento com 181b Mimic e siRNA observou-se que as células de LM apresentaram menor capacidade de migração quando transfectadas com 181b siRNA após 48 e 72h (Figura 29A e C). A área migrada após 48h foi de 29%, em relação CC ($P = 0,018$). Após 72h, essa mesma área apresentou 49% de migração, quando comparada ao CC e CN ($P = 0,013$). Nas células de LMS, observou-se menor capacidade de migração após 48, 72 e 96h dos tratamentos (Figura 29B e C). As células transfectadas com 181b Mimic mostraram apenas 23 ($P = 0,027$), 37 ($P = 0,027$) e 73% ($P = 0,031$) da área delimitada migrada, quando comparadas ao CC. Para 181b siRNA, observou-se a redução da área migrada em 29 ($P = 0,043$) e 46% ($P = 0,037$), após 48 e 72h respectivamente.

Figura 28 - Ensaio de migração com as células transfectadas para *miR-34a*. A) Células de LM transfectadas com 34a Mimic e siRNA. B) Células de LMS transfectadas com 34a Mimic e siRNA. C) Fotomicrografias representativas das células de LM e LMS após 0 e 72h de transfecção. A linha tracejada representa a delimitação do risco feito com a ponteira (aumento de 10X). Análise de variância com Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (* $P < 0,05$).

Figura 29 - Ensaio de migração com células transfectadas para *miR-181b*. A) Células de LM transfectadas com 181b Mimic e siRNA. B) Células de LMS transfectadas com 181b Mimic e siRNA. C) Fotomicrografias representativa das células de LM e LMS transfectadas em 0 e 72h. A linha tracejada representa a delimitação do risco feito com a ponteira (aumento de 10X). Análise de variância com Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (* $P < 0,05$).

4.5. Análises *in silico* dos miRNAs selecionados e seleção de potenciais alvos

Após as análises *in vitro*, e com base nos dados disponíveis, foram analisadas as estruturas moleculares (Figura 30) e as redes de interações genéticas e epigenéticas de *miR-34a* e *miR-181b* (Figuras 31 e 32). Essa etapa do estudo indicou a modulação de potenciais genes alvos importantes, bem como suas interações com outros miRNAs.

FONTE: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (modificado).

Figura 30 - Estrutura molecular do *miR-34a* e *miR-181b*. A) Pre-miRNA *hairpin* do *miR-34a* e sua sequência madura (vermelho) região ligante dos genes alvo: 22| UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU |43. B) Pre-miRNA *hairpin* do *miR-181b* em destaque a sua sequência madura (vermelho), região ligante de genes alvo: 36| AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU |58.

A rede de interações do *miR-34a* mostrou sua potencial ação na regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular (*CCND1* ou *BCL1*), apoptose (*BCL2*) e ainda de genes supressores de tumor (*TP53*) (de acordo com o *Mirtarbase* e *miRTargetLink Human*) (Figura 31A e B). Entretanto, a análise realizada pelo *miRTargetLink Human* revelou forte evidência de que *miR-34a* pode exercer influência sobre o gene *MDM4* (que regula a expressão de *TP53*) e sua possível interação direta com o *TP53* (Figura 31B). Além dessas

interações, foram encontradas relações fortes entre o *miR-34a* e os genes *VEGFA*, *HMGA2* e *CDKN2A* (*p16*).

A

B

FONTE: Hamberg et al., 2016; <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (modificado).

Figura 31 - Rede de interações do *miR-34a*. A) As linhas em azul escuro mostram fortes evidências de interações comprovadas por ensaios de *reporter assay*, *Western blot* e qRT-PCR. As linhas em azul claro indicam outras evidências mais fracas. B) As linhas verde escuro indicam fortes evidências de interação com os genes *BCL2*, *MDM4* e

CCND1. A linha azul claro indica uma possível interação com fracas evidências com o gene *TP53*.

O *miR-181b* mostrou interação forte com o *BCL2* (intimamente relacionado ao processo apoptose), *TIMP3* (responsável pela degradação da matriz extracelular) e *IGF1R* (gene receptor de insulina que quando aumentado pode ter ação anti-apoptótica) (Figura 32A e B). Embora as evidências disponíveis sejam fracas, esse miRNA parece modular *PTEN*, *ESR1* e *FGFR1* (genes relacionados com supressão tumoral, receptor hormonal, mitogênese e receptor de fator de crescimento, respectivamente).

O próximo passo foi selecionar, com base nesses achados, os potenciais genes alvo para uma análise preliminar dos efeitos da manipulação molecular de seus reguladores nos seus perfis de expressão gênica. Para o *miR-34a*, foram selecionados: *CCND1*, *MDM4*, *TP53* e *BCL2*. Para o *miR-181b*, foram selecionados: *TIMP3*, *FGFR1*, *ESR1* e *BCL2*. Esses experimentos foram realizados visando elucidar possíveis interações dos miRNAs na expressão genética de seus genes alvos em LMS.

Os miRNAs são reguladores pós-transcricionais negativos. Assim, o perfil de expressão genética dos potenciais genes alvos do *miR-34a* e *miR-181b* foram avaliados em quatro tempos diferentes, 24, 48, 72 e 96h nas células de LM e LMS. Os diferentes tempos foram testados por se tratar de manipulação molecular onde os efeitos das transfecções com os Mimics e siRNAs podem apresentar atividade pontual na regulação da expressão gênica.

FONTE: Hamberg et al., 2016; <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (modificado).

Figura 32 - Rede de interações do *miR-181b*. A) As linhas em azul escuro mostram fortes evidências de interações comprovadas por ensaios de *reporter assay*, *Western blot* e qRT-PCR. As linhas em azul claro indicam outras evidências mais fracas. B) As linhas verde escuro indicam fortes evidências de interação com os genes *BCL2* e *TIMP3*. A linha azul claro indica uma possível interação com fracas evidências com o gene *FGFR1* e em laranja um forte preditor (*ESR1*).

A expressão dos genes preditos como regulados pelo *miR-34a* estão descritos na Figura 33. Na análise observacional, o *CCND1* apresentou maior expressão nas células de LM após 24h da transfecção com 34a Mimic (FR:1,42) e siRNA (FR:0,96). A expressão do gene quase não sofreu alterações nos demais tempos avaliados. A menor expressão do *CCND1* foi observada no CN em 72 e 96h.

O 34a Mimic parece diminuir a expressão do *CCND1* de forma gradativa no LMS, sendo sua maior expressão em 24h (FR: 1,06) após a transfecção. Um perfil semelhante foi observado no CN. Por outro lado, nas células transfectadas com o 34a siRNA o *CCND1* apresentou maior expressão em 24 e 48h (FR: 1,99 e 4,55 respectivamente), sendo em 48h a maior expressão, momento esse em que o 34a siRNA parece exercer maior efeito no miRNA (Figura 33A e B). Uma diminuição na expressão foi observada nos demais tempos do tratamento.

Nas células de LM, o *MDM4* mostrou aumento na expressão em 48, 72 e 96h de tratamento com o 34a Mimic, indicando que o Mimic aparentemente não exerce ação sobre a sua regulação. Em contraposição, o 34a siRNA supostamente induziu a expressão de *MDM4* em 72 e 96h de tratamento (FR: 0,65 e 0,71 respectivamente), a maior inibição do miRNA também foi observada nesses pontos (Figura 33C). A menor expressão foi notada no CN nas células de LM.

A redução gradativa na expressão do *MDM4* foi observada nas células de LMS transfectadas com 34a Mimic, o nível mais alto de expressão foi em 24h (Figura 33D). Uma semelhança no perfil de expressão do CN foi observada. A regulação positiva também foi identificada nas células transfectadas com o 34a

siRNA, que aparentemente, induziu o aumento na expressão do *MDM4* após 48h (FR: 3,38).

Na avaliação do *TP53* nas células de LM transfectadas com o 34a Mimic, observou-se a maior expressão em 24h (FR: 0,49) em relação aos demais tempos. A menor expressão do *TP53* foi identificada para o tratamento com o 34a siRNA. Os efeitos de inibição do miRNA parecem não atuar diretamente na expressão desse gene no LM (Figura 33E). A menor expressão do *TP53* foi também observada no CN ao longo dos tempos avaliados.

Ao que tudo indica, a manipulação molecular do *miR-34a* nas células LMS parece exercer efeitos diretos na expressão do *TP53*. Observou-se, que o 34a Mimic aparentemente diminuiu a expressão do *TP53* após 72h (FR: -0,44) de tratamento. O efeito do 34a siRNA foi observado em 48h, com o aumento da expressão do *TP53* em quase 4 vezes (Figura 33F). O *TP53* apresentou um menor perfil de expressão no CN.

O gene *BCL2* foi selecionado para a análise de expressão genética apenas nas células de LMS. Ao avaliarmos a expressão desse gene, após a transfecção com 34a Mimic, foi possível notar uma pequena variação nos seus níveis de expressão ao longo do tratamento. Na transfecção com o 34a siRNA, o *BCL2* mostrou aumento na expressão de quase 2 vezes (FR:1,80) após 24h e de aproximadamente 5 vezes (FR: 3,61) após 48h de tratamento. A diminuição da sua expressão foi observada em 72 e 96h (FR: 1,46 e -0,24 respectivamente), sugerindo a possível ação da manipulação molecular (Figura 33G).

Figura 33 - Perfil de expressão dos genes alvos do *miR-34a* após a manipulação molecular. A-B) Expressão de *CCND1* em células de LM e LMS. C-D) Expressão de *MDM4* em células de LM e LMS. E-F) Expressão de *TP53* em células de LM e LMS. G) Expressão de *BCL2* em células de LMS. As amostras foram normalizadas com o gene

endógeno (*B2M*) e amostras referência controle celular (CC) – células cultivadas em meio sem tratamento. Teste utilizado Mann-Whitney.

Posteriormente, foi realizada a análise observacional dos efeitos dos tratamentos com o 181b Mimic e siRNA nas expressões de seus potenciais genes alvos. Nas células de LM transfectadas com o Mimic, o *TIMP3* apresentou menor expressão em todos os tempos avaliados, seu menor nível de expressão foi em 48h (FR: -1,02). No tratamento com 181b siRNA, a menor expressão desse gene foi identificada também em 48h (FR: -0,77) (Figura 34A). Embora as células tratadas com o Mimic e siRNA tenham apresentado pequenas variações na expressão *TIMP3*, o CN mostrou uma menor expressão durante o tempo avaliado.

Assim como para o LM, as células de LMS também exibiram menor expressão de *TIMP3* 48h (FR: -0,67) com o 181b Mimic (Figura 34B) e siRNA (FR: -0,60). Algumas pequenas variações nos níveis de expressão do *TIMP3* foram observadas para ambos os tratamentos no tempo avaliado. O CN também apresentou variações na regulação da expressão genética.

O gene *FGFR1* não apresentou grandes variações na expressão nas células de LM tratadas com o 181b Mimic. Um perfil de expressão muito semelhante foi observado para o tratamento com o 181b siRNA (Figura 34C). O *FGFR1* apresentou uma menor expressão de quase 6 vezes no CN, em relação ao Mimic e siRNA.

No LMS, o *FGFR1* exibiu seu maior nível de expressão após 24h para ambos os tratamentos (Mimic FR: 0,46 e siRNA FR: 0,62). Porém, uma menor expressão foi notada nas células tratadas com o Mimic e no CN em 96h (FR: -0,51 e FR: -0,48) (Figura 34D).

Frente a expressão *ESR1*, um aumento gradual nos níveis de expressão foi observado até 72h, tanto para as células de LM tratadas com 181b Mimic como para o 181b siRNA (Figura 34E). A inibição da expressão do *miR-181b* parece aumentar a expressão de *ESR1* ao longo do tratamento, diminuindo após 96h (FR: 0,20) quando se observa aumento na expressão do miRNA.

Foram observadas variações na expressão do *ESR1* nas células de LMS tratadas com o 181b Mimic, onde sua menor expressão ocorreu em 24h (FR: -1,35) e 96h (FR: -0,98) após o tratamento. As células transfectadas com o 181b siRNA apresentaram menores níveis de expressão do *ESR1* em 72h (FR: -0,66) e 96h (FR: -1,30), indicando uma possível regulação negativa mediada por *miR-181b* nos LMS (Figura 34F). Além disso, o CN também mostrou uma menor expressão em 72h (FR: -1,91) e maior expressão em 96h (FR:1,37).

Como mostrado anteriormente, o gene *BCL2* também pode ser regulado pelo *miR-181b*, além do *miR-34a*. Semelhantemente ao descrito para *miR-34a*, *BCL2* foi analisado apenas nas células de LMS. Seu perfil expressão mostrou aumento gradativo nas células transfectadas com o 181b Mimic e a maior expressão foi observada 72h (FR:1,85) após o tratamento. O efeito da manipulação molecular com 181b Mimic parece não afetar diretamente os níveis do *BCL2*. No tratamento com 181b siRNA, o perfil de expressão maior se mantém ao longo dos tempos avaliados e a sua maior expressão foi identificada após 72h (FR:1,09) (Figura 34G).

Figura 34 - Perfil de expressão dos genes alvos do *miR-181b* após a manipulação molecular. A-B) Expressão de *TIMP3* em células de LM e LMS. C-D) Expressão de *FGFR1* em células de LM e LMS. E-F) Expressão de *ESR1* em células de LM. G) Expressão de *BCL2* em células de LMS. As amostras foram normalizadas com o gene

endógeno (*B2M*) e amostras referência controle celular (CC) – células cultivadas em meio sem tratamento. Teste utilizado Mann-Whitney.

Notou-se, que o tratamento com siRNA aparentemente exerce um efeito regulatório inverso na expressão do *BCL2*, conforme os níveis de expressão do miRNA. No entanto, o CN mostrou um perfil de expressão do *BCL2* muito semelhante ao observado nas células tratadas com o Mimic.

Embora todos os experimentos tenham sido realizados, ao menos, em duplicata, não houve tempo hábil para realização da réplica experimental. Desse modo, esses resultados são preliminares e necessitam ser confirmados. Houve uma série de contra-tempos que inviabilizaram a realização dessas replicatas, fato que pode justificar a ausência de significância estatística.

5. DISCUSSÃO

As análises das características clínicas e anatomopatológicas das pacientes incluídas nesse estudo, demonstraram a ocorrência do LMS primários em mulheres de idade mais avançada, em comparação às pacientes com LM. Nossos dados corroboram a literatura em que os LMS geralmente se desenvolvem em mulheres na perimenopausa, com idade acima de 40 anos, e sua incidência aumenta significativamente na menopausa (Miyata et al., 2015; Haak et al., 2019; Meng et al., 2020). Beyan et al. (2019), encontraram uma média de idade de 46,5 anos nas pacientes com LMS. A idade é comumente considerada como um fator independente para o LMS (Meng et al., 2020). Contudo, o processo de envelhecimento está relacionado a características como instabilidade genômica, atrito telomérico, alterações epigenéticas, perda de proteostase (homeostase proteica), desequilíbrio nutricional, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (López-Otín et al., 2013; De Almeida et al., 2019).

Oitenta por cento das pacientes com LMS, em nossa caústica, não utilizou nenhum tipo contraceptivos e 87% não realizou terapia de reposição hormonal. As condições hormonais, como o uso do contraceptivo, parecem não exercer efeitos no desenvolvimento do LMS (Kobayashi, 2013).

Setenta e três por cento das pacientes apresentaram metástase à distância, principalmente para os pulmões, ossos e fígado e 87% delas foram a óbito. Vários estudos estabelecem que os principais sítios de metástase encontrados nas pacientes com LMS, são os pulmões, seguido pelo peritônio,

fígado, ossos longos e vertebrais (Loizzi et al., 2011; Tirumani et al., 2014; Rizzo et al., 2020). Segundo Paik et al. (2015, 2019), pacientes com LMS metastáticos são elegíveis para ressecção cirúrgica da metástase, principalmente no que diz respeito a metástase pulmonar. Pacientes submetidas a metastasectomia pulmonar apresentaram melhores resultados de sobrevida após o tratamento (Paik et al., 2015, 2019).

A identificação e caracterização de miRNAs diferencialmente expressos nos tumores mesenquimais uterinos, tem sido importante foco de estudo do nosso grupo. Esses estudos visam fornecer o embasamento necessário para o entendimento das vias de transformações divergentes do tecido normal que podem levar ao surgimento dos LM e LMS. Em estudos prévios, foi avaliado o perfil de expressão de centenas de miRNAs potencialmente relacionados ao surgimento de cânceres nos diferentes tumores mesenquimais uterinos (De Almeida et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018; Schiavon et al., 2019). Como descrito em capítulos anteriores, vários miRNAs foram identificados com expressão diferencial entre os LM e LMS, utilizando como referencia o MM normal. Dentre eles, 5 miRNAs (*let-7f*, *miR-10b*, *miR34a*, *miR-181b* e *miR-181d*) foram selecionados para a validação do seu perfil de expressão basal nesses tumores (em pacientes e linhagens celulares), para manipulação molecular, e também quanto a sua associação com aspectos clínicos e anatomopatológico das pacientes.

Inicialmente, menor expressão de *let-7f*, *miR-10b* e *miR-34a* foi encontrada nas amostras de pacientes com LMS (comparado aos LM), enquanto *miR-181b* e *miR-181d* apresentaram maior expressão nessas. No entanto, a validação da expressão dessas moléculas mostrou *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a* e

miR-181b com menor expressão nos LMS, utilizando o MM como referência. Esses dados indicaram um possível papel desses miRNAs como supressores nos tumores mesenquimais (Zhang et al., 2007; Svoronos et al., 2016; Ji et al., 2017; Ankasha et al., 2018). Por outro lado, a maior expressão de *miR-181b* e *miR-181d* nos LMS, sugeriram seu potencial oncogênico nesses tumores.

Nas linhagens celulares, uma maior expressão foi observada para todos os miRNAs avaliados, tanto no *screening* gênico quanto na validação, nas células de LM. *miR-34a* e *miR-181d* apresentaram os níveis mais altos de expressão quando comparados com os demais miRNAs. Os resultados para *miR-10b*, *miR-34a* e *miR-181d*, nas amostras de pacientes com LMS, foram os mais semelhantes aos encontrados *in vitro*. As diferenças de expressão entre o tumor benigno (LM) e maligno (LMS) podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de malignização das células tumorais, uma vez que as diferenças foram evidentes. Na literatura, esses miRNAs têm ganhado notoriedade por exercerem funções importantes nos processos celulares, pela regulação pós-transcricional de genes envolvidos em vias de sinalizações que podem levar à patogênese tumoral em diferentes tipos de cânceres (Adams et al., 2014; Berindan-Neagoe et al., 2014; Condrat et al., 2020).

A perda de expressão de *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a* e *miR-181b* já foi avaliada em diferentes tipos de tumores, incluindo os ginecológicos (Berindan-Neagoe et al., 2014; Dos Anjos et al., 2018; Yu et al., 2018; Condrat et al., 2020). Não obstante, a expressão aumentada de *miR-181d* também tem sido muito estudada, principalmente em cânceres de mama.

miR-181b e *miR-181d* estão bem caracterizados na literatura como oncomirs devido a sua expressão aumentada em cânceres de mama (Zheng et

al., 2016; Strotbek et al., 2017; Andalib et al., 2020; Fahim et al., 2020). Esse aumento de expressão está associado a proliferação celular, metástase e progressão de neoplasias mamárias (Zheng et al., 2016; Andalib et al., 2020). Embora a regulação positiva do *miR-181d* possa estar relacionada com a progressão da doença e metástase em câncer mama, em nosso estudo observamos sua maior expressão associada a uma significativa melhora na taxa de sobrevida das pacientes, com um aumento de aproximadamente 70% na SG.

No estudo de Rossi et al. (2010), em leucemia linfocítica crônica, pacientes com menor expressão de *miR-181b* apresentaram pior prognóstico. Os baixos níveis de expressão podem estar relacionados com a resposta à terapia, tornando esse miRNA um potencial preditor para a taxa de sobrevivência livre de tratamento (Rossi et al., 2010; Berindan-Neagoe et al., 2014). Em osteosarcoma, a perda da expressão de *miR-181d* foi um fator prognóstico significativo, acarretando em pior SG das pacientes (Chen et al., 2018). Nossos resultados mostram sinergia com os achados de Rossi et al. (2010) e Chen et al. (2018), em que a perda de expressão do *miR-181b* foi associada à menor SG, mesmo mostrando apenas tendência à significância, possivelmente devido ao número de amostras.

Embora pertençam à mesma família, *miR-181b* e *181d* apresentaram perfis diferentes de expressão em estudo retrospectivo realizado por Dos Anjos et al. (2018), utilizando 82 amostras de sarcomas uterino (e sendo os LMS tumores primários). A expressão reduzida de *miR-181b* foi observada no sarcoma de estroma endometrial, carcinosarcoma e LMS, enquanto seu aumento foi encontrado no adenosarcoma. Não foram observadas associações entre sua expressão e fatores prognósticos (Dos Anjos et al., 2018). Conquanto

nossa coorte seja menor que a utilizada pelos autores, os níveis de expressão encontrados no LMS corroboram esses achados.

Quanto a expressão reduzida de *miR-10b* encontrada em nosso estudo, a literatura mostra que essa menor expressão já foi observada em outros tumores ginecológicos, como nos cânceres do colo do útero e de mama. Zou et al. (2016) e Yu et al. (2018) observaram uma expressão significativamente menor do *miR-10b* em câncer do colo do útero. A regulação negativa desse miRNA foi associada a um fenótipo tumoral mais agressivo, além de estar associada com tumores maiores e com invasão vascular (Zou et al., 2016; Yu et al., 2018). A perda de expressão também foi associada ao tumor maligno em nosso estudo, uma vez que sua expressão nos LM foi maior, em relação ao LMS. Iorio et al. (2005) avaliaram 76 amostras de pacientes e 14 tipos diferentes de células de câncer de mama. Os autores avaliaram 245 miRNAs de humanos e camundongo, dos quais 15 miRNAs foram capazes de prever corretamente a natureza da amostra analisada (tumor ou tecido mamário normal), com 100% de precisão. Dentre os miRNAs diferencialmente expressos, *miR-10b* emergiu como um dos mais sistematicamente desregulados em câncer de mama, com regulação negativa (Iorio et al., 2005). A avaliação do seu perfil de expressão e de seu valor prognóstico nesse tumor, mostrou correlação entre uma menor expressão do *miR-10b* e um pior desfecho para as pacientes (Wang et al., 2019). Seu papel é ambíguo, em que se observa sua regulação negativa em células tumorais primárias e, em seguida, sua expressão aumentada no tumor metastático, correspondendo à progressão clínica da doença (Bertoli et al., 2015; Zhang et al., 2018; Meerson et al., 2019). Outros estudos também têm

evidenciado que o *miR-10b* pode apresentar maior expressão em câncer de mama (Bertoli et al., 2015; Khalighfard et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Na meta-análise de Zhang et al. (2017), foram avaliados nove estudos, que incluíram cânceres de mama, pulmão, gástrico, colorretal e carcinoma hepatocelular. Os resultados demonstraram que pacientes com alta expressão de *miR-10b* no tumor apresentavam maior propensão a desenvolver metástase linfonodal regional e maior risco de metástase à distância. O silenciamento do *miR-10b*, tanto *in vitro* como *in vivo*, induziu aumento da expressão do *HOXD10* que consequentemente inibiu a ocorrência de metástases. Assim, os autores concluíram que a expressão elevada de *miR-10b* está intimamente relacionada a um comportamento mais agressivo de células tumorais (Zhang et al., 2017). A menor expressão do *miR-10a* e *miR-10b*, também foi observada em sarcoma de estroma endometrial, adenosarcoma, carcinosarcoma e LMS. Porém, apenas a perda de expressão do *miR-10a* teve associação com menores taxas de SCE nas pacientes com LMS (Dos Anjos et al., 2018). Em nossos achados, uma maior expressão desse miRNA pode ser considerada um fator de prognóstico favorável, uma vez que as pacientes com maior expressão apresentaram melhor taxa de SG.

A menor expressão do *miR-34a* foi identificada em diferentes tumores, incluindo mama, ovário, colo do útero e sarcomas uterino. Wang et al. (2017) observaram sua perda de expressão em 8 tipos de linhagens celulares de cânceres de mama. Os níveis de expressão foram inversamente correlacionados com malignidade nesses tumores (Wang et al., 2017).

A avaliação do perfil de expressão do *miR-34a* em 228 mulheres com câncer de ovário, também encontrou sua expressão significativamente diminuída

em relação ao epitélio normal, e a expressão encontrada no carcinoma espinocelular de ovário tipo II foi menor que no I (Schmid et al., 2016; Welponer et al., 2020). A menor expressão do *miR-34a* pode estar envolvida nos processos de metástase e progressão tumoral do câncer de colo uterino, por meio da regulação do *BCL2* e *MET* (Chen et al., 2017). Sua perda de expressão pode ser considerada um fator de pior prognóstico por estar associada a resistência à quimioterapia, à disseminação, aos estágios avançados da doença e menor sobrevida (Chen et al., 2017; Condrat et al., 2020).

Nos tumores uterinos, Dos Anjos et al. (2018) também observaram uma menor expressão do *miR-34a* nos carcinosarcomas, enquanto nos adenosarcomas sua expressão foi maior. No sarcoma de estroma endometrial e LMS, os autores observaram um pequeno aumento na expressão (RQ: 1,11), corroborando nossos resultados para as pacientes com LMS (RQ: 1,96). Quanto aos fatores prognósticos, apenas o tabagismo mostrou associação com sua maior expressão (Dos Anjos et al., 2018). Schiavon et al. (2019), verificaram uma menor expressão desse miRNA não apenas nos LMS, mas também nos LM e LM não-convencionais, sugerindo que a supressão da sua expressão pode desempenhar um papel na tumorigênese envolvendo eventos de metástase. Sua menor expressão foi diretamente associada a pior SG em nossas análises, já que as pacientes com regulação negativa foram a óbito em pouco mais de 10 meses após o diagnóstico.

Os miRNAs mais estudados e bem descritos na literatura até o momento são os da família *let-7*, por apresentarem relevância em vários mecanismos fisiológicos (De Almeida et al., 2019). Nos LM, essa família apresenta uma assinatura homogênea e específica quando comparado ao MM adjacente, com

expressão significativamente aumentada (Wang et al., 2007; Yang et al., 2016). Os padrões distintos de expressão dessas moléculas em amostras de LM, fazem deles marcadores que podem distinguir sarcomas uterinos e tumores mesenquimais epiteliais mistos de um fibróide, no qual são comumente regulados positivamente (Kowalewska et al., 2013).

Em 2019, a expressão dessa família de miRNAs foi avaliada por nosso grupo em 34 amostras de LMS (De Almeida et al., 2019). Foi encontrada associação entre a menor expressão de *let-7f* e fatores clínicos e anatomopatológicos (De Almeida et al., 2017; Dos Anjos et al., 2018). Dos Anjos et al. (2018) observaram menores níveis de sua expressão não apenas no LMS, mas também em sarcoma do estroma endometrial, adenosarcoma e carcinosarcoma. A associação de sua expressão com grau histológico foi observada no LMS. Essa molécula ainda apresentou associação da expressão com a idade das pacientes com LMS (De Almeida et al., 2019). No presente estudo, também verificamos uma menor expressão desse miRNA em relação ao LM, essa comparação não foi realizada nos estudos anteriores.

Kowalewska et al. (2013), avaliaram a expressão de alguns membros da família *let-7* em 29 amostras sarcomas uterinos incluindo, 8 LMS, 11 tumores epiteliais e mesenquimais mistos (carcinosarcoma e adenosarcoma) e 10 sarcomas endometriais, sendo os LMS amostras de tumores recorrentes e apenas uma de tumor primário. A menor expressão do *let-7f* foi identificada apenas no sarcoma endometrial comparado com o controle, o que diverge dos nossos resultados. No estudo publicado por Dong et al. (2016), *let-7f* foi encontrado negativamente regulado em células de câncer endometrial invasivo (Dong et al., 2016). Em células de câncer de ovário, sua menor expressão foi

identificada nas células com alta capacidade de invasão e metástase, endossando a suposição que o *let-7f* pode desempenhar a função de supressor de invasão e metástase nesse câncer (Chen et al., 2019; Condrat et al., 2020). Sua menor expressão foi inversamente associada a uma série de seus alvos. Seu papel na regulação da resposta imune por A20 (TNFAIP3) também foi apontado (Kumar et al., 2015; Gilles et al., 2018; Jiang, 2018) e está diretamente associado com o aumento da atividade de NF- κ B (Kumar et al., 2015; Gilles et al., 2018). Outro fato interessante é a relação entre o os membros da família *let-7* com o gene *MYC*, que apesar de ser um alvo do *let-7* também pode reprimir a transcrição dos *let-7* durante a tumorigenese por se ligar diretamente aos promotores de *let-7a* / *let-7f* / *let-7d* (Lee et al., 2016).

Por outro lado, uma maior expressão do *let-7f* foi observada em células com indução prematura da senescência. Outrossim, sua regulação positiva também foi encontrada durante a senescência replicativa de células-tronco mesenquimais (Boyerinas et al., 2010).

A caracterização da diminuição frequente da expressão desse miRNA em amostras tumorais, apoia a idéia de que essa molécula é supressora de tumor que influencia na sobrevida (Kowalewska et al., 2013). Além disso, sua expressão diferencial em sarcoma de estroma endometrial de alto grau mostrou correlação com SCE e SG, sendo sua perda de expressão um fator de pior prognóstico (Dos Anjos et al., 2018). Nossos resultados mostraram que mulheres com menor expressão de *let-7f* tiveram sobrevida significativamente menor, sendo que todas vieram a óbito em menos de 20 meses, ou seja, as pacientes apresentaram uma redução na SG de aproximadamente 70%.

A avaliação da SLD indicou que as pacientes com menor expressão para três miRNAs (*let-7f*, *miR-181b* e *miR-181d*), dentre as cinco moléculas analisadas, apresentaram recidiva em um período de tempo significativamente menor quando comparadas as pacientes com maior expressão. Para *miR-181b* e *miR-181d*, em menos de 10 meses as mulheres desenvolveram a recidiva, mostrando uma redução de aproximadamente 50% no tempo de SLD, enquanto que para *let-7f* as pacientes recidivaram após 15 meses. *let-7f*, *miR-181b* e *miR-181d*, quando apresentam maior expressão, parecem proporcionar um tempo de recidiva maior em 2 anos para o LMS. Segundo Loizzi et al. (2011), a recorrência é uma das questões mais controversas, sendo na literatura o tempo médio de recorrência de 24 meses. Sem considerar qualquer outro fator que possa influenciar a sobrevida das pacientes, esses autores encontraram que 14 pacientes recidivaram após 21 meses, com uma mediana de SG de 34 meses (Loizzi et al., 2011). Em um estudo globalizado de sarcomas de tecidos moles do *Cancer Genome Atlas*, o *miR-181b* foi significativamente associado com SLD, sendo que altos níveis dessa molécula são mais comuns em LMS uterino que no LMS de partes moles. No modelo de análise multivariada, esse miRNA se mostrou um preditor independente da SLD (Abeshouse et al., 2017; Tsuyoshi et al., 2018). As taxas de recidivas em LMS são altas, e são estimadas em 53 a 71% (Gockley et al., 2014; Mbatani et al., 2018; Singh et al., 2020).

Nas nossas análises de sobrevida univariada, utilizando curvas de Kaplan-Meier, para os fatores clínicos e anatomopatológicos, apenas a metástase foi associada com SG em pacientes com LMS. Ainda, na análise multivariada no modelo de regressão de Cox, os fatores como a expressão dos miRNAs, *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181d* e metástase foram identificados

como fatores de prognósticos não-independentes. A taxa de sobrevida pode ter sido afetada por muitas variáveis, e poucos estudos em LMS conseguem incorporar todos os fatores prognósticos para prever a probabilidade de sobrevida dessas pacientes (Meng et al., 2020).

Dois estudos, utilizando a base de dados SEER para construção e validação de nomogramas para prever o prognóstico do LMS, foram recentemente publicados (Lu et al., 2020b; Meng et al., 2020). Lu et al. (2020b) avaliaram uma coorte de 1898 pacientes de localizações geográficas diferentes. Foram observados nove fatores prognósticos associados com a sobrevida global das pacientes, em análise univariada. No entanto, na regressão de Cox, apenas a idade ao diagnóstico, tamanho tumoral, estadiamento conforme o SEER, a realização ou não da cirurgia e radiação se mostraram fatores prognósticos independentes. Em contrapartida, Meng et al. (2020), que avaliaram 1448 mulheres também da base de dados SEER, relataram que dentre os fatores preditores associados a SG e SCE, estão a idade, estágio da doença, grau histológico, tamanho tumoral e tipo de cirurgia. A etnia e quimioterapia foram associadas apenas com SG. A base de dados não disponibiliza informações como índice mitótico, invasão vascular e marcadores biológicos como TP53, p16, Ki67 e BCL2 que podem ser potenciais indicadores de prognóstico (Lu et al., 2020b; Meng et al., 2020).

Os padrões de expressão de miRNAs proporcionam informações úteis para a classificação e prognóstico de tumores. Entretanto, a expressão dessas moléculas pode ser, em muitos casos, altamente específica para o tipo de tecido ou célula. Os resultados de estudos de expressão devem ser interpretados com cautela, uma vez que a aparente desregulação de miRNAs em células tumorais

pode ser uma manifestação de populações de células distintas, representadas em tumores *versus* tecido normal. Deste modo, destaca-se a importância da caracterização *in vitro* e / ou *in vivo* avaliando ganho e perda de função do miRNA no comportamento das células tumorais, levando em consideração que os miRNAs parecem influenciar significativamente a carcinogênese (Mendell et al., 2013).

Até o presente momento, poucos relatos foram encontrados na literatura identificando mais especificamente a expressão dos miRNAs estudados em LM, ou ainda comparando a expressão e os efeitos dessas moléculas entre LM e LMS. Assim, com base nos resultados obtidos e discutidos até o momento, *miR-34a* e *miR-181b* foram selecionados para continuidade desse trabalho, visando avaliarmos os efeitos de sua manipulação molecular (indução e inibição da expressão gênica) no LM e LMS *in vitro*.

Em nossos ensaios, a indução da expressão do *miR-34a*, em ambas as células, foi altamente eficaz e, conseqüentemente, levou à significativa inibição da proliferação e migração das linhagens celulares. É importante destacar, que inicialmente as células de LM já apresentavam expressão positiva e a indução com o Mimic potencializou essa expressão. Li et al. (2013) avaliaram 5 linhagens celulares de tumores mamários e 14 amostras de pacientes. Após serem transfectadas com *miR-34a* Mimic, foi observada a diminuição do crescimento celular e migração, além da indução da apoptose nas células (Li et al., 2013). Esses mesmos efeitos foram observados em outros tipos de tumor, como leucemia linfocítica crônica, câncer de colon, pulmão, mesotelioma pleural maligno, neuroblastoma, próstata e pancreático. Sua restauração ectópica inibiu

o crescimento celular, a migração e invasão, e também induziu a apoptose, além de bloquear a progressão do ciclo celular (Li et al., 2013; Li et al., 2020).

Ao avaliarmos os efeitos da inibição do *miR-34a*, notamos que sua menor expressão também levou a redução da proliferação e migração, mesmo o LMS exibindo inicialmente regulação negativa. Porém, os resultados foram menos evidentes em relação ao Mimic, que pareceu exercer maior efeito na diminuição da proliferação e migração das células LM e LMS. Esses resultados preliminares indicaram que a indução desse miRNA pode ter efeito anti-tumorigênico, desempenhando um papel crucial na proliferação e migração dessas células. A maior expressão de *miR-34a* parece estar associado ao menor potencial de malignidade em tumores uterinos.

Em um estudo publicado por Bao et al. (2019), em câncer colorretal, a expressão do *miR-34a* apresentou uma variação gradativa em três tipos de linhagens celulares diferentes. No adenocarcinoma colorretal foram observados altos níveis de expressão do *miR-34a*, no carcinoma a expressão foi moderada e no adenocarcinoma de alto grau a expressão foi menor. A restauração da expressão foi obtida com o Mimic e o silenciamento com o siRNA e os resultados mostraram que sua inibição resultou em maior invasão e migração das células, enquanto sua indução teve efeito oposto. Esses resultados estão em sinergia com os efeitos encontrados aqui, nas células de LM e LMS. Também foi observado que a E-caderina sofreu um aumento e a vimentina diminuiu após a transfecção com o Mimic, em comparação com o controle. Por outro lado, a inibição de *miR-34a* levou à diminuição de E-caderina e promoveu a expressão de vimentina, elevando assim a transição epitélio-mesenquima em células de câncer de colorretal (Bao et al., 2019).

Os miRNAs fazem parte de uma cascata de redes de sinalizações que envolve diferentes tipos de genes e vias (Mishra et al., 2016; Hosseinahli et al., 2018). Além disso, um único miRNA pode regular vários genes simultaneamente (Shu et al., 2017; Lu et al., 2020a). Estudos sobre potenciais alvos vêm mostrando a interação do *miR-34a* com ampla rede de vias oncogênicas (Slabáková et al., 2017) que por vezes podem revelar o ciclo de regulação miRNA-gene/gene-miRNA. Para alguns genes alvo selecionados em nosso estudo, observamos os efeitos da manipulação de forma pontual. Para outros genes foi constatada uma possível regulação constante ao longo do tratamento. De qualquer modo, a manipulação molecular com o siRNA e Mimic exercem um efeito transiente nas células que pode durar até 96h (Han, 2018).

Em nossas análises preliminares, *CCND1* e *TP53* apresentaram uma notória regulação da expressão após o tratamento com *miR-34a* Mimic, mostrando redução de expressão nas duas linhagens. Os efeitos da indução desse miRNA também foram observados na regulação de *MDM4* e *BCL2*, nas células de LMS. Por outro lado, a inibição desse miRNA parece regular positivamente *MDM4* e *TP53*, em ambas as células. Apenas as células de LMS mostraram efeitos da diminuição de *miR-34a* nos níveis de expressão do *CCND1* e *BCL2*. Nos resultados de Córdova-Rivas et al. (2019) que avaliaram os membros da família *miR-34* e seus efeitos na proliferação, migração e invasão de células de câncer do colo do útero, esse miRNA induziu diretamente a apoptose, por meio inibição de *BCL2*. Em outro estudo, Adlakha e Seth (2017), asseveraram que o nocaute de *miR-34* parece mais interessante para a reprogramação que *TP53*, pois a subtração genética de *miR-34a* aumenta a geração de células-tronco pluripotentes induzidas sem comprometer seu

potencial de pluripotência. Assim, o *miR-34* interromperia a pluripotência na fase final da reprogramação celular (Adlakha et al., 2017).

Altos níveis de expressão de *miR-34a* provocam vários efeitos *downstream* ao p53, incluindo parada do ciclo celular, apoptose, senescência e supressão da transição epitélio-mesenchima. Esses efeitos do *miR-34a* são mediados, em parte, pela repressão pós-transcricional de alvos como *CCND1*, *CCNE2*, *CDK4*, *MET*, *MYC*, *BCL2*, *SNAIL1* e *SIRT1*, que promovem coletivamente múltiplos processos oncogênicos (Okada et al., 2014; Slabáková et al., 2017). A restauração ectópica do *miR-34a* diminui significativamente os níveis de expressão do *BCL2* e *SIRT1*, sugerindo que o efeito inibitório do *miR-34a* seria parcialmente implementado por meio da baixa expressão desses dois genes (Li et al., 2013; Rupaimoole et al., 2017). De outro modo, *TP53* induz a transcrição da família *miR-34* e esses miRNAs por sua vez, reprimem *MDM4* e / ou *SIRT1* para aumentar a atividade de transcrição de *TP53* e diminuir o *turnover* da proteína p53. Esse ciclo de regulação positivo entre *TP53* e *miR-34* fortalece ainda mais a atividade do *TP53* após a sua ativação, conferindo uma resposta de supressão tumoral mais robusta (Okada et al., 2014; Slabáková et al., 2017). A deficiência de *miR-34a*, por sua vez, promove de forma eminente a tumorigênese quando o *TP53* é haploinsuficiente (Slabáková et al., 2017).

Porém, outros genes importantes que implicam na tumorigênese e progressão do câncer, podem estar envolvidos na rede de regulações do *miR-34a*, como *TGF- β* , *CTNNB1* (β -catenina), *LEF1*, *ZEB*, *CD44*, *MYC*, *MET*, *NOTCH1*, *PD-L1*, *MMP9* e *MAP2* (Adlakha et al., 2017; Slabáková et al., 2017; Córdova-Rivas et al., 2019; Lin, 2019; Lu et al., 2020a). Zhang et al. (2020) utilizaram a mesma linhagem celular de LMS que nosso estudo (SK-UT-1), em

um estudo funcional com *miR-34a* Mimic, para avaliar a relação da expressão do gene *MELK* com a quimioresistência à doxorrubicina e a polarização de macrófagos M2, por meio da via *miR-34a* / *JAK2* / *STAT3*. Os dados revelaram que não apenas *MELK* poderia diminuir significativamente a expressão do *miR-34a* em LMS, mas também que a supressão do *MELK* poderia aparentemente regular de forma positiva a expressão do *miRNA*. Outro dado interessante, foi a constatação da regulação negativa do *miR-34a* por *STAT3* (Zhang et al., 2020).

Com isso, nota-se a importância da atuação do *miR-34a* em vários processos moleculares. A compreensão aprofundada das vias de sinalização *upstream* e *downstream* ao *miR-34a* seria um pré-requisito para uma aplicação terapêutica bem-sucedida. Devido a implicação desse miRNA em vários ciclos de regulação que podem ser afetados consideravelmente pela dose terapêutica de seu Mimic, é importante considerar os potenciais efeitos da terapia anticâncer baseada nessas moléculas, no contexto em que o *TP53* possa apresentar a função interrompida ou insuficiente (Slabáková et al., 2017).

Outro miRNA que ganhou destaque em nosso estudo foi o *miR-181b*, que está sendo amplamente estudado por seu envolvimento em processos inflamatórios e na transformação maligna em tumores (Andalib et al., 2020). Esse miRNA exibiu efeitos anti-proliferativos pontuais. Em nossos resultados preliminares, após a indução da sua expressão com o *miR-181b* Mimic, mostrou menor proliferação das células de LM. No entanto, os efeitos dessa potencialização da expressão, não afetou a capacidade de migração dessas células, ou contrário do observado no LMS. A indução da expressão do *miR-181b* parece alterar de forma parcial as características tumorigênicas da migração e crescimento celular no LM e LMS. A expressão dessa molécula vem

sendo descrita como promotora da proliferação e migração em músculo liso vascular pela via *PI3K* (Abeshouse et al., 2017; Tsuyoshi et al., 2018). Liu et al. (2014) também ressaltaram que o *miR-181b* promoveu o crescimento, sobrevivência clonogênica, migração e invasão de células de carcinoma hepatocelular, por meio da regulação da atividade de *MMP2* e *MMP9* (Liu et al., 2014). A transfecção com o *miR-181b* Mimic pareceu aumentar a proliferação de fibroblastos de cicatriz hipertrófica e reduziu a apoptose, levando ao aumento da expressão de *MEK*, *p-ERK* e *CDKN1A* (Liu et al., 2019).

Em nossos ensaios, o silenciamento de *miR-181b* também induziu redução da proliferação de forma pontual em ambas as células. Todavia, após 96h de tratamento, as células de LMS mostraram aumento significativo no crescimento celular, possivelmente pela perda do efeito do silenciamento transiente. A ação do *miR-181b* siRNA na migração foi mais acentuada, tanto no LM como no LMS. Esses resultados sugerem que a função ou ação de *miR-181b* pode, aparentemente, depender do tipo e malignidade do tumor.

No estudo de Zheng et al. (2016), a expressão diferencial do *miR-181b* foi observada em câncer de mama. Ao restaurarem a expressão e/ou silenciarem esse miRNA *in vitro*, os autores encontraram que os níveis de expressão do *miR-181b* foi diretamente relacionada a proliferação e migração celular, sugerindo que esse miRNA atuaria como promotor do câncer de mama (Zheng et al., 2016). Outra pesquisa mostrou, que a regulação negativa do *miR-181b* foi inversamente relacionada com o estágio clínico da doença, em astrocitoma. Nesse mesmo estudo, a expressão dessa molécula foi restaurada e inibida em linhagens celulares, e os resultados provaram que a expressão ectópica inibiu a

proliferação, migração e invasão, além de induzir a apoptose em células cancerígenas (Zhi et al., 2014).

Esse mesmo efeito anti-tumorigênico também foi investigado em células de glioma pela regulação do *IGF-1*, que pareceu reduzir a quimioresistência à temozolomida (Wang et al., 2013). Por apresentar um papel dubio, a ação do *miR-181b*, como supressor tumoral ou oncogênico, ainda é controverso e os mecanismos reguladores de suas funções precisam ser esclarecidos nos diferentes tipos de cânceres (Kronski et al., 2014; Zhi et al., 2014). Para uma melhor elucidação do seu papel nas células de LM e LMS serão necessários estudos mais aprofundados e uso de diferentes metodologias com maior número de réplicas experimentais.

Sua capacidade de modular a expressão de uma série de genes, faz desse miRNA um importante regulador de genes ativos na sinalização celular, controle do ciclo e quimio-sensibilidade na maioria das células que abrigam mutações ou deleções de *TP53* (Liu et al., 2014). A indução de sua expressão ectópica parece influenciar a expressão dos genes alvo *TIMP3*, *FGFR1* e *ESR1* em células de LMS. Porém, esse possível efeito não foi visualizado no LM em nosso estudo. Em contrapartida, o silenciamento do *miR-181b* evidenciou a provável regulação de *TIMP3* e *ESR1* nas células de LM, enquanto que o *FGFR1* parece ter sofrido os efeitos da inibição do *miR-181b* em ambas as células.

O *miR-181b* pode ser um componente crítico na inflamação e tumorigênese (pela supressão da expressão do *CYLD*) na quimio-sensibilidade e apoptose (pela supressão do *TIMP*, *TP53*, *BCL2* e outros alvos relevantes) (Andalib et al., 2020). Johnson (2019) mostrou que *miR-181b* regula negativamente a expressão de *TIMP3* em macrófagos, e os níveis do gene *ELN*,

em células do músculo liso vascular (Johnson, 2019). Além disso, Di Gregoli et al. (2017), ressaltaram que esse miRNA é um regulador chave de numerosas funções dos macrófagos envolvidos na progressão do aneurisma, incluindo o aumento da atividade das metaloproteinases, invasão e acúmulo de macrófagos, proliferação e apoptose por regulação negativa de *TIMP3* (Di Gregoli et al., 2017). A regulação desse gene pelo *miR-181b* já foi verificada em vários tipos de cânceres, como gástrico, fígado, carcinoma hepatocelular e mama (Wang et al., 2010; Mulrane et al., 2013; Liu et al., 2014; Zhi et al., 2014).

Apesar de nossas análises *in silico* indicaram *FGFR1* e *ESR1* como possíveis alvos do *miR-181b*, poucos estudos foram publicados sobre essas interações, limitando o entendimento da relação entre essas moléculas. Um estudo relatando a possível interação entre o *miR-181* e a expressão de ER α e ER β , encontrou que a expressão alterada desses receptores estava associada com distúrbios uterinos, abrangendo câncer de endométrio e endometriose. Dese modo, o *miR-181* pode atuar como potencial regulador desses receptores, nesses tecidos e também em outros influenciados por esteróides (Chegini, 2010).

Em uma publicação mais recente, foram realizadas análises genômicas e transcriptômicas em amostras de LM e LMS. Foram identificadas algumas translocações frequentes no LM, em regiões codificantes dos genes *CCND1* e *FGFR3*. No LMS, observou-se duplicações e deleções em regiões que codificam os genes *FGF14*, *FGF7* e *MDM4*. Não obstante, o LM e o LMS também exibiram modificações genéticas compartilhadas em cinco genes, *CCND1*, *ERCC1*, *FGFR1*, *FGFR3* e *PTEN*. Embora o *ERCC1* e *FGFR1* tenham sido afetados por deleções no LM, esses genes estavam duplicados no LMS (Mas et al., 2019).

As diferenças de expressão desses genes alvo preditos (*CCND1*, *BCL2*, *ESR1*, *FGFR1*, e *TP53*), com exceção do *MDM4* e *TIMP3*, já foram avaliadas em LM e/ou LMS (Anania et al., 1997; Dixon et al., 2000; Wu et al., 2001; Leिताo et al., 2004; Mittal et al., 2009; Mortezaee et al., 2014; Graaff et al., 2016; Tsuyoshi et al., 2018; Välimäki et al., 2018; Chuang et al., 2019; Rubisz et al., 2019). Entretanto, a grande maioria dos estudos não avaliou de forma simultânea, ou mais especificamente, as diferenças de expressão entre ambos os tumores e MM (Adams et al., 2019), restringindo a melhor compreensão dos mecanismos de ação na progressão e patogênese desses tumores.

As principais limitações do presente estudo são o número reduzido de amostras avaliadas por ser um estudo retrospectivo de um tumor extremamente raro. A falta de alguns dados clínicos também limitou a avaliação dos potenciais fatores prognósticos, possivelmente reduzindo a precisão das análises realizadas. Outra limitação encontrada foi a não concretização de novas réplicas experimentais que validassem os resultados preliminares encontrados.

A identificação de subtipos moleculares dos tumores com base no seu perfil de expressão pode orientar o diagnóstico subtipo-específico, prognóstico e auxiliar no desenvolvimento de terapias específicas direcionadas para os tumores em questão (An et al., 2017), uma vez que não existem métodos de diagnóstico precisos e específicos para a identificação pré-cirúrgica dos LMS de alguns tipos de LM (Beyan et al., 2019). De modo geral, o diagnóstico de certeza é somente após a cirurgia (Tirumani et al., 2014). Destarte, a identificação de um biomarcador poderá auxiliar na distinção entre tumores benignos e malignos.

Os miRNAs supressores tumorais ou oncogênicos estão sendo considerados alvos para novas estratégias terapêuticas. Essas novas terapias

buscam recuperar proteínas supressoras de tumor e inibir as oncogênicas, por meio da regulação dos miRNAs. As alterações ou anormalidades na expressão dos miRNAs são bem toleradas em tecidos normais, mas podem influenciar profundamente o comportamento das células e tecidos (De Almeida et al., 2017). A inibição ou indução da expressão de miRNAs pode ser uma ferramenta altamente potente para modular um processo patológico evitando efeitos tóxicos indesejáveis em tecidos normais (Mendell et al., 2013). O tratamento epigenético pode ser benéfico em pacientes com câncer por meio da monoterapia ou um tratamento combinatório com outras terapias padrão (Lu et al., 2020a).

Finalmente, ainda se faz necessário um melhor entendimento das redes de interações, bem como genes alvo e os efeitos tumor específico dos miRNAs avaliados nos LM e LMS, para a proposição do desenvolvimento de terapias e / ou ferramentas de diagnóstico com esses potenciais biomarcadores.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A análise da expressão basal dos cinco miRNAs selecionados (*let-7f-5p*, *miR-10b-5p*, *miR-34a-5p*, *miR-181b-5p* e *miR181d-5p*) revelou menor perfil de expressão nas amostras de pacientes e células de LMS, em comparação aos LM. Diferenças significativas foram encontradas somente para a expressão de *let-7f*, *miR-10b* e *miR-34a* nas amostras de pacientes.
 2. *miR-34a* e *miR-181b* apresentaram perfis de expressão similares entre as amostras de pacientes e as duas linhagens celulares. Dessa forma, ambos foram selecionados para a continuidade (validação) dos experimentos *in vitro*.
 3. A manipulação molecular de *miR-34a* e *miR-181b*, resultou em efeitos importantes no comportamento das células de LM e LMS. A indução e inibição de *miR-34a* resultou em menor proliferação e migração de ambas linhagens. Para o *miR-181b*, sua indução levou a menor proliferação e migração das células de LM, enquanto sua inibição resultou na redução da proliferação de forma pontual (48h). No LMS, a inibição do *miR-181b* pareceu reduzir a proliferação celular, enquanto a migração foi menor tanto após sua indução quanto inibição.
 4. As análises preliminares dos efeitos da manipulação molecular de ambos miRNAs sobre seus potenciais genes alvos, mostrou que *miR-34a* interfere na expressão de *CCND1*, *MDM4*, *TP53* e *BCL2* nas células de LMS. Enquanto seu aumento de expressão coincidiu com menor
-

expressão de *CCND1*, sua inibição coincidiu com maior expressão de *MDM4*, *TP53* e *BCL2*. Para o *miR-181b*, sua inibição coincidiu com maior expressão de *ESR1*, nos LM e LMS, e de *BCL2*, nos LMS.

5. Para os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes avaliadas (LMS), a menor expressão dos miRNAs *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d* foi associada ao pior prognóstico. *let-7f*, *miR-10b*, *miR-34a* e *miR-181d* foram associados ao menor tempo de sobrevida global. *let-7f* e *miR-181d* também foram associados ao menor tempo de recorrência tumoral. Adicionalmente, a menor expressão de *let-7f*, *miR-34a*, *miR-181b* e *miR-181d*, aparentemente, aumentou o risco de desenvolvimento do LMS uterino em até 4 vezes.

7. ANEXOS

Anexo A. Tabelas contendo os 84 miRNAs avaliados por qRT-PCR em *array*

Tabela 28 – Lista dos miRNAs avaliados e posição na placa de 96 poços *MIHS-109ZA*

Posição na placa	miRNA maduro	Posição na placa	miRNA Maduro
A01	hsa-let-7a-5p	D07	hsa-miR-19b-3p
A02	hsa-let-7b-5p	D08	hsa-miR-200a-3p
A03	hsa-let-7c-5p	D09	hsa-miR-200b-3p
A04	hsa-let-7d-5p	D10	hsa-miR-200c-3p
A05	hsa-let-7e-5p	D11	hsa-miR-202-3p
A06	hsa-let-7f-5p	D12	hsa-miR-203a-3p
A07	hsa-let-7g-5p	E01	hsa-miR-204-5p
A08	hsa-let-7i-5p	E02	hsa-miR-205-5p
A09	hsa-miR-1-3p	E03	hsa-miR-206
A10	hsa-miR-100-5p	E04	hsa-miR-20a-5p
A11	hsa-miR-107	E05	hsa-miR-20b-5p
A12	hsa-miR-10a-5p	E06	hsa-miR-21-5p
B01	hsa-miR-10b-5p	E07	hsa-miR-210-3p
B02	hsa-miR-125b-5p	E08	hsa-miR-212-3p
B03	hsa-miR-125b-1-3p	E09	hsa-miR-214-3p
B04	hsa-miR-128-3p	E10	hsa-miR-22-3p
B05	hsa-miR-129-5p	E11	hsa-miR-222-3p
B06	hsa-miR-130a-3p	E12	hsa-miR-223-3p
B07	hsa-miR-130b-3p	F01	hsa-miR-25-3p
B08	hsa-miR-132-3p	F02	hsa-miR-26a-5p
B09	hsa-miR-140-5p	F03	hsa-miR-26b-5p
B10	hsa-miR-141-3p	F04	hsa-miR-27a-3p
B11	hsa-miR-145-5p	F05	hsa-miR-27b-3p
B12	hsa-miR-148a-3p	F06	hsa-miR-29a-3p
C01	hsa-miR-152-3p	F07	hsa-miR-29b-3p
C02	hsa-miR-155-5p	F08	hsa-miR-29c-3p
C03	hsa-miR-15a-5p	F09	hsa-miR-31-5p
C04	hsa-miR-15b-5p	F10	hsa-miR-328-3p
C05	hsa-miR-16-5p	F11	hsa-miR-340-5p
C06	hsa-miR-17-5p	F12	hsa-miR-424-5p
C07	hsa-miR-181a-5p	G01	hsa-miR-429
C08	hsa-miR-181b-5p	G02	hsa-miR-485-5p
C09	hsa-miR-181c-5p	G03	hsa-miR-489-3p
C10	hsa-miR-181d-5p	G04	hsa-miR-495-3p
C11	hsa-miR-182-5p	G05	hsa-miR-497-5p
C12	hsa-miR-186-5p	G06	hsa-miR-548c-3p
D01	hsa-miR-18a-5p	G07	hsa-miR-607
D02	hsa-miR-193b-3p	G08	hsa-miR-613
D03	hsa-miR-195-5p	G09	hsa-miR-7-5p
D04	hsa-miR-199b-3p	G10	hsa-miR-93-5p
D05	hsa-miR-199a-5p	G11	hsa-miR-96-5p
D06	hsa-miR-19a-3p	G12	hsa-miR-98-5p

Tabela 29 - Lista dos miRNAs avaliados e posição na placa de 96 poços *MIHS-102ZA*

Posição na placa	miRNA maduro	Posição na placa	miRNA Maduro
A01	hsa-let-7a-5p	D07	hsa-miR-181d-5p
A02	hsa-miR-133b	D08	hsa-miR-301a-3p
A03	hsa-miR-122-5p	D09	hsa-miR-200c-3p
A04	hsa-miR-20b-5p	D10	hsa-miR-100-5p
A05	hsa-miR-335-5p	D11	hsa-miR-10b-5p
A06	hsa-miR-196a-5p	D12	hsa-miR-155-5p
A07	hsa-miR-125a-5p	E01	hsa-miR-1-3p
A08	hsa-miR-142-5p	E02	hsa-miR-150-5p
A09	hsa-miR-96-5p	E03	hsa-let-7i-5p
A10	hsa-miR-222-3p	E04	hsa-miR-27b-3p
A11	hsa-miR-148b-3p	E05	hsa-miR-7-5p
A12	hsa-miR-92a-3p	E06	hsa-miR-127-5p
B01	hsa-miR-184	E07	hsa-miR-29a-3p
B02	hsa-miR-214-3p	E08	hsa-miR-191-5p
B03	hsa-miR-15a-5p	E09	hsa-let-7d-5p
B04	hsa-miR-378a-3p	E10	hsa-miR-9-5p
B05	hsa-let-7b-5p	E11	hsa-let-7f-5p
B06	hsa-miR-205-5p	E12	hsa-miR-10a-5p
B07	hsa-miR-181a-5p	F01	hsa-miR-181b-5p
B08	hsa-miR-130a-3p	F02	hsa-miR-15b-5p
B09	hsa-miR-140-5p	F03	hsa-miR-16-5p
B10	hsa-miR-20a-5p	F04	hsa-miR-210-3p
B11	hsa-miR-146b-5p	F05	hsa-miR-17-5p
B12	hsa-miR-132-3p	F06	hsa-miR-98-5p
C01	hsa-miR-193b-3p	F07	hsa-miR-34a-5p
C02	hsa-miR-183-5p	F08	hsa-miR-25-3p
C03	hsa-miR-34c-5p	F09	hsa-miR-144-3p
C04	hsa-miR-30c-5p	F10	hsa-miR-128-3p
C05	hsa-miR-148a-3p	F11	hsa-miR-143-3p
C06	hsa-miR-134-5p	F12	hsa-miR-215-5p
C07	hsa-let-7g-5p	G01	hsa-miR-19a-3p
C08	hsa-miR-138-5p	G02	hsa-miR-193a-5p
C09	hsa-miR-373-3p	G03	hsa-miR-18a-5p
C10	hsa-let-7c-5p	G04	hsa-miR-125b-5p
C11	hsa-let-7e-5p	G05	hsa-miR-126-3p
C12	hsa-miR-218-5p	G06	hsa-miR-27a-3p
D01	hsa-miR-29b-3p	G07	hsa-miR-372-3p
D02	hsa-miR-146a-5p	G08	hsa-miR-149-5p
D03	hsa-miR-135b-5p	G09	hsa-miR-23b-3p
D04	hsa-miR-206	G10	hsa-miR-203a-3p
D05	hsa-miR-124-3p	G11	hsa-miR-32-5p
D06	hsa-miR-21-5p	G12	hsa-miR-181c-5p

Anexo B. Distribuição da idade das pacientes.

Figura 35 - Comparação da idade das pacientes nos grupos MM, LM e LMS (*P = 0,0025 **P = 0,0003).

Tabela 30 - Análise da idade das pacientes de acordo com o perfil de expressão dos miRNAs

Idade (anos) (n = 15)	Hipoexpresso Média ± Desvio padrão (Min – Máx)	Hiperexpresso Média ± Desvio padrão (Min – Máx)	P*
<i>miR-10b</i>	64,00 ± 14,27 (40 – 80)	54,38 ± 17,48 (32 – 91)	0,268
<i>miR-34a</i>	57,00 ± 12,95 (40 – 80)	60,50 ± 19,47 (32 – 91)	0,693
<i>let-7f</i>	57,00±14,04 (40 – 80)	60,50 ± 18,81 (32 – 91)	0,693
<i>miR-181b</i>	59,86 ± 14,10 (40 – 80)	58,00 ± 18,90 (32 – 91)	0,834
<i>miR-181d</i>	58,29 ± 12,67 (40 – 80)	59,38 ± 6,99 (32 – 91)	0,902

*Teste *t student*.

Anexo C. Característica das pacientes.

Tabela 31 - Análise das características clínicas e anatomopatológicas de pacientes com metástase e sem metástase (n = 15)

Variável	Metástase	Sem metástase	P*
	n (%)	n (%)	
Idade 50			
< 50	3 (20)	2 (13)	0,241
≥ 50	9 (60)	1 (7)	
Grau histológico			
Baixo grau	3 (20)	2 (13)	0,241
Alto grau	9 (60)	1 (7)	

*Teste Qui-quadrado.

Anexo D. Aprovação do Comitê de ética

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise funcional dos miRNAs let-7f-5p, miR-10b-5p, miR-34a-5p, miR181b-5p e miR181d-5p em células de leiomiossarcoma uterino **Pesquisador:** KÁTIA CANDIDO CARVALHO **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 54699816.5.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.517.306

Apresentação do Projeto:

A expressão anormal de alguns miRNAs podem desencadear a transformação celular, e ainda podem estar associadas a um maior potencial metastático e pior prognóstico. Muito embora os miRNAs e seus mRNA alvo tenham seus papéis no processo de carcinogênese avaliado, poucos estudos procuraram identificar as suas importâncias e eventual associação ao risco de desenvolvimento do leiomiossarcoma uterino.

Dessa forma, o objetivo desse projeto é avaliar o perfil de expressão dos miRNAs let-7f-5p, miR-10b-5p, miR-34a-5p, miR-181b-5p e miR181d-5p e de alguns de seus alvos específicos (CDKN1A, KLK10, CCNB3, HOXA10, CD44, NOTCH1, MDM4, TIMP3 e MGMT) em células imortalizadas de miométrio (MM), de leiomioma (LM), leiomiossarcoma (LMS) e em amostras parafinadas de pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a função dos miRNAs buscando identificar a expressão anormal de miRNAs e validação através da reação de imunohistoquímica dos seus alvos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Trata-se de análise de material já confeccionado por TMA de projeto anterior, não

Ausência	carta_de_anuencia.pdf	26/02/2016 15:57:21	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceito
----------	-----------------------	------------------------	---------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Abril de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Anexo E. Publicação de artigos relacionados a tese.

International Journal of
Molecular Sciences

Article

Oncomirs Expression Profiling in Uterine Leiomyosarcoma Cells

Bruna Cristine de Almeida , Natalia Garcia, Giovana Maffazioli, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat and Katia Candido Carvalho *

Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58), Disciplina de Ginecologia, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, SP, BR Av. Dr Arnaldo 455, sala 4121, 05403-010 Cerqueira Cesar, São Paulo, Brazil; bruc_10@hotmail.com (B.C.d.A.); natalia.garciaft@gmail.com (N.G.); giovanamaffazioli@hotmail.com (G.M.); lauragonzalezanos@gmail.com (L.G.d.A.); edmund.baracat@hc.fm.usp.br (E.C.B.) *
Correspondence: carvalhokc@gmail.com; Tel.: +55-11-3061-7033

Received: 1 December 2017; Accepted: 21 December 2017; Published: 25 December 2017

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that act as regulators of gene expression at the post-transcriptional level. They play a key role in several biological processes. Their abnormal expression may lead to malignant cell transformation. This study aimed to evaluate the expression profile of 84 miRNAs involved in tumorigenesis in immortalized cells of myometrium (MM), uterine leiomyoma (ULM), and uterine leiomyosarcoma (ULMS). Specific cell lines were cultured and qRT-PCR was performed. Thirteen miRNAs presented different expression profiles in ULM and the same thirteen in ULMS compared to MM. Eight miRNAs were overexpressed, and five were underexpressed in ULM. In ULMS cells, five miRNAs exhibited an overexpression and eight were down-regulated. Six miRNAs (*miR-1-3p*, *miR-130b-3p*, *miR-140-5p*, *miR-202-3p*, *miR-205-5p*, and *miR-7-5p*) presented a similar expression pattern in cell lines compared to patient samples. Of these, only three miRNAs showed significant expression in ULM (*miR-1-3p*, *miR-140-5p*, and *miR-7-5p*) and ULMS (*miR-1-3p*, *miR-202-3p*, and *miR-7-5p*). Our preliminary approach identified 24 oncomirs with an altered expression profile in ULM and ULMS cells. We identified four differentially expressed miRNAs with the same profile when compared with patients' samples, which strongly interacted with relevant genes, including apoptosis regulator (*BCL2*), epidermal growth factor receptor (*EGFR*), vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*), insulin like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), serine/threonine kinase (*RAF1*), receptor tyrosine kinase (*MET*), and bHLH transcription factor (*MYCN*). This led to alterations in their mRNA-target.

Keywords: uterine leiomyosarcoma; uterine leiomyoma; miRNA; oncomirs; cell culture

Article

Let-7 miRNA's Expression Profile and Its Potential Prognostic Role in Uterine Leiomyosarcoma

Bruna Cristine de Almeida ¹, Laura Gonzalez dos Anjos ¹, Miyuki Uno ², Isabela Werneck da Cunha ^{3,4,5}, Fernando Augusto Soares ^{3,4,5}, Glauco Baiocchi ⁶, Edmund Chada Baracat ¹ and Katia Candido Carvalho ^{1,*}

¹ Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM58), Disciplina de Ginecologia, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, SP, BR Av. Dr Arnaldo 455, sala 4121, Cerqueira Cesar, São Paulo 05403-010, Brazil; bruc_10@hotmail.com (B.C.d.A.); lauragonzalezanjios@gmail.com (L.G.d.A.); edmund.baracat@hc.fm.usp.br (E.C.B.)

² Centro de Investigação Translacional em Oncologia (LIM24), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (CTO/ICESP) Av Dr Arnaldo 251 sala 238 andar, São Paulo 01246000, Brazil; miyuki.uno@hc.fm.usp.br

³ Department of Pathology, Rede D'OR-São Luiz, Rua das Perobas, 344-Jabaquara, São Paulo 04321-120, Brazil; iwerneck0210@gmail.com (I.W.d.C.); fasoares@me.com (F.A.S.)

⁴ Hospital A C Camargo Cancer Center, SP, BR R. Tamandaré, 753 Liberdade, São Paulo 05403-010, Brazil

⁵ National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, SP, BR R. Tamandaré, 753 Liberdade, São Paulo 05403-010, Brazil

⁶ Department of Gynecology Oncology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Prof Antonio Prudente 211, São Paulo, Brazil; glauco.baiocchi@accamargo.org.br

* Correspondence: carvalhokc@gmail.com; Tel.: +55-011-3061-7486

Received: 11 October 2019; Accepted: 14 November 2019; Published: 17 November 2019

Abstract: The *lethal-7* (*let-7*) family is an important microRNA (miRNA) group that usually exerts functions as a tumor suppressor. We aimed to evaluate the expression profile of *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, and *let-7i* and to assess their value as prognostic markers in uterine leiomyosarcoma (LMS) patients. The miRNAs expression profile was assessed in 34 LMS and 13 normal myometrium (MM) paraffin-embedded samples. All *let-7* family members showed downregulation in LMS. Our findings showed that patients with *let-7e* downregulation had worse overall survival (OS) and is an independent prognostic factor (hazard ratio [HR] = 2.24). In addition, almost half the patients had distant metastasis. LMS patients with downregulated *let-7b* and *let-7d* had worse disease-free survival (DFS); they are not independent prognostic factors (HR = 2.65). Patients' ages were associated with *let-7d*, *let-7e* and *let-7f* ($p = 0.0160$) downregulation. In conclusion, all the *let-7* family members were downregulated in LMS patients, and the greater the loss of expression of these molecules, the greater their relationship with worse prognosis of patients. *Let-7e* expression might influence the OS, while *let-7b* and *let-7d* might influence the DFS. The lowest expression levels of *let-7d*, *let-7e*, and *let-7f* were associated with the oldest patients. Our findings indicate strong evidence of *let-7*'s role as a potential prognostic biomarker in LMS.

Keywords: *let-7* family; miRNA; uterine leiomyosarcoma; non-coding RN

Article

Could miRNA Signatures be Useful for Predicting Uterine Sarcoma and Carcinosarcoma Prognosis and Treatment?

Laura Gonzalez dos Anjos ², Bruna Cristine de Almeida ¹ , Thais Gomes de Almeida ^{1,2}, André Mourão Lavorato Rocha ³, Giovana De Nardo Maffazioli ¹, Fernando Augusto Soares ^{3,4,5}, Isabela Werneck da Cunha ^{3,4,5}, Edmund Chada Baracat ¹ and Katia Candido Carvalho ^{1,*}

- ¹ Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM58), Disciplina de Ginecologia, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, SP, BR Av. Dr Arnaldo 455, sala 4121, Cerqueira Cesar, São Paulo 05403-010, Brazil; lauragonzalezanos@gmail.com (L.G.d.A.); bruc_10@hotmail.com (B.C.d.A.); tgalmeida.sp@gmail.com (T.G.d.A.); giovanamaffazioli@hotmail.com (G.D.N.M.); edmund.baracat@hc.fm.usp.br (E.C.B.)
 - ² Instituto Brasileiro de Controle do Cancer, SP, BR Av. Alcântara Machado, 2576 Mooca, São Paulo 05403-010, Brazil
 - ³ Hospital A C Camargo Cancer Center, SP, BR R. Tamandaré, 753 Liberdade, São Paulo 05403-010, Brazil; lavorato.andre@gmail.com (A.M.L.R.); fasoares@me.com (F.A.S.); iwerneck0210@gmail.com (I.W.d.C.)
 - ⁴ Department of Pathology, Rede D'OR-São Luiz, Rua das Perobas, 344-Jabaquara, São Paulo 04321-120, Brazil
 - ⁵ National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation, SP, BR R. Tamandaré, 753 Liberdade, São Paulo 05403-010, Brazil
- * Correspondence: carvalhokc@gmail.com; Tel.: +55-011-3061-7486

Received: 21 July 2018; Accepted: 4 September 2018; Published: 6 September 2018

Abstract: Changes in microRNA (miRNA) expression may lead to cancer development and/or contribute to its progression; however, their role in uterine sarcomas is poorly understood. Uterine sarcomas (US) belong to a rare class of heterogeneous tumors, representing about 1% of all gynecologic neoplasms. This study aimed to assess the expression profile of 84 cancer-related miRNAs and to evaluate their correlation with clinical pathological features. Eighty-two formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were selected. In leiomyosarcoma (LMS), there was an association of lower cancer-specific survival (CSS) with the downregulation of *miR-125a-5p* and *miR-10a-5p*, and the upregulation of *miR-196a-5p* and *miR-34c-5p*. In carcinosarcoma (CS), lower CSS was associated with the upregulation of *miR-184*, and the downregulation of *let-7b-5p* and *miR-124*. In endometrial stromal sarcomas (ESS), the upregulation of *miR-373-3p*, *miR-372-3p*, and *let-7b-5p*, and the down-expression of *let-7f-5p*, *miR-23-3p*, and *let-7b-5p* were associated with lower CSS. Only *miR-138-5p* upregulation was associated with higher survival rates. *miR-335-5p*, *miR-301a-3p*, and *miR-210-3p* were more highly expressed in patients with tumor metastasis and relapse. *miR-138-5p*, *miR-146b-5p*, and

miR-218-5p expression were associated with higher disease-free survival (DFS) in treated patients. These miRNAs represent potential prediction markers for prognosis and treatment response in these tumors.

Keywords: uterine sarcomas; carcinosarcoma; miRNA; oncomirs; miRNA expression.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

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

Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Current biology*. 2014; 24(16):762-76.

Adams CL, Dimitrova I, Post MD, Gibson L, Spillman MA, Behbakht K, Bradford AP. Identification of a novel diagnostic gene expression signature to discriminate uterine leiomyoma from leiomyosarcoma. *Experimental and Molecular Pathology*. 2019;110:104284.

Adlakha YK, Seth P. The expanding horizon of MicroRNAs in cellular reprogramming. *Progress in Neurobiology*. 2017;148:21–39.

Amant F, Lorusso D, Mustea A, Duffaud F, Pautier P. Management strategies in advanced uterine leiomyosarcoma: Focus on trabectedin. *Sarcoma*. 2015;2015:704124.

ACS - American Cancer Society [on-line]. Uterine sarcoma stages; 2017 [citado 1 jul. 2020]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/uterine-sarcoma/detection-diagnosis-staging/staging.html>.

ACS - American Cancer Society [on-line]. Cancer statistics center; 2020 [citado

13 jul. 2020]. Disponível em: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/>.

ACS - American Cancer Society [on-line]. Survival rates for uterine sarcoma; 2020 [citado 13 jul. 2020]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/uterine-sarcoma/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.

Almeida TG. Análise da expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a em sarcomas e carcinosarcomas uterinos. [Tese]. Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2015.

An Y, Wang S, Li S, Zhang L, Wang D, Wang H, et al. Distinct molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma respond differently to chemotherapy treatment. *BMC Cancer*. 2017;17(1)1–8.

Anania CA, Stewart EA, Quade BJ, Hill JA, Nowak RA. Expression of the fibroblast growth factor receptor in women with leiomyomas and abnormal uterine bleeding. *Molecular Human Reproduction*. 1997;3(8):685–691.

Andalib A, Rashed S, Dehbashi M, Hajati J, Noorbakhsh F, Ganjalikhani-Hakemi M. The upregulation of hsa-mir-181b-1 and downregulation of its target CYLD in the late-stage of tumor progression of breast cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2020;35(3):312–321.

Ankasha SJ, Shafiee MN, Wahab NA, Ali RAR, Mokhtar NM. Post-transcriptional regulation of microRNAs in cancer: From prediction to validation. *Oncol Rev*. 2018;12(1):344.

Arend RC, Toboni MD, Montgomery AM, Burger RA, Olawaiye AB, Monk BJ, et al. Systemic Treatment of Metastatic/Recurrent Uterine Leiomyosarcoma: A

Changing Paradigm. *Oncologist*. 2018;23(12):1533-1545.

Baek M-H, Park J-Y, Park Y, Kim K-R, Kim D-Y, Suh, et al. Androgen receptor as a prognostic biomarker and therapeutic target in uterine leiomyosarcoma. *J Gynecol Oncol*. 2018; 29(3): e30.

Banas T, Pitynski K, Okon K, Czerw A. DNA fragmentation factors 40 and 45 (DFF40/DFF45) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein are underexpressed in uterine leiomyosarcomas and may predict survival. *OncoTargets and Ther*. 2017; 10:4579–4589.

Bao Y, Lu Y, Feng W, Yu H, Guo H, Tao Y, et al. COUP-TFII promotes epithelial-mesenchymal transition by inhibiting miR-34a expression in colorectal cancer. *Inter J Oncol*. 2019;54(4):1337–1344.

Baranov VS, Osinovskaya NS, Yarmolinskaya MI. Pathogenomics of Uterine Fibroids Development. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6151.

Barca-Mayo O, Lu QR. Fine-tuning oligodendrocyte development by micrnas. *Front Neurosci*. 2012;6(13):1–7.

Barlin JN, Zhou QC, Leitao MM, Bisogna M, Olvera N, Shih KK, et al. Molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma and correlation with clinical outcome. *Neoplasia*. 2015;17(2):183–189.

Ben-Ami E, Barysaukas CM, Solomon S, Tahlil K, Malley R, Hohos M, et al. Immunotherapy with single agent nivolumab for advanced leiomyosarcoma of the uterus: Results of a phase 2 study. *Cancer*. 2017;123(17):3285–3290.

Benson C, Miah AB. Uterine sarcoma - current perspectives. *Int J Women's*

Health. 2017;9:597–606.

Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):846–860.

Berindan-Neagoe I, Monroig PC, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(5):311–336.

Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122–1143.

Beyan E, Kanmaz AG, İnan AH, Karataşlı V, Tutar SO, Alan M, et al. Evaluation of occult uterine leiomyosarcomas. *Ginekol Pol*. 2019;90(8):433–437.

Biagioni F, Ben-Moshe NB, Fontemaggi G, Yarden Y, Domany E, Blandino G. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination. *Cell cycle*. 2013;12(15):2371–2375.

Bogani G, Ditto A, Martineli F, Signorelli M, Chiappa V, Fonatella C, et al. Role of bevacizumab in uterine leiomyosarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126:45–51.

Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling pathways in leiomyoma: Understanding pathobiology and implications for therapy. *Mol Med*. 2015;21(1):242–256.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell

differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(1):F19-36.

Bradley LD, Pasic RP, Miller LE. Clinical performance of radiofrequency ablation for treatment of uterine fibroids: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2019;29(12):1507–1517.

Brany D, Dvorska D, Nachajova M, Slavik P, Burjanivova T. Malignant tumors of the uterine corpus: molecular background of their origin. *Tumor Biol*. 2015;36(9):6615–6621.

Broderick J, Zamore P. microRNA Therapeutics. *Gene Ther*. 2011;18(12):1104-1110.

Bulun SE. Uterine Fibroids. *N Engl J Med*. 2013;369(14):1344–1355.

Chegini N. Uterine microRNA signature and consequence of their dysregulation in uterine disorders. *Anim Reprod*. 2010;7(3):117-128.

Chen A-H, Qin Y-E, Tang W-F, Tao J, Song H, Zuo M. MiR-34a and miR-206 act as novel prognostic and therapy biomarkers in cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2017;17(1):63.

Chen H, Xiao Z, Yu R, Wang Y, Xu R, Zhu X. miR-181d-5p-FOXP1 feedback loop modulates the progression of osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1434–1441.

Chen L, Yang B. Immunohistochemical analysis of p16, p53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(3):326–332.

Chen SN, Chang R, Lin LT, Chern CU, Tsai HW, Wen ZH, et al. MicroRNA in ovarian cancer: Biology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(9):1510.

Chiang S, Oliva E. Recent developments in uterine mesenchymal neoplasms. *Histopathology*. 2013;62(1):124–137.

Cho S, Mutlu L, Zhou Y, Taylor HS. Aromatase inhibitor regulates let-7 expression and let-7f-induced cell migration in endometrial cells from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2016;106(3): 673–680.

Chodankar R, Critchley HOD. Biomarkers in abnormal uterine bleeding. *Biol Reprod*. 2019;101(6):1155–1166.

Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*. 2016;7(2):68-74.

Chuang T-D, Khorram O. Regulation of cell cycle regulatory proteins by micrnas in uterine leiomyoma. *Reprod Sci*. 2019;26(2):250-258.

Chuang T-D, Xie Y, Yan W, Khorram O. Next-generation Sequencing reveals differentially expressed small non-coding rnas in uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2018;109(5): 919-929.

Chuang T-Y, Min J, Wu HL, McCrary C, Layman LC, Diamond MP, et al. Berberine inhibits uterine leiomyoma cell proliferation via downregulation of cyclooxygenase 2 and pituitary tumor-transforming gene 1. *Reprod Sci*. 2017;24(7):1005–1013.

Ciavattini A, Di Giuseppe J, Stortoni P, Montik N, Giannubilo SR, Litta P, et al. Uterine fibroids: pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstet Gynecology Int.* 2013;2013:173184.

Ciebiera M, Włodarczyk M, Zgliczyńska M, Łukaszuk K, Męczekalski B, Kobierzycki C, et al. The role of tumor necrosis factor α in the biology of uterine fibroids and the related symptoms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3869.

Ciebiera M, Włodarczyk M, Zgliczyński S, Łoziński T, Walczak K, Czekerowski A. The role of mirna and related pathways in pathophysiology of uterine fibroids—from bench to bedside. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):3016.

Cinkorumpin J, Roos M, Nguyen L, Liu X, Gaeta X, Lin S, et al. A small molecule screen to identify regulators of let-7 targets. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10.

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

Conconi D, Chiappa V, Perego P, Redaelli S, Bovo G, Lavitrano M, et al. Potential role of BCL2 in the recurrence of uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential. *Oncol Rep.* 2017;37(1):41–47.

Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: Latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells.* 2020;9(2):276.

Cordoba A, Prades J, Basson L, Robin YM, Taïeb S, Narducci F, et al. Adjuvant management of operated uterine sarcomas: A single institution experience.

Cancer Radiother. 2019;23(5):401–407.

Córdova-Rivas S, Fraire-Soto I, Torres AMC, Servín-González LS, Granados-López AJ, López-Hernández Y, et al. 5p and 3p strands of miR-34 family members have differential effects in cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):545.

Corleta HVE, Chaves EBM, Krause MS, Capp E. Tratamento atual dos miomas. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(6):324–328.

Costales AB, Radeva M, Ricci S. Characterizing the efficacy and trends of adjuvant therapy versus observation in women with early stage (uterine confined) leiomyosarcoma: a National Cancer Database study. *J Gynecol oncol.* 2020;31(3):e21.

Cui R, Wright J, Hou J. Uterine leiomyosarcoma: a review of recent advances in molecular biology, clinical management and outcome. *BJOG.* 2017;124(7):1028–1037.

Cuppens T, Moisse M, Depreeuw J, Annibali D, Colas E, Gil-Moreno A, et al. Integrated genome analysis of uterine leiomyosarcoma to identify novel driver genes and targetable pathways. *Int J Cancer.* 2018;142(6):1230–1243.

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: A review. *Gynecol Oncol.* 2010;116(1):131–139.

Daugaard I, Hansen TB. Biogenesis and function of ago-associated RNAs. *Trends Genet.* 2017;33(3):208–219.

De Almeida BC, Garcia N, Maffazioli GN, Dos Anjos LG, Baracat, EC, Carvalho

KC. Oncomirs expression profiling in uterine leiomyosarcoma cells. *Int J Mol Sci*. 2017;19(1):52.

De Almeida BC, Dos Anjos LG, Uno M, Cunha IW, Soares FA, Baiocchi G, Baracat EC, Carvalho KC. Let-7 miRNA's expression profile and its potential prognostic role in uterine leiomyosarcoma. *Cells*. 2019;8(11):1452.

DeLair D. *Management of Gynecological Cancers in Older Women*. London: Springer London; 2013. 2, 21–38: Pathology of gynecologic cancer.

Delaney MA, Wan Y-W, Kim G-E, Creighton CJ, Taylor MG, Masand R, et al. A role for progesterone-regulated sfrp4 expression in uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3316-3326.

Deng Y, Han Q, Mei S, Li H, Yang F, Wang J, et al. Cyclin-dependent kinase subunit 2 overexpression promotes tumor progression and predicts poor prognosis in uterine leiomyosarcoma. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2845–2852.

Desar IME, Ottevanger PB, Benson C, van der Graaf, WTA. Systemic treatment in adult uterine sarcomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;122:10–20.

Devereaux KA, Schoolmeester JK. Smooth muscle tumors of the female genital tract. *Surg Pathol Clin*. 2019;12(2):397–455.

Di Gregoli K, Anuar NNM, Bianco R, White SJ, Newby AC, George SJ, et al. MicroRNA-181b controls atherosclerosis and aneurysms through regulation of TIMP-3 and elastin. *Circ Res*. 2017;120(1):49–65.

Dixon D, He H, Haseman JK. Immunohistochemical localization of growth factors

and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect.* 2000;108(s5):795–802.

Dong P, Ihira K, Xiong Y, Watari H, Hanley SJB, Yamada T, et al. Reactivation of epigenetically silenced miR-124 reverses the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion in endometrial cancer cells via the direct repression of IQGAP1 expression. *Oncotarget.* 2016;7(15):20260–20270.

Dos Anjos LG, Cunha IW, Baracat EC, Carvalho KC. Genetic and epigenetic features in uterine smooth muscle tumors: An update. *Clinics Oncol.* 2019;4(1637):1-5.

Dos Anjos LG, De Almeida BC, De Almeida TG, Rocha AML, Maffazioli GN, Soares FA, et al. Could miRNA signatures be useful for predicting uterine sarcoma and carcinosarcoma prognosis and treatment? *Cancers.* 2018;10(9):1–18.

Ducie JA, Leitao MM. The role of adjuvant therapy in uterine leiomyosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016;16(1):45-55.

Dvorská D, Škovierová H, Braný D, Halašová E, Danková Z. Liquid biopsy as a tool for differentiation of leiomyomas and sarcomas of corpus uteri. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3825.

Elvin JA, Gay LM, Ort R, Shuluk J, Long J, Shelley L, et al. Clinical benefit in response to palbociclib treatment in refractory uterine leiomyosarcomas with a common *CDKN2A* alteration. *Oncologist.* 2017;22(4):416–421.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat*

Rev Cancer. 2006;6(4):259–269.

Fahim SA, Abdullah MS, Espinoza-Sánchez NA, Hassan H, Ibrahim AM, Ahmed SH, et al. Inflammatory breast carcinoma: Elevated microRNA miR-181b-5p and reduced miR-200b-3p, miR-200c-3p, and miR-203a-3p expression as potential biomarkers with diagnostic value. *Biomolecules*. 2020;10(7):1–30.

Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNA cancer regulation. *Adv Exp Med Biol*. 2013;774:1–20.

Febrasgo - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia [on-line]. Mioma uterino: um problema muito comum e quase silencioso; 2017 [citado 18 maio 2020]. Disponível em: <https://www.febrasgo.org.br/pt/noticias/item/41-mioma-uterino-um-problema-muito-comum-e-quase-silencioso>.

Friedman CF, Hensley ML. Options for adjuvant therapy for uterine leiomyosarcoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19(2):7.

Gadducci A, Cosio S, Romanini A, Genazzani AR. The management of patients with uterine sarcoma: a debated clinical challenge. *Crit Rev Oncology Hematol*. 2008;65(2):129–142.

Gadducci A, Zannoni GF. Uterine smooth muscle tumors of unknown malignant potential: A challenging question. *Gynecol Oncol*. 2019;154(3):631–637.

George S, Serrano C, Hensley ML, Ray-Coquard I. Soft tissue and uterine leiomyosarcoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(2):144-150.

Gilles M-E, Slack FJ. *Let-7* microRNA as a potential therapeutic target with implications for immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(11):929–939.

Glorie N, Baert T, Van Den Bosch T, Coosemans AN. Circulating protein biomarkers to differentiate uterine sarcomas from leiomyomas. *Anticancer Res*. 2019;39(8):3981–3989.

Gockley AA, Rauh-Hain JA, Carmen MG. Uterine leiomyosarcoma: A review article. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24(9):1538–1542.

Graaff MA, Rooij MAJ, van den Akker BEWM, Gelderblom H, Chibon F, Coindre J-M, et al. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer*. 2016;114(11): 1219-1226.

Gu X, Jin R, Mao X, Wang J, Yuan J, Zhao G. Prognostic value of miRNA-181a/b in colorectal cancer: a meta-analysis. *Biomark Med*. 2018;12(3): 299–308.

Guan Y, Guo L, Zukerberg L, Rueda BR, Styer AK. MicroRNA-15b regulates reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) expression in human uterine leiomyoma. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):45.

Guessous F, Alvarado-Velez M, Marcinkiewicz L, Zhang Y, Kim J, Heister S, et al. Oncogenic effects of miR-10b in glioblastoma stem cells. *J Neurooncol*. 2013;112(2):153-163.

Guled M, Pazzaglia L, Borze I, Mosakhani N, Novello C, Benassi M. S, et al. Differentiating soft tissue leiomyosarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma: A miRNA analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(8):693–

702.

Haak L van den; Kroon CD, Warmerdam M, Siebers AG, Rhemrev JP, Nieboer TE, et al. Incidence and groups at risk for unexpected uterine leiomyosarcoma: a Dutch nationwide cohort study. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;299(1):159-165.

Hamberg M, Backes C, Fehlmann T, Hart M, Meder B, Meese E, et al. miRTargetLink—miRNAs, genes and interaction networks. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4): 564.

Han C, Sun LY, Wang WT, Sun YM, Chen YQ. Non-coding RNAs in cancers with chromosomal rearrangements: The signatures, causes, functions and implications. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(10):886–898.

Han, H. RNA interference to knock down gene expression. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. 1706p. 293–302.

Hassan MH, Fouad H, Bahashwan S, Al-Hendy A. Towards non-surgical therapy for uterine fibroids: catechol-O-methyl transferase inhibitor shrinks uterine fibroid lesions in the Eker rat model. *Hum Reprod*. 2011;26(11):3008-3018.

He M, Zhou W, Li C, Guo M. MicroRNAs, DNA damage response, and cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2087.

Heymann D. Bone cancer: Primary bone cancers and bone metastases. *Anticancer Res*. 2015;35(7):4373.

Hoang HLT, Ensor K, Rosen G, Pachter HL, Raccuia JS. Prognostic factors and survival in patients treated surgically for recurrent metastatic uterine

leiomyosarcoma. *Int J Surg Oncol*. 2014;2014:919323.

Hosseinhali N, Aghapour M, Duijf PHG, Baradaran B. Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5574-5588.

Huang Q, Song Q, Zhong W, Chen Y, Liang L. MicroRNA-10b and the clinical outcomes of various cancers: A systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2017;474:14–22.

Ikhen DE, Bulun SE. Literature review on the role of uterine fibroids in endometrial function. *Reprod Sci*. 2018;25(5):635–643.

Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065–7070.

Islam MS, Ciavattini A, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P. Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Hum Reprod Update*. 2018;24(1):59–85.

Ji W, Sun B, Su C. Targeting microRNAs in cancer gene therapy. *Genes*. 2017;8(1):21.

Jia Y, Lin R, Jin H, Si L, Jian W, Yu Q, et al. MicroRNA-34 suppresses proliferation of human ovarian cancer cells by triggering autophagy and apoptosis and inhibits cell invasion by targeting Notch 1. *Biochimie*. 2019;160:193–199.

Jiang S. Recent findings regarding let-7 in immunity. *Cancer Lett*. 2018;434:130–131.

Johnson JL. Elucidating the contributory role of microRNA to cardiovascular diseases (a review). *Vascul Pharmacol.* 2019;114:31-48.

Jonigk D, Izykowski N, Maegel L, Schormann E, Maecker-Kolhoff B, Laenger F, et al. MicroRNA expression in Epstein-Barr virus-associated post-transplant smooth muscle tumours is related to leiomyomatous phenotype. *Clin Sarcoma Res.* 2013;3:9.

Juhasz-Böss I, Gabriel L, Bohle RM, Horn LC, Solomayer E-F, Breitbach G-P. Uterine leiomyosarcoma. *Oncol Res Treat.* 2018;41(11):680–686.

Kadri S, Hinman V, Benos PV. HHMMiR: Efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models. *BMC Bioinformatics.* 2009;10(s1):1–12.

Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, Omranipour R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):17981.

Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev.* 2013;34(1):130-162.

Kim WY, Chang S-J, Chang K-H, Yoon J-H, Kim JH, Kim B-G, et al. Uterine leiomyosarcoma: 14-year two-center experience of 31 cases. *Cancer Res Treat.* 2009;41(1): 24–28.

Kinkel K, Ascher SM, Reinhold C. *Diseases of the abdomen and pelvis 2018-2021*. Suíça: Springer Open; 2018. 3, 21-33: Benign disease of the uterus.

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

Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto A-M, Leminen A. Immunohistochemical studies on uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma, and endometrial stromal sarcoma: expression and prognostic importance of ten different markers. *Tumor Biol.* 2011;32(3):451–459.

Kowalewska M, Bakula-Zalewska E, Chechlinska M, Goryca K, Nasierowska-Guttmejer A, Danska-Bidzinska A, et al. microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. *Tumour Biol.* 2013;34(4):2153–2160.

Kronski E, Fiori ME, Barbieri O, Astigiano S, Mirisola V, Killian PH, et al. MiR181b is induced by the chemopreventive polyphenol curcumin and inhibits breast cancer metastasis via down-regulation of the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Mol Oncol.* 2014;8(3):581–595.

Kumar M, Sahu SK, Kumar R, Subuddhi A, Maji RK, Jana K, et al. MicroRNA let-7 modulates the immune response to mycobacterium tuberculosis infection via control of A20, an inhibitor of the NF- κ B pathway. *Cell Host Microbe.* 2015;17(3):345-356.

Kumari S, Nie J, Chen H-S, Ma H, Stewart R, Li X, et al. Evaluation of gene association methods for coexpression network construction and biological knowledge discovery. *PloS One.* 2012;7(11):e50411.

Kuperman T, Gavriel M, Gotlib R, Zhang Y, Jaffa A, Elad D, et al. Tissue-engineered multi-cellular models of the uterine wall. *Biomech Model Mechanobiol.* 2020;19(5):1629-1639.

Laganà AS, Vergara D, Favilli A, La Rosa VL, Tinelli A, Gerli S, et al. Epigenetic and genetic landscape of uterine leiomyomas: a current view over a common gynecological disease. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;296(5):855-867.

Lazzarini R, Caffarini M, Carpinì, GD, Ciavattini A, Di Primio R, Orciani M. From 2646 to 15: differentially regulated microRNAs between progenitors from normal myometrium and leiomyoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;222(6):596.e1-596.e9.

Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell.* 2016;7(2):100–113.

Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer.* 2004;101(6):1455–1462.

Lethaby A, Puscasiu L, Vollenhoven B. Preoperative medical therapy before surgery for uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;2017(11):CD000547.

Li B, Guo X, Li N, Chen Q, Shen J, Huang X, et al. WNT1, a target of miR-34a, promotes cervical squamous cell carcinoma proliferation and invasion by induction of an E-P cadherin switch via the WNT/ β -catenin pathway. *Cell Oncol.* 2020;43(3):489–503.

Li JG, Ding Y, Huang YM, Chen WL, Pan LL, Li Y, et al. FAMLF is a target of miR-181b in Burkitt lymphoma. *Braz J Med Biological Res.* 2017;50(6):e5661.

Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J, Xie X. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Experim Med.* 2013;13(2):109–117.

Li Y, Ren H, Wang J. Outcome of adjuvant radiotherapy after total hysterectomy in patients with uterine leiomyosarcoma or carcinosarcoma: a SEER-based study. *BMC Cancer.* 2019;19(1):697.

Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Disc.* 2014;13(8):622–638.

Liang S, He L, Zhao X, Miao Y, Gu Y, Guo C, et al. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *PLoS One.* 2011;6(4):e18409.

Lin YH. MicroRNA networks modulate oxidative stress in cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4497.

Lintel NJ, Luebker SA, Lele SM, Koepsell SA. MVP immunohistochemistry is a useful adjunct in distinguishing leiomyosarcoma from leiomyoma and leiomyoma with bizarre nuclei. *Hum Pathol.* 2018;73:122–127.

Liu B, Guo Z, Gao W. miR-181b-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts through regulating the MEK/ERK/p21 pathway. *Experim Therap Med.* 2019;17(3):1537-1544.

Liu J, Shi W, Wu C, Ju J, Jiang J. miR-181b as a key regulator of the oncogenic

process and its clinical implications in cancer (review). *Biomed Rep.* 2014;2(1):7-11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 2001;25:402-408.

Loizzi V, Cormio G, Nestola D, Falagario M, Surgo A, Camporeale A, et al. Prognostic factors and outcomes in 28 cases of uterine leiomyosarcoma. *Oncology.* 2011;81(2):91–97.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194–1217.

Lu Y, Chan Y-T, Tan H-Y, Li S, Wang N, Feng Y. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer.* 2020a;19(1):79.

Lu YJ, Wang H, Fang LY, Wang WJ, Song W, Wang Y, et al. A nomogram for predicting overall survival in patients with uterine leiomyosarcoma: A SEER population-based study. *Future Oncol.* 2020b;16(10):573–584.

Lu Y, Yao J, Yu J, Wei Q, Cao X. The association between abnormal microRNA-10b expression and cancer risk: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;4(1):7498.

Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol.* 2010;28(4):41–47.

Markopoulos G, Roupakia E, Tokamani M, Alabasi G, Sandaltzopoulos R, Marcu K, et al. Roles of NF- κ B Signaling in the Regulation of miRNAs Impacting on

Inflammation in Cancer. *Biomedicines*. 2018;6(2):40.

Mas A, Alonso R, Garrido-Gómez T, Escorcía P, Montero B, Jiménez-Almazán J, et al. The differential diagnoses of uterine leiomyomas and leiomyosarcomas using DNA and RNA sequencing. *Am J Obstet Gynecol*. 2019;221(4):320.e1-320.e23.

Mbatani N, Olawaiye AB, Prat J. Uterine sarcomas. *Int J Gynecol Obstet*. 2018;143:51–58.

McWilliams MM, Chennathukuzhi VM. Recent advances in uterine fibroid etiology. *Sem Reprod Med*. 2017;35(2):181–189.

Meerson A, Eliraz Y, Yehuda H, Knight B, Crundwell M, Ferguson D, et al. Obesity impacts the regulation of miR-10b and its targets in primary breast tumors. *BMC Cancer*. 2019;19(1):86.

Mendel JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2013;148(6):1172–1187.

Meng Y, Yang Y, Zhang Y, Li X. Construction and validation of nomograms for predicting the prognosis of uterine leiomyosarcoma: A population-based study. *Med Sci Monit*. 2020;26:e922739-1.

Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;98:12-23.

Mittal, K.; Joutovsky, A. Areas with benign morphologic and immunohistochemical features are associated with some uterine

leiomyosarcomas. **Gynecologic oncology**, v. 104, n. 2, p. 362–5, fev. 2007.

Mittal K, Popiolek D, Demopoulos RI. Uterine myxoid leiomyosarcoma within a leiomyoma. *Human Pathology*. 2000;31(3):398–400.

Mittal KR, Chen F, Wei JJ, Rihvani K, Kurvathi R, Streck D, et al. Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas. *Mod Pathol*. 2009;22(10):1303–1311.

Miyata T, Sonoda K, Tomikawa J, Tayama C, Okamura K, Maehara K, et al. Genomic, epigenomic, and transcriptomic profiling towards identifying omics features and specific biomarkers that distinguish uterine leiomyosarcoma and leiomyoma at molecular levels. *Sarcoma*. 2015;2015:412068.

Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73(22):6554-6562.

Navarro A, Yin P, Ono M, Monsivais D, Moravek MB, Coon, JS, et al. 5-Hydroxymethylcytosine promotes proliferation of human uterine leiomyoma: a biological link to a new epigenetic modification in benign tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11): E2437-2445.

Abeshouse A, Adebamowo C, Adebamowo SN, Akbani R, Akeredolu T, Ally A, et al. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell*. 2017;171(4):950-965.

NIH - National Institutes of Health [on-line]. About uterine fibroids | NICHD - National Institute of Child Health and Human Development; 2018 [citado 18 maio

2020]. Disponível em:

<https://www.nichd.nih.gov/health/topics/uterine/conditioninfo>.

Nothnick WB. Non-coding RNAs in uterine development, function and disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016;886:171-189.

Oh J, Park SB, Park HJ, Lee ES. Ultrasound features of uterine sarcomas. *Ultrasound Q*. 2019;35(4):376–384.

Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, et al. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*. 2014;28(5):438–450.

Ono M, Bulun SE, Maruyama T. Tissue-specific stem cells in the myometrium and tumor-initiating cells in leiomyoma. *Biol Reprod*. 2014;91(6):149.

Paik ES, Kang JH, Kim J, Lee Y-J, Choi CH, Kim T-J, et al. Prognostic factors for recurrence and survival in uterine leiomyosarcoma: Korean single center experience with 50 cases. *Obstet Gynecol Sci*. 2019;62(2):103-111.

Paik ES, Yoon A, Lee YY, Kim TJ, Lee JW, Bae DS, et al. Pulmonary metastasectomy in uterine malignancy: Outcomes and prognostic factors. *J Gynecol Oncol*. 2015;26(4):270–276.

Park HS, Park JM, Park S, Cho J, Kim SII, Park B-W. Subcellular localization of Mdm2 expression and prognosis of breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2013;19(5):842-851.

Parra-Herran C, Howitt BE. Uterine mesenchymal tumors. *Surg Pathol Clin*.

2019;12(2):363–396.

Patel D, Handorf E, von Mehren M, Martin L, Moww S. Adjuvant chemotherapy in uterine leiomyosarcoma: Trends and factors impacting usage. *Sarcoma*. 2019; 2019:3561501.

Pérot G, Croce S, Ribeiro A, Lagarde P, Velasco V, Neuville A, et al. MED12 alterations in both human benign and malignant uterine soft tissue tumors. *PloS One*. 2012;7(6):e40015.

Ptáková N, Miesbauerová M, Kos J, Grossmann P, Henrieta Š. Immunohistochemical and selected genetic reflex testing of all uterine leiomyosarcomas and STUMPs for ALK gene rearrangement may provide an effective screening tool in identifying uterine ALK-rearranged mesenchymal tumors. *Virchows Arch*. 2018;473(5):583-590.

Ray-Coquard I, Serre D, Reichardt P, Martín-Broto J, Bauer S. Options for treating different soft tissue sarcoma subtypes. *Future Oncol*. 2018;14(10s):25–49.

Ricci S, Giuntoli RL, Eisenhauer E, Lopez MA, Krill L, Tanner EJ, et al. Does adjuvant chemotherapy improve survival for women with early-stage uterine leiomyosarcoma? *Gynecol Oncol*. 2013;131(3):629–633.

Rizzo A, Nigro MC, Ramponi V, Gallo C, Perrone AM, De Iaco P, et al. Skull metastasis from uterine leiomyosarcoma, a rare presentation for a rare tumor: A case report and review of the literature. *Front Oncol*. 2020;10:869.

Rizzo A, Pantaleo MA, Saponara M, Nannini M. Current status of the adjuvant

therapy in uterine sarcoma: A literature review. *World J Clin Cases*. 2019;7(14):1753-1763.

Roberts ME, Aynardi JT, Chu CS. Uterine leiomyosarcoma: A review of the literature and update on management options. *Gynecol Oncol*. 2018;151(3) 562–572.

Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(11):1444–1455.

Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010;116(6):945–952.

Rubisz P, Ciebiera M, Hirnle L, Zgliczyńska M, Łoziński T, Dzięgiel P, et al. The usefulness of immunohistochemistry in the differential diagnosis of lesions originating from the myometrium. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1136.

Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. MiRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer Discov*. 2016;6(3):235–246.

Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):203–221.

Sandiford OA, Moore CA, Du J, Boulad M, Gergues M, Eltouky H, et al. Human aging and cancer: Role of miRNA in tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol*.

2018;1056:137–152.

Santamaria X, Taylor H. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1545–1551.

Santulli P, Borghese B, Lemaréchal H, Leconte M, Millischer A-E, Batteux F, et al. Increased serum oxidative stress markers in women with uterine leiomyoma. *PLoS One*. 2013;8(8):e72069.

Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Lee L, Okada M, et al. Identification of uterine leiomyoma-specific marker genes based on DNA methylation and their clinical application. *Sci Rep*. 2016;6:30652.

Schiavon BN, Carvalho KC, Coutinho-Camilo CM, Baiocchi G, Valieris R, Drummond R, et al. miRNAs 144-3p, 34a-5p, and 206 are a useful signature for distinguishing uterine leiomyosarcoma from other smooth muscle tumors. *Surg Experim Pathol*. 2019;2(5):1-8.

Schmid G, Notaro S, Reimer D, Abdel-Azim S, Duggan-Peer M, Holly J, et al. Expression and promotor hypermethylation of miR-34a in the various histological subtypes of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:102.

Schunemann JR E, Dória MT, Souza RT, Spautz CC. New concepts and update review of uterine sarcomas. *Femina*. 2012;40(3):149–154.

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

Segars JH, Parrott EC, Nagel JD, Guo XC, Gao X, Birnbaum LS, et al. Proceedings from the Third National Institutes of Health international congress on advances in uterine leiomyoma research: Comprehensive review, conference summary and future recommendations. *Hum Reprod update*. 2014;20(3):309–333.

Sheedy P, Medarova Z. The fundamental role of miR-10b in metastatic cancer. *Am J Cancer Res*. 2018;8(9):1674-1688.

Shu J, Silva BVRE, Gao T, Xu Z, Cui J. Dynamic and modularized MicroRNA regulation and its implication in human cancers. *Sci Rep*. 2017;7(1):13356.

Singh N, Al-Ruwaisan M, Batra A, Itani D, Ghatage P. Factors affecting overall survival in premenopausal women with uterine Leiomyosarcoma: A retrospective analysis with long-term follow-up. *J Obstet Gynaecol Can*. 2020;42(12):1483-1488.

Slabáková E, Culig Z, Remšík J, Souček K. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3100.

Slomovitz BM, Taub MC, Huang M, Levenback C, Coleman RL. A randomized phase II study of letrozole vs. observation in patients with newly diagnosed uterine leiomyosarcoma (uLMS). *Gynecol Oncol Rep*. 2018;27:1-4.

Sohn GS, Cho S, Kim YM, Cho C-H, Kim M-R, Lee S. R. Current medical treatment of uterine fibroids. *Obstet Gynecol Sci*. 2018;61(2): 192-201.

Stanford University - Stanford University School of Medicine [on-line]. Surgical pathology criteria: leiomyosarcoma of deep soft tissue, retroperitoneum,

mesentery and omentum - Differential diagnosis [21 jul. 2020]. Disponível em: http://surgpathcriteria.stanford.edu/softsmoothmuscle/soft_tissue_leiomyosarcoma/differentialdiagnosis.html.

Stope MB, Cernat V, Kaul A, Diesing K. Functionality of the tumor suppressor microrna-1 in malignant tissue and cell line cells of uterine leiomyosarcoma. *Anticancer Res.* 2018;38(3):1547–1550.

Strotbek M, Schmid S, Sánchez-González I, Boerries M, Busch H, Olayioye MA. miR-181 elevates Akt signaling by co-targeting PHLPP2 and INPP4B phosphatases in luminal breast cancer. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2310–2320.

Suzuki A, Aoki M, Miyagawa C, Murakami K, Takaya H, Kotani Y, et al. Differential diagnosis of uterine leiomyoma and uterine sarcoma using magnetic resonance images: A literature review. *Healthcare.* 2019;7(4):158.

Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. Oncomir or tumor suppressor? the duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res.* 2016;76(13):3666–3670.

Mortezaee FT, Tabatabaiefar MA, Chaleshtori MH, Miraj S. Lack of association between ESR1 and CYP1A1 gene polymorphisms and susceptibility to uterine leiomyoma in female patients of iranian descent. *Cell J.* 2014;16(2):225–230.

Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncol Lett.* 2018;15(3):2735–2742.

Tantitamit T, Huang K-G, Manopunya M, Yen C-F. Outcome and management of uterine leiomyosarcoma treated following surgery for presumed benign disease: Review of literature. *Gynecol Minim Invasive Ther.* 2018;7(2):47–55.

Teixeira J, Rueda BR, Pru JK. StemBook [on-line]. Uterine stem cells; 2008 [citado 18 maio 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27042/>.

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(7):907–914.

Tirumani SH, Deaver P, Shinagare AB, Tirumani H, Hornick JL, George S, et al. Metastatic pattern of uterine leiomyosarcoma: retrospective analysis of the predictors and outcome in 113 patients. *J Gynecol Oncol.* 2014;25(4):306–312.

Torres A, Torres K, Maciejewski R, Harvey WH. MicroRNAs and their role in gynecological tumors. *Med Res Rev.* 2011;31(6):895–923.

Tsigkou A, Reis FM, Lee MH, Jiang B, Tosti C, Centini G, et al. Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertil Steril.* 2015;104(1):170-175.

Tsuyoshi H, Yoshida Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci.* 2018;109(6):1743-1752.

Uduwela AS, Perera MAK, Aiqing L, Fraser IS. Endometrial-myometrial interface: Relationship to adenomyosis and changes in pregnancy. *Obstet Gynecol Sur.* 2000;55(6):390–400.

SBP - Sociedade Brasileira de Patologia [on-line]. Útero neoplasias mesenquimais do corpo uterino [citado 20 jan. 2021]. Disponível em:

<http://www.sbp.org.br/mdlhisto/utero-neoplasias-mesenquimais-corpo-uterino/>.

Välimäki N, Kuisma H, Pasanen A, Heikinheimo O, Sjöberg J, Bützow R, et al. Genetic predisposition to uterine leiomyoma is determined by loci for genitourinary development and genome stability. *ELife*. 2018;7:e37110.

Vilos GA, Allaire C, Laberge PY, Leyland N, Vilos AG, Murji A, et al. The management of uterine leiomyomas. *J Obstet Gynaecol Can*. 2015;37(2):157–178.

Wang B, Hsu S-H, Majumder S, Kutay H, Huang W, Jacob ST, et al. TGF β mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*. 2010;29(12):1787–1797.

Wang B, Jiang L, Xu Q. A comprehensive evaluation for polymorphisms in let-7 family in cancer risk and prognosis: A system review and meta-analysis. *Biosci Rep*. 2018a;38(4):BSR20180273.

Wang J, Sai K, Chen FR, Chen ZP. MiR-181b modulates glioma cell sensitivity to temozolomide by targeting MEK1. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(1):147–158.

Wang, J.; Yan, Y.; Zhang, Z.; Li, Y. Role of miR-10b-5p in the prognosis of breast cancer. *PeerJ*. 2019;7:e7728.

Wang P, Zhai G, Bai Y. Values of miR-34a and miR-218 expression in the diagnosis of cervical cancer and the prediction of prognosis. *Oncol Lett*. 2018b;15(3):3580–3585.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, et al. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(4):336–347.

Wang X, Cao L, Wang Y, Wang X, Liu N, You Y. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett*. 2012;3(5):955–960.

Wang Y, Zhang X, Chao Z, Kung H-F, Lin MC.; Dress A, et al. MiR-34a modulates ErbB2 in breast cancer. *Cell Biol Inter*. 2017;41(1):93–101.

Welponer H, Tsibulak I, Wieser V, Degasper C, Shivalingaiah G, Wenzel S, et al. The miR-34 family and its clinical significance in ovarian cancer. *J Cancer*. 2020;11(6):1446–1456.

Williams ARW. Uterine fibroids - what's new? *F1000Research*. 2017;6:2109.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228–234.

Wu X, Blanck A, Olovsson M, Möller B, Lindblom B. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1 and FGF receptor 2 in uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle, after menopause and GnRHa treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(6):497-504.

Xia Y, Gao Y. MicroRNA-181b promotes ovarian cancer cell growth and invasion by targeting LATS2. *Biochem Biophys Research Commun*. 2014;447(3):446–451.

Xie J, Xu X, Yin P, Li Y, Guo H, Kujawa S, et al. Application of ex-vivo spheroid model system for the analysis of senescence and senolytic phenotypes in uterine leiomyoma. *Lab Invest*. 2018;98(12):1575-1587.

Yang C-Y, Liao J-Y, Huang W-J, Chang Y-T, Chang M-C.; Lee J-C, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am J Transl Res*. 2015;7(10):2072–2081.

Yang Q, Mas A, Diamond MP, Al-Hendy A. The mechanism and function of epigenetics in uterine leiomyoma development. *Reprod Sci*. 2016;23(2):163–175.

Yasutake N, Ohishi Y, Taguchi K, Hiraki Y, Oya M, Oshiro, Y, et al. Insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein-3 is an independent prognostic factor in uterine leiomyosarcoma. *Histopathology*. 2017;12(10):3218–3221.

Yin P, Lin Z, Reierstad S, Wu J, Ishikawa H, Marsh EE, et al. Krüppel-like transcription factor 11 integrates progesterone receptor signaling and proliferation in uterine leiomyoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(4):1722-1730.

Yu M, Xu Y, Pan L, Feng Y, Luo K, Mu Q, et al. miR-10b downregulated by dna methylation acts as a tumor suppressor in hpv-positive cervical cancer via targeting tiam1. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(4):1763–1777.

Zang Y, Dong M, Zhang K, Gao C, Guo, F, Wang Y, et al. Hormonal therapy in uterine sarcomas. *Cancer Med*. 2019;8(4):1339-1349.

Zeng L, Yang K, Liu H, Zhang G. A network pharmacology approach to investigate the pharmacological effects of Guizhi Fuling Wan on uterine fibroids.

Exp Ther Med. 2017;14(5):4697-4710.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.

Zhang J, Yang J, Zhang X, Xu J, Sun Y, Zhang P. MicroRNA-10b expression in breast cancer and its clinical association. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192509.

Zhang P, Zhang C, Hao J, Sung CJ, Quddus MR, Steinhoff MM, et al. Use of X-chromosome inactivation pattern to determine the clonal origins of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Hum Pathol.* 2006;37(10):1350–1356.

Zhang Y, Liao R-B, Hu L-L, Tong B-X, Hao T-F, Wu H-J. The microRNA miR-10b as a potentially promising biomarker to predict the prognosis of cancer patients : a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(61):104543–104551.

Zhang Z, Sun C, Li C, Jiao X, Griffin BB, Dongol S, et al. Upregulated MELK leads to doxorubicin chemoresistance and M2 macrophage polarization via the miR-34a/JAK2/STAT3 pathway in uterine leiomyosarcoma. *Front Oncol.* 2020;10:453.

Zheng Y, Lv X, Wang X, Wang B, Shao X, Huang Y, et al. MIR-181b promotes chemoresistance in breast cancer by regulating Bim expression. *Oncol Rep.* 2016;35(2):683–690.

Zhi F, Wang Q, Deng D, Shao N, Wang R, Xue L, et al. MiR-181b-5p downregulates NOVA1 to suppress proliferation, migration and invasion and promote apoptosis in astrocytoma. *PLoS One.* 2014;9(10):e109124.

Zhu Q, Gong L, Wang J, Tu Q, Yao L, Zhang J-R et al. miR-10b exerts oncogenic activity in human hepatocellular carcinoma cells by targeting expression of CUB

and sushi multiple domains 1 (CSMD1). *BMC Cancer*. 2016;16:806.

Zivanovic O, Leitao MM, Iasonos A, Jacks LM, Zhou Q, Abu-Rustum NR, et al. Stage-specific outcomes of patients with uterine leiomyosarcoma: A comparison of the international Federation of gynecology and obstetrics and american joint committee on cancer staging systems. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2066–2072.

Zota AR, Geller RJ, Vannoy BN, Marfori CQ, Tabbara S, Hu LY, et al. Phthalate exposures and microrna expression in uterine fibroids: The FORGE study. *Epigenet Insights*. 2020;13:2516865720904057.

Zou D, Zhou Q, Wang D, Guan L, Yuan L, Li S. The downregulation of microRNA-10b and its role in cervical cancer. *Oncol Res*. 2016;24(2):99–108.

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

ARTIGOS PUBLICADOS

- **Let-7 miRNA's expression profile and its potential prognostic role in uterine leiomyosarcoma.**

Bruna Cristine de Almeida, Laura Gonzalez dos Anjos, Miyuki Uno, Isabela Werneck da Cunha, Fernando Augusto Soares, Glauco Baiocchi, Edmund Chada Baracat e Kátia Cândido Carvalho. *Cells*. 2019, 8(11).pii: E1452.

- **Expression of CK7 and CDKN2 in cervical intraepithelial neoplasia and correlation with clinical outcome.**

Tatiana Megale De Lima, Gustavo Focchi, **Bruna Cristine De Almeida**, Patricia Belfort-Mattos, Thais Heinke e Neila Maria De Góis Speck. *Anticancer Res*. 2018, 38(12):6681.

- **The TP53 - R72P (rs1042522) polymorphism and risk factors in breast cancer patients.**

Maillene Rodrigues Lisboa, **Bruna Cristine de Almeida**, Henrique Marcus Lisboa Capelasso, Ana Lúcia Escobar e Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva. Aceito para publicação: *Eur J Gynaecol Oncol*. 2018, XXXIX, 6 (impresso).

-
- **Efficacy and effects of transdermal hormone therapy in postmenopausal women.**

Luís Eduardo Prado Correia, **Bruna Cristine de Almeida**, Edmund Chada Baracat,IVALDO SILVA, José Maria Soares Júnior, Claudio Emilio Bonduki e Mauro Abi Haidar. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2018, XLV, 5 (impresso).

- **Could be miRNAs signature useful to uterine sarcomas and carcinosarcomas prognosis and treatment prediction?**

Laura Gonzalez dos Anjos, **Bruna Cristine de Almeida**, Thais de Almeida, André Rocha, Giovana Maffazioli, Fernando Soares, Isabela da Cunha, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho. *Cancers*. 2018, 10(9): 315.

- **Oncomirs expression profiling in uterine leiomyosarcoma cells.**

Bruna Cristine de Almeida, Natalia Garcia, Giovana Maffazioli, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 19(1): 52.

- **IGF-1R and leptin expression profile and the effects of metformin treatment on metabolic and endocrine parameters in PCOS mice.**

Luís Eduardo Prado Correia, **Bruna Cristine de Almeida**, Manuel de Jesus Simões, Mauro Abi Haidar, Daniela Berguio Vidotti, eIVALDO SILVA. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:9058307.

APRESENTAÇÃO DE PÔSTERES

- ***miR-186-5p* overexpression may predict the malignancy risk in uterine smooth muscle tumors.**

Bruna Cristine de Almeida, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Gynecological Endocrinology the 19th World Congress (online), Florença, Itália. 2020.

- ***miR-145-5p* expression can be useful for uterine fibroids and leiomyosarcoma differential diagnosis.**

Laura Gonzalez dos Anjos, **Bruna Cristine de Almeida**, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Gynecological Endocrinology the 19th World Congress (online), Florença, Itália. 2020.

- **INSR and IRS1 regulation by microRNA in uterine smooth muscle tumor cells.**

Isabela de Souza Faria, **Bruna Cristine de Almeida**, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Gynecological Endocrinology the 19th World Congress (online), Florença, Itália. 2020.

-
- **miRNAs with potential application for diagnosis, prognosis and treatment response prediction in uterine smooth muscle tumors**

Bruna Cristine de Almeida, Isabela de Souza Faria, Laura Gonzalez dos Anjos, Giovana De Nardo Maffazioli, Edmund Chada Baracat and Katia Candido Carvalho.

AACR Virtual Annual Meeting II, Estados Unidos da América. 2020.

- **O perfil de expressão dos miRNAs da família *lethal-7 (let-7)* e seu papel no prognóstico em leiomiossarcoma uterino.**

Bruna Cristine de Almeida, Laura Gonzalez dos Anjos, Miyuki Uno, Giovana de Nardo Maffazioli, Thais Gomes de Almeida, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

58º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, Brasil. 2019.

- **miRNAs como potenciais biomarcadores auxiliares no diagnóstico diferencial entre os tipos de sarcomas e carcinossarcomas uterinos.**

Laura Gonzalez dos Anjos, **Bruna Cristine de Almeida**, Giovana de Nardo Maffazioli, Thais Gomes de Almeida, Isabela Werneck da Cunha, Edmund Chada Baracat e Katia Candido carvalho.

58º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, Brasil. 2019.

-
- **Involvement of miRNA expression may contribute for FoxO3a oncogenic role in uterine leiomyosarcoma.**

Natalia Garcia, Anamaria Ritti Ricci, **Bruna Cristine de Almeida**, Thaís Almeida, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

AACR Annual Meeting 2018, Chicago, Estados Unidos da América. 2018.

- **Análise do perfil de expressão de miRNAs potenciais reguladores de CD151 em leiomiossarcoma uterino.**

Bruna Cristine de Almeida, Henderson Júnior Narciso, Natalia Garcia, Laura Gonzalez dos Anjos, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

XXII Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, São Paulo, Brasil. 2017.

- **The Effects of metformin treatment in insulin-related genes expression in polycystic ovary syndrome.**

Luís Prado Correia, **Bruna Cristine de Almeida**, Edmund Chada Baracat, Iváldo Silva, José Maria Soares Júnior, Claudio Emilio Bonduki e Mauro Abi Haidar.

12º Congresso of the European Society of Gynecology, Barcelona, Espanha, 2017.

- **Expressão de oncomirs como potenciais marcadores de agressividade em carcinoma vulvar.**

Kelly Pedrozo Ferreira, **Bruna Cristine de Almeida**, Natalia Garcia, Iara Rodrigues, Rafael Rocha, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Next Frontiers to Cure Cancer, São Paulo, Brasil. 2017.

-
- **miRNAs como possíveis reguladores in vitro de genes da via do sonic hedgehog.**

Natalia Garcia, **Bruna Cristine de Almeida**, Kelly Pedrozo Ferreira, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Next Frontiers to Cure Cancer, São Paulo, Brasil. 2017.

- **Oncomirs expression profiling in uterine leiomyosarcomas cells.**

Bruna Cristine de Almeida, Natalia Garcia, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

AACR International Conference on Translational Cancer Medicine em São Paulo, Brasil. 2017.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS – Apresentação Oral

- **O perfil de expressão dos miRNAs da família *lethal-7 (let-7)* e seu papel no prognóstico em leiomiossarcoma uterino.**

Bruna Cristine de Almeida, Laura Gonzalez dos Anjos, Miyuki Uno, Giovana de Nardo Maffazioli (apresentador), Thais Gomes de Almeida, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

58º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, Brasil. 2019.

-
- Expression of *miR-148a*, *miR-152*, *miR-21* and genetic interactions network in uterine leiomyosarcoma.

Bruna Cristine de Almeida (apresentador), Natalia Garcia, Anamaria Ritti Ricci, Edmund Chada Baracat e Katia Candido Carvalho.

Gynecological Endocrinology the 18th World Congress, Florença, Itália. 2018.