



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *MED12*, DOS
miRNAS MAPEADOS EM 7q22 E DOS CANDIDATOS A
REGULAÇÃO DO GENE *HMGA2* EM LEIOMIOMAS UTERINOS

JULIA BETTE HOMEM DE MELLO

Botucatu - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *MED12*,
DOS miRNAs MAPEADOS EM 7q22 E DOS CANDIDATOS A
REGULAÇÃO DO GENE *HMGA2* EM LEIOMIOMAS
UTERINOS

Mestranda: Julia Bette Homem de Mello

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Genética).

Botucatu - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Mello, Julia Bette Homem.

Caracterização de mutações no gene *MED12*, dos miRNAs mapeados em 7q22 e dos candidatos a regulação do gene *HMGA2* em leiomiomas uterinos / Julia Bette Homem de Mello. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Capes: 20205007

1. Leiomioma uterino. 2. Tumores. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Genética – Expressão. 5. Mutagênese.

Palavras-chave: Expressão gênica; Leiomiomas uterinos; MED12; MicroRNAs; PCR quantitativa em tempo real.

À minha mãe e meu pai, por serem meu exemplo de dedicação, força de vontade, amor e fé. E sempre me ensinarem a nunca desistir e acreditar nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Silvia Regina Rogatto, por ter me dado à oportunidade de aprender tanto com ela e com seu grupo, pelos desafios e oportunidades de crescimento. Onde pude adquirir um aprendizado que levarei para a vida toda.

Aos colegas e amigos do laboratório neogene: Renata, Carol, Tatiane, Sandra, Hellen, Mateus, Juan, Márcia, André, Sara, Deborah, Fabio, Priscila, Vanessa, Máisa, Andréia, Graziela e Rogério. E aos ex-integrantes do laboratório: Ana, Ariane, Fernanda, Francine, Cássia, Priscila, Rodrigo, Fabíola, Luciana, Georgia.

Aos pesquisadores que colaboraram para realização desse trabalho, Dra Anaglória Pontes, Dr. Rafael Malagoli.

Ao Departamento de Genética e a Pós-graduação do IBB, pela oportunidade, ensino, estrutura e formação de excelência.

Ao Hospital do Câncer A.C. Camargo e ao CIPE, pela estrutura, apoio e suporte para desenvolvimento deste estudo.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Silvia e Orlando, e meu irmão Tomás, por darem todo apoio necessário para essa jornada. Assim como para a vida. E por me darem a base necessária para o crescimento, me ensinado os valores da vida.

Aos meus tios Sandra e Murilo, que me acolheram durante o tempo que precisei como meus próprios pais.

Aos meus amigos que estão sempre presentes nos bons e maus momentos, me dando apoio e conselhos nos momentos que mais preciso.

Ao meu namorado, Felipe, que esteve sempre do meu lado, me dando apoio e incentivo nos momentos de dificuldades, e me mostrando um lado novo da vida.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para realização desse estudo.

OBRIGADA.

RESUMO

Leiomiomas uterinos (LU) são tumores benignos de origem mesenquimal frequentes sendo considerados um problema de saúde pública. A desregulação de fatores de crescimento e microRNAs, encurtamento dos telômeros, produção excessiva e desorganizada de matriz extracelular, perda de heterozigose e alterações cromossômicas recorrentes (como deleção em 7q22 e rearranjo cromossômico em 12q15) contribuem para o crescimento dos LU. Uma parcela significativa destes tumores apresenta mutação no gene *MED12*. O presente estudo teve como objetivo avaliar: a presença da mutação no *MED12*; o nível de expressão do *HMGA2* e seus miRNAs preditos (let-7a, miR-26a, miR-26b); o nível de expressão do *cluster* de miRNAs mapeado em 7q22 (miR-25, miR-93 e miR-106b) e a expressão dos genes *BRCA1*, *FANCA* e seus miRNAs preditos. Foram avaliados 85 LU e 34 amostras de miométrio adjacentes obtidos de 54 pacientes submetidos à histerectomia. A análise de expressão por RT-qPCR foi realizada para os miR-let7a, miR-25, miR-93, miR-106b, miR-21, miR-26a, miR-26b, miR-197 e miR-143, utilizando RNU44, RNU48 e U47 como endógenos. Foi também avaliada a expressão dos genes *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA* sendo utilizados como controles endógenos *RPLP0* e *GUSB*. A mutação no *MED12* foi encontrada em 50% (42/85) das amostras. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) dos níveis de expressão do *HMGA2* nos LU comparados ao miométrio adjacente, inclusive nas amostras com presença da mutação em *MED12*. Estes dados sugerem que o aumento de expressão do *HMGA2* e a mutação em *MED12* podem coexistir nestes tumores. Os miRNAs preditos para regular o *HMGA2* apresentaram diminuição dos níveis de expressão: let-7a ($p < 0,001$), miR-26a ($p < 0,001$), miR-26b ($p < 0,001$). A forte correlação negativa entre *HMGA2* e seus miRNAs preditos suporta a evidência de interação entre eles. Os miRNAs mapeados em 7q22, miR-25, miR-93, e miR-106b apresentaram diminuição de expressão ($p = 0.016$; $p = 0.003$; $p < 0,001$, respectivamente) em aproximadamente em 50% dos tumores. Um estudo prévio do grupo e dados da literatura indicam que aproximadamente 15% dos tumores estão envolvidos em perda genômica dessa região. Assim, um outro mecanismo além da deleção em 7q22 pode levar a perda da regulação dos miRs mapeados nesta região. Os genes *BRCA1* e *FANCA* apresentaram aumento de expressão nos LU em comparação com o miométrio adjacente ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente) sugerindo o envolvimento destes genes em LU.

ABSTRACT

Uterine Leiomyomas (UL) are common mesenchymal benign tumors that represent a significant public health problem. The deregulation of growth factors and microRNAs (miRNAs), shortening of telomeres, excessive production of disorganized extracellular matrix, loss of heterozygosity and recurrent chromosomal aberrations (including 7q22 deletion and chromosomal rearrangements in 12q15) have been suggested to contribute to the growth of UL. A significant number of tumors presented mutations of *MED12*. The aims of this study were: to investigate *MED12* mutation; to evaluate the expression levels of *HMGA2* and their miRNAs predicted (let-7a, miR-26a, miR-26b); the expression of miRNAs mapped at 7q22 (miR-25, miR-93, and miR-106b) and the expression levels of *BRCA1*, *FANCA* and their predictive miRNAs. Eighty-five fresh frozen UL and 34 adjacent normal myometrium (MM) were obtained from 54 patients who had undergone a hysterectomy procedure. Quantitative real time RT-PCR was applied to evaluate the expression levels of miRs (miR-let7a, miR-25, miR-93, miR-106b, miR-21, miR-26a, miR-26b, miR-197 and miR-143) using RNU44, RNU48 and U47 as endogenous control and to evaluate the expression of *HMGA2*, *BRCA1* and *FANCA* using *RPLP0* and *GUSB* as endogenous control. We detected 50% (42/85) of samples with *MED12* mutation. A significant overexpression ($p < 0,001$) of *HMGA2* was detected in UL compared with MM, including samples with the presence of *MED12* mutation. These data indicated that overexpression of *HMGA2* may coexist with *MED12* mutation. The miRNAs predicted to regulate *HMGA2* were found significantly downregulated: let-7a ($p < 0,001$), miR-26a ($p < 0,001$), miR-26b ($p < 0,001$). The negative correlation verified between *HMGA2* and their predicted miRNAs support the evidence of interaction between them. The miRNAs mapped at 7q22 (miR-25, miR-93, and miR-106b) were found as downregulated ($p = 0.016$; $p = 0.003$; $p < 0,001$, respectively) in about 50% of samples. The previous study revealed genomic loss involving 7q22 in 15% of UL. Therefore, other mechanisms than deletion in 7q22 can lead to miRNAs down-expression in UL. *BRCA1* and *FANCA* overexpression were detected in UL in comparison with MM ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectively) suggesting the involvement of these genes in UL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletróferogramas resultantes do sequenciamento do gene <i>MED12</i>	40
Figura 2	Eletróferogramas resultantes do sequenciamento do gene <i>MED12</i>	41
Figura 3	Expressão relativa de <i>HMGA2</i> , <i>BRCA1</i> e <i>FANCA</i> , avaliados por RT-qPCR em amostras de leiomiomas uterinos e miométrios adjacentes.....	43
Figura 4	Níveis dos transcritos de <i>BRCA1</i> segundo: A. Idade; B. Idade da menarca; C. Fase do ciclo; D. IMC; E. Número de tumores; F. História familiar de câncer; G. Raça; H. Número de gestações.....	45
Figura 5	Níveis dos transcritos de <i>FANCA</i> segundo: A. Idade; B. Idade menarca; C. Fase do ciclo; D. IMC; E. Número de tumores; F. História familiar de câncer; G. Raça; e H. Número de gestações.....	46
Figura 6	Níveis dos transcritos de <i>HMGA2</i> segundo: A. Idade; B. Idade da menarca; C. Fase do Ciclo; D. IMC; E. Número de tumores; F. História familiar de câncer; G. Raça; e H. Número de gestações.....	47
Figura 7	Análise de correlação entre os genes e a idade: A. <i>HMGA2</i> ; B. <i>BRCA1</i> ; C. <i>FANCA</i> . Análise de correlação entre os genes: D. <i>BRCA1</i> e <i>FANCA</i>	48
Figura 8	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos (RNU44, U47, RNU48, miR-16, miR-23b, RNU6B) candidatos a normalizadores.....	50

Figura 9	Determinação do número adequado dos transcritos (miR-16, miR-23b, RNU6B, RNU44, U47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados.....	51
Figura 10	Expressão relativa dos miRNAs: A. miR-106b (<i>HMGA2</i>); B. miR-25; C. miR-93 (<i>HMGA2</i>); D. miR-21; E. let-7a (<i>HMGA2</i>); F. miR-26a (<i>HMGA2</i> , <i>FANCA</i>); G. miR-26b (<i>HMGA2</i> , <i>FANCA</i>); H. miR-197 (<i>BRCA1</i>); I. miR-143 (<i>BRCA1</i>) avaliados por RT-qPCR em amostras de leiomiomas uterinos (N=77) e miométrio (N=19).....	52
Figura 11	Níveis de expressão dos miRNAs avaliados neste estudo segundo: A. miR-106b e fase do ciclo; B. miR-25 e fase do ciclo; C. miR-26a e idade; D. miR-143 e fase do ciclo; E. miR-26b e fase do ciclo; F. Análise de correlação entre o miR-143 e idade.....	55
Figura 12	Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs: A. miR-106b e miR-25; B. miR-106b e miR-93; C. miR-106b e let-7a; D. miR-106b e miR-21; E. miR-106b e miR-26a; F. miR-106b e miR-26b; G. miR-106b e miR-197; H. miR-106b e miR-143; I. miR-25 e miR-93; J. miR-25 e let-7a; K. miR-25 e miR-21; L. miR-25 e miR-26b; M. miR-25 e miR-197; N. miR-25 e miR-143; O. miR-93 e miR-21.....	56
Figura 13	Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs: A. miR-93 e miR-26b; B. miR-93 e miR-197; C. miR-93 e miR-143; D. let-7a e miR-26b; E. let-7a e miR-197; F. miR-21 e miR-26a; G. miR-21 e miR-26b; H. miR-21 e miR-197; I. miR-21 e miR-143; J. miR-26a e miR-26b; K. miR-26a e miR-197; L. miR-26a e miR-143; M. miR-26b e miR-197; N. miR-26b e miR-143; O. miR-197 e miR-143.....	57

Figura 14 Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs e genes: **A.** *ERS1* e miR-26b; **B.** *ERS1* e miR-143; **C.** *ERS1* e *FANCA*; **D.** *PGR* e miR-25; **E.** *PGR* e miR-93; **F.** *PGR* e miR-26b; **G.** *PGR* e *HMGA2*; **H.** *PGR* e *FANCA*..... 59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Relação dos relatos em literatura que utilizaram análises de CGH array em Leiomiomas Uterinos, as diferentes plataformas utilizadas e os principais resultados.....	11
Quadro 2	Resultados da análise de correlação (Teste de Pearson) obtidos entre as comparações com os níveis de expressão do miRNAs avaliados no estudo.....	54
Quadro 3	Resultados da análise de correlação (R) (teste de Pearson) e significância estatística (P) obtidos entre as comparações com os níveis de expressão dos miRNAs e genes.....	58
Tabela 1	Iniciador utilizado nas reações de amplificação do exon 2 do gene <i>MED12</i>	30
Tabela 2	Sequências dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica.....	32
Tabela 3	Descrição dos miRNAs selecionados para análise de expressão por RT-qPCR.....	33
Tabela 4	Dados obtidos da análise de mutação no gene <i>MED12</i> em 85 amostras de LU e a comparação entre os resultados descritos em literatura.....	39
Tabela 5	Expressão relativa, fator de normalização e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos seis transcritos (miR-16, miR-23b, RNU6B, RNU44, U47 e RNU48) candidatos a normalizadores que foram testados no estudo.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CGH*	do inglês <i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CNA*	alterações no número de cópias, do inglês <i>Copy Number Alteration</i>
dNTP*	do inglês <i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>
FH*	do inglês <i>Fumarate Hydratase</i>
FISH*	do inglês <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
GnRHa*	do inglês <i>Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist</i>
HLRCC	Síndrome Hereditária de Leiomiomatose e Câncer de Células Renais
HMG*	do inglês <i>High Mobility Group</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
IPA*	do inglês <i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
IR*	do inglês <i>Insulin Receptor</i>
LMS	Leiomiosarcoma Uterino
LOH*	Perda de Heterozigose, do inglês <i>Loss of Heterozygosity</i>
LU	Leiomioma Uterino
MEC	Matriz Extracelular
miRNA*	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
qPCR*	do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RISC*	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RT-qPCR*	do inglês <i>Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SNV	do inglês <i>Single Nucleotide Variants</i>
SPRM*	do inglês <i>Selective Progesterone Receptor Modulators</i>
SPSS*	do inglês <i>Statistics Packet for Social Sciences</i>
STUMP*	do inglês <i>Smooth Muscle Tumors with Uncertain Malignant Potential</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Fatores de risco associados ao desenvolvimento de Leiomiomas Uterinos	3
Ação de Hormônios Esteroides e Fatores de Crescimento	4
Alterações Citogenéticas em Leiomiomas Uterinos.....	7
Alterações Moleculares em Leiomiomas Uterinos.....	8
MED12 e Leiomiomas Uterinos.....	11
HMGA2 e Leiomiomas Uterinos.....	13
Micro RNAs e associação com tumores	16
HMGA2, microRNAs e Leiomiomas uterinos	20
 JUSTIFICATIVA.....	 23
 OBJETIVOS	 25
<i>Objetivos Gerais</i>	<i>26</i>
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>26</i>
 MATERIAL E MÉTODOS.....	 27
Casuística.....	28
Características clínicas e histopatológicas.....	28
Extração de DNA	29
Extração de RNA	29
Sequenciamento do gene MED12	29
Análise de Expressão dos Transcritos FANCA, BRCA1 e HMGA2.....	30
<i>Obtenção do cDNA</i>	<i>30</i>
<i>RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão gênica.....</i>	<i>31</i>
Análise de expressão de MicroRNAs (miRNA).....	32
<i>Obtenção do cDNA</i>	<i>33</i>
<i>RT-qPCR para análise de expressão de miRNAs</i>	<i>34</i>
Seleção dos microRNAs de referência para a normalização de RT-qPCR	34
Análise dos Resultados	34
Análise funcional – IPA	35

RESULTADOS.....	37
Análise de mutações do gene <i>MED12</i>	38
Expressão relativa dos genes alvos <i>HMGA2</i>, <i>BRCA1</i> e <i>FANCA</i>	42
<i>Expressão relativa dos genes e as variáveis clínicas e histopatológicas</i>	<i>44</i>
Expressão relativa dos miRNAs: miR-106b, miR-25, miR-93, miR-21, let-7a, miR-26a, miR-26b, miR-143 e miR-197	49
<i>Escolha das referências para a normalização de RT-qPCR dos miRNAs.....</i>	<i>49</i>
<i>Expressão diferencial dos miRNAs entre as amostras de leiomiomas uterinos e miométrio adjacente</i>	<i>51</i>
<i>Expressão relativa dos miRNAs e as variáveis clínicas e histopatológicas</i>	<i>53</i>
<i>Correlação dos resultados com dados obtidos de estudo prévio de expressão gênica de receptores de estrógeno e progesterona</i>	<i>58</i>
 DISCUSSÃO	 60
 CONCLUSÕES.....	 72
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	 75
 ANEXOS	 90

Introdução

Leiomiomas uterinos (LU) constituem a neoplasia benigna mais frequente do trato reprodutor feminino. Estes tumores são formados por alterações em células do músculo liso do miométrio e enriquecidos em matriz extracelular (MEC) contendo colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Parker, 2007).

A maioria dos LU apresenta um padrão típico caracterizado pela presença de amplos feixes de células musculares lisas que se entrelaçam em diferentes direções, sem atipias, necrose ou mitoses permeadas e com quantidade variável de colágeno e vasos sanguíneos. A classificação histológica dos LU varia de acordo com o número e a morfologia das células musculares sendo subdivididos em típico (ou usual), epitelióide, mixóide, vascular, Schwanóide, lipoleiomioma e formas mais raras, como com células hematopoiéticas (Febrasgo, 2004).

Os LU afetam aproximadamente 60% das mulheres em idade reprodutiva e podem ocorrer 80% delas em durante a vida (Levy et al., 2012). A maioria dos LU é assintomática, porém cerca de 20% apresenta manifestações clínicas, as quais estão relacionadas com a localização, o tamanho e o número de tumores, podendo assim pressionar órgãos adjacentes. Outros sintomas característicos incluem dores abdominais, sangramento excessivo, infertilidade e abortos recorrentes (Carlson et al., 1994; Kjerulff et al., 1996; Coronado et al., 2000; Flake et al., 2003; Bozzini, 2004; Levy et al., 2012). Frequentemente são encontrados tumores múltiplos no mesmo útero, clonalmente distintos entre si (Canevari et al., 2005a; Viswanathan et al., 2007).

Os tumores múltiplos possuem grande heterogeneidade, podendo apresentar diferentes taxas de crescimento ou regressão. Um estudo acompanhou o tamanho de 262 LU de 72 pacientes, e concluiu que leiomiomas de uma mesma mulher podem apresentar diferentes taxas de crescimento podendo, em alguns casos, apresentar uma regressão espontânea (Peddada et al., 2008). Em um período de 6 meses, os tumores demonstraram uma taxa de crescimento médio de 9%. Este crescimento não estava relacionado com a localização e com o tamanho do tumor, entretanto, o número de tumores presentes no útero parece influenciar a taxa de crescimento, sendo que tumores únicos apresentaram maior taxa de crescimento. Os autores também verificaram que a taxa de crescimento diminui com a idade em mulheres caucasianas, mas não em mulheres afro-descententes (Peddada et al., 2008).

Os LU podem se apresentar em região submucosa (abaixo da mucosa uterina, imediatamente adjacente à cavidade uterina), intramural (completamente dentro da parede uterina), subserosa (abaixo da serosa, distorcendo o contorno da superfície externa do útero) ou serem pedunculares (o qual se encontra anexado ao útero por um

pêndulo) (Cotran et al., 1989). Pacientes com tumores localizados na região submucosa apresentam uma taxa de interrupção da implantação do embrião de 33-70%, e uma taxa de redução de gravidez clínica em torno de 67%. Há discrepância em literatura quanto aos tumores localizados na região intramural. Somigliana e colaboradores (2011) não encontraram associação entre esta localização tumoral e a gravidez, implantação embrionária e o parto, porém eles destacam algumas limitações no estudo, como a inclusão de pacientes com LU subseroso e também a falta de separação dos tumores de acordo com seu tamanho. Entretanto, Hart e colaboradores (2001) demonstraram uma redução na implantação embrionária e no curso da gravidez quando comparado com os controles (Implantação: 11.9 % vs. 20.2 %; $p=0.018$; Curso da gravidez: 15.1% vs. 28.3 %; $p=0.003$), esse achado foi confirmado por estudos posteriores (Stovall et al., 1998; Khalaf et al., 2006). Apesar dos achados conflitantes, uma revisão de 65 estudos sobre o impacto dos LU intramurais mostrou concordância sobre o impacto desses tumores (de tamanho $\geq 3\text{cm}$) na implantação embrionária e no percurso da gravidez. (Levy et al., 2012). Neste estudo também foi relatado que há evidências que os LU localizados na região subserosa (50% ou mais do volume total abaixo da serosa uterina) não afetam a implantação embrionária e a gravidez clínica (Levy et al., 2012).

O diagnóstico diferencial do tumor é feito, em geral, pela associação de dados de anamnese, exames ginecológicos e de imagem. Pode-se detectar ao diagnóstico, endometriose, adenomiose, carcinoma de endométrio, sarcoma uterino, entre outros. Essas afecções podem coexistir com o leiomioma uterino, especialmente a adenomiose e a endometriose (Parker, 2007).

Apesar da sua alta incidência, os tratamentos disponíveis e efetivos para esses tumores são muito limitados. Grande parte das mulheres com sangramento excessivo e dores, optam por cirurgias, devido a falha em tratamentos prévios. O GnRHa (do inglês, *gonadotropin-releasing hormone agonist*) por exemplo, diminui os sintomas e o tamanho tumoral, porém seu uso é recomendado por alguns meses antes da cirurgia, devido aos efeitos colaterais. Os tratamentos que não incluem histerectomia estão associados a um alto índice de recorrência dos sintomas, devido ao crescimento de tumores já existentes ou ao aparecimento de novos, por exemplo, 59% das mulheres necessitam de uma segunda cirurgia após miomectomia (Revisado por Kim e Sefton 2012). Assim, estes tumores são considerados um importante problema de saúde pública, sendo a principal indicação para a histerectomia (Farquhar e Steiner, 2002; Zydan et al., 2007; Jacoby et al., 2010). O governo americano gasta em média, US\$ 2,1 bilhões com histerectomias e miomectomias (Hodge et al., 2008). Em 2011, o Brasil

gastou aproximadamente R\$ 40,6 milhões em 60.190 histerectomias (<http://www.datasus.gov.br>).

Há dados conflitantes em literatura sobre a possibilidade de progressão dos LU para estágios malignos. Em um estudo com uma série de 1332 mulheres submetidas a histerectomia ou miomectomia para leiomiomas sintomáticos, a frequência de sarcomas uterinos (leiomiosarcoma, sarcoma do estroma endometrial e tumor mesenquimal mixóide) foi de 0,23% (Parker et al., 1994). Lee et al. (2005) relataram que 0,1% dos casos de LU progrediu para leiomiosarcoma uterino (LMS), durante a menopausa e em mulheres em torno de 40 anos. No entanto, Anderson et al. (2006) relataram uma associação frequente entre a presença de LU e LMS. Recentemente, Kampjarvi e colaboradores (2012) relataram a presença de uma mutação somática no éxon 2 do gene *MED12* em uma pequena parcela de leiomiosarcomas. Sendo que essa mutação é característica de LU, sugerindo que um subgrupo desses tumores malignos podem se desenvolver a partir de um leiomioma. Entretanto, ainda não foram apresentadas evidências convincentes de que os LU progridem para a estágios malignos. É possível que um pequeno número de casos possa progredir e outros possam coexistir com as lesões malignas.

Apesar da alta incidência desses tumores, a sua etiologia e os fatores envolvidos na sua formação ainda não são totalmente conhecidos. Até o presente, não há um tratamento efetivo para os LU (Islam et al., 2013). A formação e o crescimento desses tumores se dão devido a uma complexa rede envolvendo hormônios sexuais, fatores de crescimento, citocinas e alterações na matriz extracelular que atuam em conjunto para alterar a taxa de proliferação celular, processo fibróide, apoptose e angiogênese (Islam et al., 2013).

Fatores de risco associados ao desenvolvimento de Leiomiomas Uterinos

Alguns fatores já foram associados com o aumento no risco de desenvolvimento dos LU, como a obesidade. Um estudo retrospectivo demonstrou que o risco aumenta aproximadamente 21% a cada 10 Kg ganho na massa corporal (Ross et al., 1986). Mulheres com descendência africana apresentam um risco três vezes maior de desenvolvimento de LU do que as caucasianas, e os tumores são frequentemente maiores, múltiplos e sintomáticos, e apresentam idade menor ao diagnóstico e histerectomia (Okolo, 2008). A incidência cumulativa estimada para o surgimento destes tumores na faixa dos 50 anos é de 80% entre as afro-americanas e aproximadamente 70% para as caucasianas (para revisão Laughlin et al., 2010). Day-Bird e colaboradores

(2003) relataram que entre mulheres com LU com idade superior a 35 anos que nunca engravidaram, 60% são afro-americanas e 40% são brancas. A razão para essa diferença racial ainda não está esclarecida, mas um estudo mostrou associação entre a etiologia da doença a uma alta incidência de polimorfismo no receptor de estrógeno α (Al-Hendy et al., 2006). Outros relatos utilizando métodos genômicos e proteômicos não encontraram a mesma associação com essa divergência racial (Levy et al., 2012). Outros fatores associados são menarca em idade precoce, gravidez tardia, nuliparidade ou número de paridade baixo e o uso de hormônios exógenos, como contraceptivos e terapia de reposição hormonal (Peddada et al., 2008).

A história familiar de leiomiomas uterino foi associada ao aumento no risco de desenvolvimento destes tumores. Existem algumas síndromes de predisposição ao desenvolvimento dos LU, como a Síndrome Hereditária de Leiomiomatose e Câncer de Células Renais (do inglês HLRCC), a qual é autossômica dominante predispondo a formação de leiomiomas de pele e útero e carcinoma de células renais em idade precoce. O gene responsável pela HLRCC é o *FH* (fumarato hidratase). Outra síndrome associada com leiomiomas é a Síndrome de Alport, com mecanismo de herança principal ligado ao cromossomo X e associada com mutações nos genes *COL4A5* e *COL4A6* (Levy et al., 2012).

Ação de Hormônios Esteroides e Fatores de Crescimento

Embora os fatores principais que levam ao desenvolvimento dos LU não estejam claros, existem evidências que apontam o estrógeno e a progesterona como importantes fatores para o crescimento tumoral (Stewart et al., 1994; Rein et al., 1995; Schwartz, 2001; Cook e Walker, 2004). Esses hormônios agem em conjunto para regular a frequência de mitoses em células do miométrio e assim podem influenciar a suscetibilidade destas células a adquirir alterações genéticas (Barbieri e Andersen, 1992; Swartz et al., 2005). A resposta dos LU ao estrógeno é bem estabelecida, contudo, o impacto de sua ação e contribuição para o desenvolvimento destes tumores ainda são desconhecidos (Houston et al., 2001). Esses tumores exibem um crescimento máximo durante a vida reprodutiva feminina quando a secreção de estrógeno é máxima, mostrando um declínio na menopausa e sob outras condições hipo-estrogênicas. Mulheres pós-menopáusicas têm um risco de 70% a 90% menor para o desenvolvimento de LU quando comparadas a mulheres pré-menopáusicas (Schwartz, 2001). Outra evidência que suporta a dependência estrogênica dos LU é o nível elevado de receptores de estrógeno e progesterona encontrados no miométrio adjacente aos

tumores (Brandon et al., 1995; Viville et al., 1997; Al-Hendy et al., 2004).

O papel da progesterona na etiologia dos LU ainda é controverso. Alguns estudos sugerem que a progesterona pode inibir a formação e o crescimento dos LU, porém, outros mostraram que a progesterona estimula o crescimento tumoral (Walker e Stewart, 2005; Ishikawa et al., 2010; Kim e Sefton, 2011). A “hipótese da progesterona” (Rein et al., 1995) é fundamentada pelo aumento da taxa mitótica em LU durante a fase secretória, quando existem picos nos níveis de progesterona (Kawaguchi et al., 1985) e por dados clínicos indicando que as progestinas inibem o efeito terapêutico de agonistas de GnRH.

Ishikawa e colaboradores (2010) demonstraram que tanto o crescimento quanto a manutenção dos LU *in vivo* são dependentes da ação da progesterona. Os autores propuseram um modelo de controle do crescimento de LU, no qual a progesterona atua sobre seu receptor levando a um aumento no volume do tumor, tanto pela proliferação celular, quanto pelo acúmulo de matriz extracelular. O estrógeno não induz a atividade mitótica em LU de humanos *in vivo*, porém, é necessário para o crescimento e manutenção dos tumores, pois induz a atividade do receptor de progesterona, deixando as células sensíveis à progesterona. Outra evidência que reforça essa hipótese é que o tratamento de mulheres pós-menopáusicas com estrógeno e progesterona resulta no aumento da atividade proliferativa dos tumores, equivalente a mulheres pré-menopáusicas, enquanto o tratamento apenas com estrógeno resulta em um aumento significativamente menor na sua proliferação (Kim e Sefton 2012). Um estudo prévio do nosso grupo revelou que LU usuais de mulheres pré-menopáusicas apresentam aumento da expressão gênica e proteica do receptor de progesterona (Cirilo et al., *in preparation*). Contudo, pelo menos em LU de mulheres pós-menopáusicas, a expressão do gene receptor de progesterona foi menor nos LU quando comparados ao miométrio normal (Strissel et al., 2007).

O uso de antiprogestinas ou determinados moduladores de receptores de progesterona tem demonstrado os efeitos mitogênicos da progesterona nos LU. Por exemplo, o RU486, é capaz de reduzir o volume tumoral, o sangramento e as dores abdominais, entretanto, o uso deste medicamento é permitido apenas em casos de abortos legais nos EUA. Mulheres que utilizaram doses diárias de 5 mg de RU486 (em mulheres que tiveram abortos é utilizada uma dose única de 600 mg), e após 6 meses foi verificado uma redução no tamanho tumoral e nos sintomas, 6 meses após o término do tratamento, os tumores voltaram a crescer, porém em uma taxa menor do que os tratados com GnRH α (Eisinger et al., 2005). O SPRM (*selective progesterone receptor*

modulators) também tem sido muito estudado em LU. Estes receptores funcionam como agonistas ou antagonistas para os receptores de progesterona, dependendo do tipo celular e do ambiente molecular. Eles são seletivos, pois podem ocorrer apenas determinadas respostas ao ligante de progesterona, portanto, clinicamente estes medicamentos são promissores, devido aos efeitos colaterais reduzidos em tecidos não alvos (revisado por Kim e Sefton 2012).

Embora exista uma concordância de que os estrógenos e a progesterona estejam envolvidos na etiologia dos LU, estudos de expressão gênica em larga escala revelaram a associação de citocinas e fatores de crescimento, podendo ou não ser ativados por hormônios ovarianos (Catherino e Malik, 2007; Chen et al., 2008). Receptores de fatores de crescimento transmembrânicos podem ser ativados por um ligante extracelular ou um fator de crescimento. Quando da sua ligação com o fator de crescimento, o receptor sofre uma mudança na sua conformação induzindo autofosforilação e ativação de cinases. Alguns relatos tem demonstrado a expressão aumentada do receptor de insulina (*IR*), *IGFRI*, *IGF-II*, *EGF*, *PDGF* e *TGFb* em leiomiomas comparados com o miométrio adjacente. Foi demonstrado também que fatores de crescimento podem induzir a proliferação de células de leiomiomas. Em culturas celulares foi verificada a indução da proliferação das células do LU quando tratados com TGFb1 e PDGF, e em camundongos quando tratados com PDGF (revisado por Kim e Sefton 2012).

Swartz e colaboradores (2005) descreveram que os genes da via IGF1 estrógeno-dependente apresentaram expressão aumentada em células de LU em cultura. Foram relatados outros fatores de crescimento envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos LU, entre eles o mais intensamente estudado é o TGF- β (Sozen e Arici, 2002). Os fatores de crescimento estimulam a proliferação das células do estroma e a angiogênese. Kogan e colaboradores (2005) propuseram o tratamento dos LU baseado na remoção das células tumorais, especialmente as variantes mitoticamente ativas que produzem fatores de crescimento capazes de estimular o crescimento tumoral, por meio de mecanismos autócrinos. Também foi relatada em células de LU a expressão aumentada de genes da via de sinalização *WNT*, entre eles o gene *WNT5b* (Mangioni et al., 2005). Dados recentemente obtidos a partir dos estudos de expressão gênica demonstraram que não somente os esteróides, mas fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e sinalização do ácido retinóico estariam associados ao desenvolvimento dos leiomiomas (Di Lieto et al., 2005; Leppert et al., 2006; Catherino e Malik, 2007; Chen et al., 2008).

Em um estudo brasileiro, Borsari e colaboradores (2010) analisaram o perfil de expressão gênica em 30 LU de pacientes declaradas negras, nulíparas e na fase secretora do ciclo menstrual subdivididas quanto ao tratamento com GnRHa (Goserelin). Quinze pacientes foram tratadas com GnRHa (grupo A) por três meses antes da cirurgia e as outras 15 não foram tratadas (grupo B). A plataforma utilizada foi a Affymetrix® GeneChip Genome 230/2.0 Array, contendo 47.000 sequências entre elas, 38.500 genes humanos já caracterizados. Na comparação entre os dois grupos, foram identificados 33 genes com expressão aumentada (entre eles, *CYR61*, *SULF1*, *HMG1* e *EGR1*) e 65 genes com expressão diminuída (entre eles, *WIF1*). Os autores concluíram que o tratamento com Goserelin modula a expressão de genes que codificam fatores que podem ser alvos da droga.

Alterações Citogenéticas em Leiomiomas Uterinos

Além de genes diferencialmente expressos, várias anormalidades genômicas foram associadas com a patogênese dos LU (Nilbert et al., 1990; Ligon e Morton, 2000; Canevari e Rogatto, 2006; Stewart e Morton, 2006; Rosa et al., 2008). Aproximadamente 60% dos LU possuem cariótipos normais, o restante apresenta anormalidades citogenéticas incluindo translocações entre os cromossomos 12 e 14, trissomia do 12, translocações entre os cromossomos 6 e 10, e deleções dos cromossomos 3 e 7. A t(12;14) é a mais frequente, sendo relatada em 20% dos casos com cariótipos anormais. Em 12q15 está mapeado o gene *HMGA2*, que codifica uma proteína de ligação ao DNA pertencente a um grupo de alta mobilidade e moduladora da proliferação embrionária (revisado por Levy et al., 2012).

Rein e colaboradores (1998) relataram que o tamanho médio de tumores que apresentam anormalidades citogenéticas é estatisticamente maior do que tumores com cariótipos normais (10.2 ± 5.9 e 5.9 ± 4.2 cm, respectivamente; $P=0.001$). Em 1998, Brosens e colaboradores descreveram uma associação entre a frequência de alterações cromossômicas e a localização do tumor. Os LU submucosos possuíam uma frequência significativamente menor de anomalias (12%) quando comparados com os tumores intramurais (35%) e subserosos (29%).

Recentemente, Hodge e colaboradores (2012) realizaram uma análise comparativa entre LU portadores da t(12;14) e sem o rearranjo utilizando experimentos de expressão gênica global. Entretanto, não foi possível verificar uma assinatura molecular capaz de separar os casos com e sem a translocação. Os autores relataram o aumento da expressão do *HMGA2* nos dois grupos tumorais. Utilizando a análise de

agrupamento hierárquico não supervisionado, eles demonstraram que a variabilidade genética constitucional e ambiental da paciente tem um efeito predominante sobre a presença ou ausência de t(12;14) e a del(7q). Nesta análise também foi possível verificar dois *clusters*, um de amostras tumorais e o outro dos miométrios. Foi também observado um agrupamento segundo a presença da t(12;14) e del(7q), sugerindo uma predisposição genética constitutiva diferente para essas alterações somáticas (Hodge et al., 2012).

Schoenmakers e colaboradores (2013) avaliaram dois leiomiomas uterinos, sendo que um deles possuía uma inversão pericêntrica e outro uma inversão paracêntrica, ambas envolvendo 7q22. Foram estabelecidos linhagens celulares destes tumores a partir das quais foram realizadas diversas técnicas, como FISH, *Southern blot* e RT-PCR. Os autores observaram que ambas inversões afetavam o gene *CUX1*, o qual é descrito como um repressor da transcrição. O truncamento da sua proteína na porção terminal leva a uma desestabilização entre a repressão e ativação da transcrição e este processo pode ser um dos eventos primários em LU (Schoenmakers et al., 2013).

Alterações Moleculares em Leiomiomas Uterinos

Existem algumas investigações em literatura que utilizaram CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) cromossômica em amostras de LU, incluindo um estudo de nosso grupo. Packenham e colaboradores (1997) analisaram 14 casos de LU e dois casos apresentaram alterações genéticas incluindo ganhos nos cromossomos 14 (q11.1-q21 e q24-qter) e 19 (p12-pter e q12-13.1) e perdas dos cromossomos 1 e 4. Posteriormente, Rikala e colaboradores (1998) relataram cariótipos normais em cinco amostras de leiomiomas. Levy e colaboradores (2000) relataram em 12 amostras de LU, ganhos preferenciais em 9q43 e no cromossomo 19 e perdas em 7q e 12q. Nosso grupo relatou que 82% dos LU apresentavam alterações cromossômicas com uma frequência significativa de perdas não relatadas anteriormente incluindo as regiões 3q26.29, 7p22.15, 11p15, 11q23.25 e 15q25.26 (Canevari e Rogatto, 2006). Análises de perda de heterozigose e marcadores polimórficos confirmaram o envolvimento destas regiões no desenvolvimento de LU (Canevari et al., 2005b).

Alguns relatos em literatura utilizaram a metodologia CGH array em leiomiomas uterinos. Cho e colaboradores (2005), avaliaram quatro casos de LU e sete casos de LMS. Os autores utilizaram uma plataforma de BACs contendo 1440 sequências genômicas humanas (Macrogen, Korea, <http://www.macrogen.co.kr>) com 2,08 Mb de distância entre os *spots*. Os autores não identificaram alterações em LU,

contudo descreveram a presença de ganhos em 7q36.3, 7q33-q35, 12q13-12q15, e 12q23.3 e perdas homozigotas em 1p21.1, 2p22.2, 6p11.2, 9p21.1, 9p21.3, 9p22.1, 14q32.33 e 14q32.33qter em leiomiosarcomas. Segundo os autores, a provável explicação para a ausência de alterações nos LU poderia ser o pequeno número de sequências presentes na plataforma e/ou a grande distância entre elas (tamanho das sondas). Vanharanta e colaboradores (2007) avaliaram 12 LU de mulheres de diferentes etnias utilizando uma plataforma de *Tiling-Path MicroCGH array* para 7q. Este estudo foi delineado com base em achados que mostraram deleções em 7q em 50% dos leiomiomas com anormalidades citogenéticas (Nilbert et al., 1990) e rearranjos do tipo inversões e translocações envolvendo 7q22 (Fan et al., 1990; Bui and Iselius, 1992). Os autores identificaram uma baixa frequência de deleções (6% dos casos) em 7q22.3-31 e uma nova deleção em 7q, del(7)(q34). Segundo os autores, podem existir diferentes populações com suscetibilidade para desenvolver leiomiomas uterinos “via 7q”. Os genes *SPRK2*, *PUS7*, *RINTI*, *SYPL*, *PBEFI*, *PIK3CG*, *PRKAR2B*, *HBPI*, *COG5*, *GPR22* e *DLD* envolvidos nestas regiões de perda foram avaliados por análise de LOH (perda de heterozigose). Dentre os 11 genes, oito apresentaram perdas. Hodge e colaboradores (2009) utilizaram a técnica de CGH array em seis casos de LU para avaliar alterações no número de cópias de DNA em amostras com del(7q) identificadas previamente por bandamento GTG ou FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*). O miométrio adjacente de cada paciente foi usado como DNA de referência para reduzir a variabilidade individual. Os autores utilizaram a plataforma de oligonucleotídeos da Agilent® 244K (Agilent Technologies). A menor região comumente deletada tinha ~9.5Mb e mapeava a região 7q22.1-q31.1. Os autores também realizaram experimentos de expressão gênica em larga escala utilizando a plataforma de oligonucleotídeos da Affymetrix®. Os autores confirmaram uma diminuição de expressão dos genes mapeados em 7q22.1-q31.1. Estes genes incluem o inibidor de proliferação *HPB1* e *RINT1*, um supressor de tumor envolvido na manutenção da integridade celular e mitose. Os genes centrais de redes biológicas estavam envolvidos no processo de ubiquitinação de proteínas e incluíam *PSMA2*, *PSMB3*, *PSMC2*, *PSMC3*, *UBE2I* e *UBE2J1*. Os autores concluíram que alterações nos processos de ubiquitinação protéica podem ser primordiais no desenvolvimento dos leiomiomas uterinos.

Um estudo do nosso grupo (Cirilo et al., 2012) realizou a análise de 80 LU para alterações genômicas por aCGH. Foram identificadas 27 regiões de ganhos e 18 de perdas genômicas ($P \leq 0.05$) presentes em mais de 10% dos casos sendo excluídas as alterações no número de cópias [CNAs] presentes em mais de 5% de mulheres

brasileiras avaliadas pela mesma metodologia. Todos os cromossomos, exceto o 3 e 21, apresentaram alterações genômicas. Análise hierárquica não supervisionada revelou dois grupamentos: o primeiro apresentava alterações em 2q35, 7q22.1, 19p13.12–p13.11 e 19q13.32–q13.33 ($P<0.01$) enquanto perdas em 7q22.1–q22.2 estavam presentes exclusivamente no segundo grupo ($P<0.01$). Dezoito casos apresentaram perdas envolvendo 7q22.1 onde se mapeiam os genes *MUC17* (propriedades celulares anti-adesivas em células tumorais) e *TRIM56* (função não conhecida). A maioria dos genes mapeados nas regiões alteradas está envolvida na regulação transcricional (15%). Análise funcional *in silico* demonstrou que estes genes já foram descritos previamente em LU como *IGF-1*, TGF-beta e a via de sinalização do receptor de estrógeno.

Neste estudo de Cirilo e colaboradores (2012), também foi realizada a análise do perfil de expressão de 51 amostras de LU. Os dados genômicos e transcriptômicos obtidos foram utilizados para realizar uma análise integrada e o algoritmo usado para a integração dos dados foi o CONEXIC. A partir dessa análise foram identificados 75 genes moduladores. Entre os 75 genes moduladores, 26 apresentavam associação positiva (ganho genômico/aumento de expressão), 3 apresentavam associação negativa (perda genômica/diminuição de expressão), e 45 genes e 1 ORF apresentavam correlação inversa. Os autores fizeram uma busca de predição de genes alvos de miRNAs para identificar quantos desses genes poderiam ser regulados por esse mecanismo. Foram encontrados 30 genes possivelmente regulados pela ação de miRNAs entre os 45 genes com correlação inversa. Foi realizada uma análise de interação proteína-proteína entre os genes moduladores, e os genes *FANCA* e *BRCA1* apresentaram uma forte associação. A partir de uma análise funcional *in silico*, foi observado que os genes *FGFR1* e *IGFBP5* são moléculas alvos de drogas envolvidas na proliferação celular. A expressão dessas proteínas foi avaliada por imunistoquímica, e foi encontrado aumento de expressão em relação ao miométrio normal. Os autores concluíram que o ganho genômico, aumento de expressão e proteico de *FGFR1* e *IGFBP5* podem ter um papel importante na etiologia dos LU, e também são potenciais alvos para desenvolvimento de drogas associadas a proliferação celular (Cirilo et al., 2012).

Quadro 1. Relação dos relatos em literatura que utilizaram análises de CGH array em Leiomiomas Uterinos, as diferentes plataformas utilizadas e os principais resultados.

Referência	Amostras	Plataforma	Principais Resultados	Validação
Cho et al. (2005)	4 LU + 7 LMS	BACs, 1440 sequências	LU: normal LMS: ganhos: 7q36.3, 7q33-q35, 12q13-12q15 e 12q23.3 perdas: 1p21.1, 2p22.2, 6p11.2, 9p21.1, 9p21.3, 9p22.1, 14q32.33 e 14q32.33qter	FISH
Vanharanta et al. (2005)	10 LU com LOH em 7q	BAC , 3452 sequências	perdas: 7q22.3-q31.1	Microarray expressão R
Vanharanta et al. (2007)	12 LU	7q Tiling-Path MicroCGH array	perdas: 7q22.3-31.1, 7q34	qPCR LOH
Hodge et al. (2009)	6 LU com del(7q) FISH	Agilent Human 244K CGH Microarrays	perdas: 7q22.1-q31.1	Microarray expressão IPA
Zavadil et al. (2010)	6 LU	Agilent Human 4x44K CGH Microarrays	perdas: 1p36.33-p36.23, 1p36.33-p34.3, 3p11.2-p11.1, 3p12.3-p11.1, 3q13.31-q21.2, 3q26.1-q29, 3q22.2-q27.2, 6p12.3-p11.1, 6p25.3-p22.2, 6q13-q24.3, 13q12.12-q33.2, 22q11.1-q13.33.	RT-PCR modelo <i>in vivo</i>
Cirilo et al. (2013)	80 LU	Agilent Human 4x44K CGH Microarrays	ganhos: 1q21.3, 2q35, 6p21.32, 6q13, 6q16.3, 7q22.1, 8p12 - p11.23, 8q22.3 - q23.1, 8q24.3, 9p13.3, 10p15.3, 10q21.3, 11p15.5, 11q12.3 - q13.2, 12q13.2 - q13.3, 12q24.11 - q24.12, 12q24.31, 16p13.3, 16p11.2, 16q22.1, 16q24.3, 17p13.1, 17q21.31, 19p13.12 - p13.11, 19q13.32 - q13.33, 20q13.33, 22q13.33. perdas: 1p36.33 - p36.31, 1p31.1, 1q41, 4p14, 4q13.1 - q13.2, 4q21.21, 4q28.3, 5q31.1 - q31.2, 7p12.2, 7q22.1 - q22.2, 7q31.33, 9q34.3, 11p14.1, 13q31.1, 14q32.2, 15q25.3, 18q22.1 - q22.2, 20q11.23 - q12.	Microarray expressão RT-qPCR IHQ

LU: leiomiomas uterinos, LMS: leiomiiossarcomas; LOH: perda de heterozigose, FISH: hibridação *in situ* fluorescente, IPA: Ingenuity Pathway Analysis software, RT-qPCR: RT-PCR quantitativa em tempo real, IHQ: imunoistoquímica.

MED12 e Leiomiomas Uterinos

Em um estudo recente, Mäkinen e colaboradores (2011) demonstraram que aproximadamente 70% dos LU apresentam uma mutação afetando o éxon 2 do gene *MED12* mapeado em Xq13.1. Inicialmente os autores realizaram sequenciamento do

exoma de 18 amostras, e para validar o achado utilizaram 207 amostras adicionais. A maioria das mutações foi caracterizada por uma substituição de base no códon 44 (49%) do gene *MED12*. As mutações encontradas eram heterozigotas e nenhum tumor apresentou mais de uma mutação. Foi encontrada uma correlação entre a presença da mutação e o tamanho do tumor, sendo que os tumores sem mutação tendiam a ser maiores. A proteína MED12 é uma subunidade do complexo Mediador, o qual é descrito por regular a transcrição, tanto global quanto gene específica. Essa regulação ocorre pela ligação de elementos regulatórios, como *enhancers*, ao complexo de iniciação da RNA polimerase II. O complexo Mediador é altamente conservado em todos os eucariontes. Ele é composto por quatro unidades funcionais, a primeira que se liga a RNA pol II, a central, o subcomplexo CDK, que possui atividade de cinase de histona, e a cauda que se liga a *enhancers* de gene-específicos. O sub-complexo é formado pela proteína MED12 associada com as proteínas MED13, CDK8 e Ciclina C. A proteína MED12 é necessária para ativação CDK8. A proteína MED12 também interage diretamente com a β -catenina e é necessária para a resposta celular da sinalização do Wnt. Mutações germinativas nesse gene estão associadas com Síndrome de retardo mental ligadas ao X, Síndrome de Opitz-Kaveggia e Síndrome de Lujan-Fryns, porém as mutações estão associados a variantes mapeadas nos éxons 21 e 22 (Mäkinen et al., 2011; McGuire et al., 2012).

McGuire e colaboradores (2012) realizaram sequenciamento do exoma de LU de cinco pacientes norte americanas e seu miométrio adjacente. Eles encontraram uma mutação heterozigota *missense* causado por um SNV (do inglês, *single nucleotide variants*) no éxon 2 do gene *MED12*. Posteriormente, eles refizeram o sequenciamento do *MED12* (método de Sanger) e confirmaram o achado. Os autores relataram uma deleção de 42 bp no éxon 2 em um terceiro caso. Para validação dos achados, analisaram mais 143 LU e 73 miométrios adjacentes. Os autores encontraram 100/148 tumores com mutação no *MED12*, incluindo SNV, deleções e SNV em região intrônica. Nenhuma mutação foi detectada no miométrio adjacente (McGuire et al., 2012).

Devido a alta frequência de alterações citogenéticas em LU, Markowski e colaboradores (2012) realizaram um estudo para correlacionar a presença dessas alterações com a mutação no gene *MED12*. Eles utilizaram 80 amostras de LU citogeneticamente caracterizados. Os autores verificaram que os tumores que apresentavam o rearranjo em 12q14-15 envolvendo o gene *HMGA2*, não apresentavam mutação no gene *MED12*. Este achado sugeriu existência de duas vias de desenvolvimento dos LU, uma envolvendo o *MED12* e outra o *HMGA2*. Eles também

observaram que outros tipos de alterações citogenéticas, como deleção em 7q, podem coexistir com mutações no *MED12* ou rearranjos envolvendo o *HMGA2*. Segundo os autores, estes dados sugerem que essas alterações são mudanças secundárias no desenvolvimento dos LU. Foi ainda verificado que tumores com a mutação em *MED12* possuem um aumento significativo de expressão de genes da via *WNT4* (Markowski et al., 2012).

Pérot e colaboradores (2012) avaliaram a presença da mutação no exon 2 *MED12* em 10 leiomiosarcomas, 9 tumores do músculo liso de potencial maligno incerto (STUMP) e 14 LU. A mutação estava presente em 66,6% dos LU, 11% dos STUMP e 20% dos leiomiosarcomas. A partir desses resultados os autores concluíram que a mutação no *MED12* não é exclusiva de leiomiomas, mas aparenta ser específica para tumores uterinos (Pérot et al., 2012).

Devido ao grande impacto da mutação no gene *MED12* em leiomiomas uterinos, Je e colaboradores (2012) avaliaram o éxon 2 do *MED12* em 1862 tecidos tumorais. Os autores encontraram a mutação em 35/67 (52%) leiomiomas uterinos e em uma amostra de carcinoma de cólon (0,3%), e nenhum outro tumor avaliado apresentou a mutação. Os resultados indicaram que mutações no éxon 2 do *MED12* podem ser tecido-específicas e raras ou ao acaso em outros tumores (Je et al., 2012).

***HMGA2* e Leiomiomas Uterinos**

A família de proteínas HMG (do inglês, *high mobility group*) é uma dos maiores e melhor caracterizadas proteínas cromossômicas do tipo não histonas. Essa família é classificada em três subfamílias: HMGA, HMGB e HMGN. Cada família possui uma assinatura proteica única e uma sequência funcional característica como o ‘AT-hook’ para a família HMGA. Em mamíferos, essa família é constituída de dois genes, *HMGA1* e *HMGA2*. O gene *HMGA2* está mapeado em 12q14-15 e possui cinco éxons dispersos em uma região de ~200kb, e uma grande sequência intrônica (>100kb) entre os éxons 3 e 4. Em células normais, transcritos do gene *HMGA2* codificam primariamente uma proteína completa (109 aminoácidos) (revisado por Cleynen e Van De Ven 2008; Peng et al., 2008).

O ‘AT-hook’ é um trecho carregado positivamente, formado por nove aminoácidos contendo uma repetição de Arg-Gly-Arg-Pro, localizado na região amino-terminal da proteína (Fusco e Fedele, 2007). A partir desse *AT-hook* as proteínas HMGA2 reconhecem e se ligam a sequências do DNA ricas em AT. Após a ligação ao DNA, o *AT-hook* passa por uma mudança de conformação. A ligação simultânea de um

ou mais *AT-hooks* a diferentes sítios do DNA resulta em uma maior força de interação entre a proteína HMGA e o DNA. Dependendo do número de sítios ricos em AT no DNA, as proteínas HMGA podem influenciar de diferentes maneiras a conformação de substratos ligados ao DNA e, conseqüentemente, apresentar diversos efeitos biológicos. Essas proteínas também participam de interações proteína-proteína e induzem mudanças estruturais nos substratos ligados a proteína. Esta interação é um mecanismo secundário pelo qual o HMGA participa na regulação da expressão de diversos genes, atuando assim como um fator de transcrição arquitetural (Cleynen e Van De Ven 2008).

As proteínas HMGA atuam como reguladores de transcrição gênica pelo controle da estrutura global de grandes *loops* ou domínios de cromatina. São proteínas especializadas em deslocar histonas e outros complexos proteicos dos promotores, tornando assim, a região livre para ligação dos fatores de transcrição. Acredita-se também que elas estão envolvidas no remodelamento inicial dos nucleossomos inibitórios (Cleynen e Van De Ven 2008). HMGA2 também interfere indiretamente no ciclo celular a partir da indução da expressão da ciclina A, a qual é necessária para a progressão do ciclo celular na fase S e na transição G2/M (revisado por Fusco e Fedele 2007).

A expressão do gene *HMGA2* pode ser regulada em resposta a diversos estímulos celulares, como a ação de fatores de crescimento. Foi demonstrado que o promotor desse gene possui múltiplos sítios de iniciação da transcrição, e são utilizados em diferentes situações (Ayoubi et al., 200). O aumento da expressão do *HMGA2* pode prejudicar o reparo do DNA, a partir da ligação ao promotor do gene *ERCC1*, de reparação e remoção de nucleotídeos, regulando negativamente sua atividade (Borrmann et al 2003).

Rearranjos nos genes *HMGA* foram descritos em diversos tumores benignos de origem mesenquimal, como lipomas, adenomas pleomórficos de glândulas salivares, pólipos endometriais, entre outros (Cleynen e Van De Ven 2008). As translocações envolvendo o gene *HMGA2* ocorrem em 12q13-15. Os *breakpoints* geralmente ocorrem envolvendo o terceiro íntron do *HMGA2*, resultando em desregulação da expressão, truncamento ou mais frequentemente, uma proteína quimérica a partir da fusão com uma variedade de sequências ectópicas de outros genes. A proteína truncada ou quimérica mantém sua capacidade de ligação ao DNA e interação com várias proteínas, porém perde sua porção C-terminal, incluindo a região 3'UTR (Fusco e Fedele 2007; Cleynen e Van De Ven 2008). Evidências sugerem que o requisito mínimo para expressão do *HMGA2* como oncogene, se dá pela sua ativação por rearranjos que

mantêm intactos pelo menos os éxons 1, 2 e 3, que codificam o domínio *AT-hook* (Fusco e Fedele 2007).

Outra evidência que suporta a atividade oncogênica do HMGA2 é quando ocorre a perda da região 3'UTR. Essa região apresenta múltiplos sítios alvos de ligação para o microRNA let-7. Esse miRNA regula negativamente a expressão do *HMGA2* pela promoção da degradação do mRNA (Fusco e Fedele 2007; Cleynen e Van De Ven 2008).

Ainda há dados demonstrando que a proteína HMGA2 é um regulador da auto-renovação de células-tronco. Esse transcrito é muito expresso em células-tronco fetais de camundongos, e sua expressão diminui após o nascimento e aumento da idade, enquanto a expressão de p16 aumenta com a idade (Nishino et al., 2008). Nishino e colaboradores (2008) verificaram que a expressão de p16 e Arf está inversamente correlacionada com a expressão de *Hmga2*. A proteína p16, um potente repressor do ciclo celular, é codificada pelo supressor tumoral *INKa/ARF*. A p16 tem a capacidade de reprimir a auto-renovação de células-tronco. A regulação do *HMGA2* nas células-tronco é feita pela ação do microRNA let-7, ele se liga aos sítios alvos na região 3'UTR do mRNA *HMGA2*, reprimindo sua tradução. Estes achados sugerem uma forma de regulação da auto-renovação de células-tronco pelo controle do gene supressor tumoral *INK4a/ARF*, a partir da modulação da expressão do regulador transcricional *HMGA2* durante a embriogênese e idade jovem pelo let-7 (revisado por Hammond e Sharpless 2008).

A translocação em 12q14-15, envolvendo o gene *HMGA2* é frequentemente associada com LU, estando presente em cerca de 8% dos tumores (Hodge et al., 2012). Os tumores que apresentam esse rearranjo possuem um evidente aumento na expressão do *HMGA2*. Klemke et al. e colaboradores (2009), analisaram 180 LU e 51 miométrios adjacentes, a fim de caracterizar o nível de expressão do *HMGA2* em tumores com ausência de rearranjos na região onde se mapeia este gene. Os autores verificaram um aumento significativo na expressão desse gene nos tumores quando comparados ao miométrio adjacente tanto para o grupo sem rearranjo quanto para o grupo com rearranjo. Portanto, o aumento de expressão do *HMGA2* pode ter um papel mais geral no desenvolvimento de LU, e não ser relevante apenas no subgrupo caracterizado por rearranjos em 12q14-15 (Klemke et al., 2009).

Hodge e colaboradores (2009) avaliaram 248 famílias com histórico familiar de LU, para presença de SNPs relacionados com a predisposição ao desenvolvimento desses tumores. Foram avaliados 17 SNPs abrangendo o gene *HMGA2* e quantificado a

expressão desse gene por RT-qPCR. Foi identificada uma correlação significativa entre um alelo com repetição de AT (TC227) e a presença de LU ($p < 0.005$). A análise de expressão gênica revelou uma tendência a aumento de expressão de *HMGA2* em tumores com a presença do alelo TC227, comparado com os tumores negativos para esse alelo. O TC227 foi significativamente correlacionado com baixa estatura das pacientes. Foi também verificada uma tendência a idade jovem de menarca nas pacientes com presença desse alelo. Considerando o fato que mulheres com menarca precoce possuem um elevado risco de desenvolver LU, pode-se supor que TC227 aumenta a predisposição a desenvolver LU e promove baixa estatura nas pacientes por meio dos efeitos da menarca precoce. Este estudo sugere que o polimorfismo TC227 do *HMGA2* tem uma importante influência na gênese dos LU quanto na determinação da estatura de mulheres (Hodge et al 2009).

Micro RNAs e associação com tumores

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs contendo de 18 a 25 nucleotídeos que exercem sua atividade principalmente pela repressão da tradução ou promoção da degradação do RNA mensageiro (mRNA), agindo principalmente na região 3'UTR (Grosshans e Filipowicz, 2008; Garzon et al., 2010). Até o momento, 1600 miRNAs foram descritos no genoma humano de acordo com o banco de dados mirBase (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, consulta em 14/04/2013).

Aproximadamente 50% dos miRNAs estão localizados em íntrons de genes codificadores de proteínas ou em transcritos longos não-codificadores, enquanto que o restante constitui-se de unidades de transcrição independentes com elementos do promotor e sinais de poliadenilação (Di Leva e Croce, 2010). Os miRNAs localizados em íntrons podem estar tanto na fita codificadora como na não-codificadora (Miska 2005). O transcrito primário de microRNA (pri-miRNA) pode ter centenas a milhares de bases de comprimento e conter um ou mais miRNAs. Os pri-miRNAs possuem uma estrutura em *stem-loop* de aproximadamente 80 nucleotídeos, chamada de pré-miRNA, contendo o miRNA maduro localizado em um dos braços. No núcleo, o pri-miRNA é processado pela enzima RNase III Drosha, dando origem ao pré-miRNA. Este é transportado para o citoplasma e processado por outra enzima RNase III Dicer, que origina o miRNA maduro, que é então desenrolado pela atividade de uma helicase e incorporado ao RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Miska 2005; Meola et al., 2009). Juntamente com o RISC, o miRNA se liga ao seu mRNA alvo e regula sua

expressão gênica, podendo agir em nível de tradução ou de transcrito (Meola et al., 2009).

Devido a complementariedade parcial entre o miRNA e seu transcrito alvo, um único miRNA é capaz de regular simultaneamente centenas de genes tendo, portanto, um enorme potencial regulatório. Por outro lado, um único mRNA pode ser regulado por vários miRNAs.

A identificação de mRNAs que são alvos verdadeiros de um miRNA específico é um dos maiores desafios na pesquisa. Estima-se que 60% do genoma humano é controlado por miRNAs, e que eles participam na regulação da maioria dos processos celulares já investigados (Di Leva e Croce, 2010; Nana-Sinkam e Croce, 2011). Os miRNAs controlam um grande número de funções biológicas essenciais, que são críticas para o correto desenvolvimento e a desregulação desses miRNAs durante a vida contribui para o aparecimento de diversas doenças, como o câncer (Nana-Sinkam e Croce, 2011). Além disso, evidências recentes indicam que os miRNAs podem atuar no controle fino da expressão gênica, diminuindo modestamente (10-20%) a expressão de um número considerável de mRNAs, ou podem agir como reguladores principais de um repertório menor de genes alvo, diminuindo sua expressão em 50-70% (Cannell e Bushell, 2010).

Os miRNAs regulam negativamente seus alvos de duas maneiras, o que varia de acordo com o grau de complementariedade entre a sequência do miRNA, localizada entre a posição 2 e 8 da região 5' do miRNA (chamada de *seed*), e a região do 3'UTR do seu transcrito alvo (Garzon et al., 2010). Recentemente foi descrito que os miRNAs também podem se ligar a região 5'UTR ou a *open reading frame* do mRNA alvo (Iorio e Croce 2012).

miRNAs com complementariedade perfeita ou quase perfeita a regiões codificadoras de proteínas do mRNA induzem a via de interferência mediada por RNA (RNAi). Basicamente, mRNA são clivados por ribonucleases associadas com miRNAs presentes no chamado *multiprotein RNA induced-silencing complex* (miRISC), o que resulta na degradação do RNA alvo (Esquela-Kercher e Slack, 2006). A maioria dos miRNAs presentes em animais utiliza um segundo mecanismo de regulação gênica que não envolve a clivagem dos mRNAs alvo. Esses miRNAs ligam-se por complementariedade imperfeita a regiões UTR de seus mRNAs alvo, reprimindo a expressão gênica na pós-transcrição, aparentemente em nível de tradução. Nesse processo é utilizado um RISC similar ou idêntico ao utilizado na via do RNAi (Carmell et al., 2002; Pillai et al., 2005). Além disso, miRNAs que utilizam esse mecanismo

reduzem os níveis proteicos de seus genes alvo, enquanto a quantidade de mRNA na célula é pouco afetada. Além de ligação ao mRNA, há relatos da ligação de miRNAs a proteínas. Eiring e colaboradores (2010) demonstraram que o hsa-miR-328 pode interagir com uma ribonucleoproteína que apresenta capacidade de ligação ao RNA, impedindo essa interação. Alguns estudos reportaram que os miRNAs também podem regular a expressão gênica em um nível transcricional por meio da ligação direta do miRNA ao DNA (Garzon et al., 2010).

A ação dos miRNAs tem sido descrita em diversos processos biológicos, como o desenvolvimento, diferenciação e apoptose. A desregulação dessas moléculas é um fator fundamental no desenvolvimento de diversas doenças, portanto, mutações afetando os miRNAs possuem grande importância nos processos celulares. Devido ao modo de ação dos miRNAs, três tipos de mutações podem afetar seu funcionamento: (1) mutações afetando o pri-miRNA, como mutações em ponto na sequência madura ou grandes mutações no DNA, como deleções e duplicações no *locus* do miRNA; (2) mutações na região 3'UTR do mRNA, podem levar a remoção ou gerar um novo sítio alvo de reconhecimento dos miRNAs; (3) mutações em genes que participam dos mecanismos gerais de processamento e funcionamento dos miRNAs, esse tipo de mutação pode ter um impacto global no funcionamento dos miRNAs (revisado por Meola et al., 2009).

Além dos três tipos de mutações descritos, também já foi relatada a regulação da expressão de miRNAs por alterações epigenéticas, como a hipermetilação da região promotora e hipoacetilação de histonas nos genes de miRNAs, em tumores sólidos (revisado por Garzon et al., 2010). Diversos miRNAs como o miR-126, miR-145, miR-127 e miR-29, foram descritos por estarem pelo menos em parte sendo regulados por metilação (Nana-Sinkam e Croce, 2011). Uma recente revisão concluiu que entre 122 miRNAs regulados epigeneticamente em 23 tipos de câncer, 55 foram associados com mais de um tipo tumoral, enquanto 67 estavam presentes em apenas um tipo de tumor, apresentando potencial para serem biomarcadores câncer-específicos (Kunej et al., 2011). Os autores também encontram *hot spots* para alterações epigenéticas em miRNAs mapeados nos cromossomos 1q, 7q, 11q, 14q e 19q.

Uma evidência que suporta essa hipótese, se dá pelo fato que os genes codificadores de miRNA estão frequentemente localizados dentro ou próximos a regiões onde se mapeiam sítios frágeis, em pequenas regiões de perda de heterozigose, ampliações e em *breakpoints* comumente associados ao câncer. Por exemplo, o cluster *mir-17-92*, que compreende seis miRNAs, está localizado a 800 pares de bases da região do gene não codificador *C13orf25*. Essa região genômica é frequentemente

descrita como amplificada em linfomas. E o cluster *mir-17-92* tem sido identificado com aumento de expressão em tumores sólidos e neoplasias hematológicas (revisado por Garzon et al., 2010).

Determinados grupos de miRNAs são frequentemente encontrados com expressão aumentada ou diminuída em tipos tumorais específicos e também estão comumente associados com anomalias citogenéticas. Por exemplo, os miR-17 e miR-21 foram identificados por estarem com expressão aumentada em tumores de cólon, pulmão, próstata, estômago e pâncreas. O miR-155 foi detectado com expressão aumentada em câncer cólon, pulmão e mama. Membros da família let-7 foram identificados com diminuição de expressão em tumores de cólon, pulmão, mama, ovário e estômago (revisado por Garzon et al., 2010).

O padrão de alterações na expressão desses miRNAs em diversos tipos tumorais sugere que essa desregulação não é um evento randômico no câncer (Garzon et al., 2010) levando a hipótese de que os miRNAs podem agir como oncogenes ou supressores tumorais (Esquela-Kercher e Slack, 2006). Um miRNA que normalmente regula negativamente um oncogene pode ser definido como um supressor de tumor e frequentemente está perdido ou diminuído nas células tumorais. Essa perda de função do miRNA supressor pode causar o aumento nos níveis proteicos de oncogenes. Da mesma forma, miRNAs que regulam genes supressores tumorais podem ser definidos como oncogenes e geralmente apresentam ganho de função nos tumores. A expressão elevada de um miRNA com função de oncogene pode reduzir os produtos proteicos de genes supressores de tumor (Esquela-Kercher e Slack, 2006). Porém é importante ressaltar que a função do miRNA depende do gene alvo relacionado, pois um miRNA pode regular diversos genes. Alguns miRNAs podem agir como supressores tumorais em alguns tecidos e como oncogene em outros tecidos. A definição de um miRNA como oncogene ou supressor tumoral necessita de uma indicação do tipo de célula em que ele está agindo (Garzon et al., 2010). Há ainda miRNAs associados com processos metastáticos, podendo ser classificados em duas categorias: miRNAs indutores de metástase e miRNAs supressores de metástase. O resultado final dessa perda da regulação de miRNAs pode resultar em alterações importantes nos processos de apoptose e diferenciação celular, aumentando a proliferação e o desenvolvimento de metástases (Esquela-Kercher e Slack, 2006; Garzon et al., 2010).

Alguns estudos estabeleceram que os tecidos tumorais de pacientes com câncer exibem uma assinatura específica de expressão de microRNAs. Essas assinaturas permitem que diferentes tipos de câncer sejam discriminados com precisão e que seja

determinado o tecido de origem de tumores com pequena diferenciação histológica (Garzon et al., 2010). O padrão global de expressão de miRNAs também tem sido utilizado para fins diagnósticos e prognósticos e para auxiliar em decisões terapêuticas. Por exemplo, a expressão aumentada de miR-155 e diminuída de let-7a-2 estão correlacionadas com menor sobrevida em câncer de pulmão (Yanaiharu et al., 2006). Nível aumentado de miR-21 está correlacionado com menor sobrevida em câncer de mama e carcinoma colorretal (Schetter et al., 2008; Yan et al., 2008). O número de estudos correlacionando miRNAs com evolução clínica está em constante crescimento (revisado por Nana-Sinkam e Croce, 2011). Usando a análise de expressão dos miRNAs também é possível prever a resposta a drogas específicas, o que é essencial para a seleção de pacientes com potencial resposta a terapias específicas. Por exemplo, a análise do miR-21 pode ser usada para prever uma fraca resposta a quimioterapia adjuvante em adenocarcinomas e em pacientes com câncer pancreático tratado com gemcitabina (Schetter et al., 2008; Giovannetti et al., 2010).

***HMGA2*, microRNAs e Leiomiomas uterinos**

Zavadil e colaboradores (2010) realizaram um estudo com o objetivo de identificar associações entre miRNAs e mRNAs relevantes em LU. Foram utilizadas 55 amostras de LU de 41 pacientes. As técnicas empregadas nesse estudo foram a análise de expressão gênica global, CGH array, transfecção de miRNA, RT-PCR e análise de expressão proteica por imunoistoquímica em um microarranjo de tecidos (TMA – *tissue microarray*). Os autores relataram 45 miRNAs diferencialmente expressos em LU quando comparados ao miométrio normal, entre eles, foram selecionados cinco miRNAs com expressão aumentada (let-7s, miR-21, miR-23b, miR-27a e miR-30a) e cinco miRNAs com expressão diminuída (miR-29b, miR-32, miR-144, miR-197 e miR-212) para direcionar a procura de genes alvos específicos entre os 2674 genes, que foram encontrados alterados em cinco LU que foram utilizadas na análise de expressão gênica global. Entre os mRNAs significativamente desregulados, 249 com expressão diminuída eram genes alvos específicos dos cinco miRNA com expressão aumentada, e 97 mRNAs com expressão aumentada eram genes alvos específicos dos cinco miRNA com expressão diminuída. Entre os vários miRNAs desregulados e seus genes alvos em LU, uma correlação entre *HMGA2* e a família let-7 foi bem caracterizada e mostrou significativa importância biológica no crescimento dos leiomiomas. Foram encontrados com expressão diminuída, outros nove genes alvo-específicos dos miRNA (com expressão aumentada), os quais estão na via de sinalização do *MAPK*. Esta via tem sido

descrita como fundamental no processo de tumorigênese pelo controle do crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Componentes principais das vias de sinalização do *TGF- β* e do *MET*, também apresentaram expressão diminuída. Por fim, este estudo correlacionou os cinco miRNAs que apresentaram aumento de expressão e o grupo de genes alvos com expressão diminuída, que estão relacionados com a estrutura celular, matriz extracelular e proliferação celular.

A expressão, regulação e função do miR-21 em leiomiomas foi avaliada por Pan e colaboradores (2010). Os autores verificaram que o miR-21 possui aumento de expressão em leiomiomas, especificamente durante a fase secretória do ciclo menstrual das pacientes que faziam o uso de contraceptivos orais, porém com baixa expressão nas pacientes que usavam terapia com GnRHa. Esses resultados indicaram que o miR-21 é regulado por hormônios em leiomiomas, podendo influenciar na expressão dos seus genes alvos. Foram identificados alguns genes como possíveis alvos do miR-21 por ação direta ou indireta, como o *PDCD4*, *E2F1*, *PTEN*, e *TGF- β RII*, com potencial regulação por GnRHa e *TGF- β* . Funcionalmente, o miR-21 tem uma influência moderada na taxa de proliferação e apoptose dessas células, mas regula negativamente a expressão de *TGF- β* por meio dos seus genes-alvo (Pan et al., 2010).

Já foi descrito que o miRNA let-7 possui sete sítios alvos na região 3'UTR do gene *HMGA2*, e pode regular negativamente a expressão desse gene. Porém o let-7 é frequentemente encontrado com baixa expressão em LU, e consequentemente o *HMGA2* apresenta aumento de expressão (Hammond e Sharpless, 2008). Tem sido relatado que tumores com translocações envolvendo esse gene, apresentam um grau de expressão ainda maior do que o detectado em tumores sem a translocação, podendo ser em parte devido ao mRNA truncado, que perde a região 3'UTR com os sítios de ligação do let-7 (Klemke et al., 2009; Klemke et al., 2010). Porém um estudo analisou 13 LU com a translocação envolvendo o gene *HMGA2*, afim de avaliar se havia a presença de transcritos truncados por RT-qPCR (Klemke et al., 2010). Os autores verificaram a predominância de transcritos truncados em aproximadamente um terço dos LU com rearranjos cromossômicos envolvendo *HMGA2*. Os demais tumores possuíam a presença de mRNAs completos com a região 3'UTR. Estes achados indicaram a presença de outro modo de regulação do *HMGA2* nos tumores com rearranjos genéticos e não apenas insensibilidade a regulação por miRNA (Klemke et al., 2010).

Peng e colaboradores (2008) analisaram a relação entre o let-7 e o *HMGA2* e o seu papel na proliferação celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Primeiramente eles demonstraram que o transcrito dominante de *HMGA2* (*HMGA2a*) pode ser regulado

negativamente por let-7 exógeno em culturas primárias de LU. Os autores verificaram que o let-7 endógeno era biologicamente ativo e possuía um papel principal na regulação do *HMGA2*. Posteriormente eles demonstraram que a repressão do *HMGA2* por let-7 inibe a proliferação celular. Uma análise do nível de expressão de let-7c e *HMGA2* em um maior número de LU, revelou um aumento no nível de expressão de let-7 e diminuição do *HMGA2* em tumores pequenos, um baixo nível de expressão de let-7 e aumento de *HMGA2* em leiomiomas grandes. Esses dados sugeriram que o mecanismo de repressão do *HMGA2* pelo let-7 é um importante evento molecular no crescimento de leiomiomas (Peng et al., 2008).

Justificativa

Apesar do impacto na saúde pública e da alta incidência dos leiomiomas uterinos, a etiologia e a patogênese destes tumores não são totalmente conhecidas. Os hormônios estrógeno e progesterona foram relatados como relevantes na etiologia dos LU, porém, podem estar envolvidos outros produtos de vias moleculares dependentes ou não dos esteróides. Este estudo foi delineado para confirmar resultados prévios obtidos pela equipe pela metodologia de CGH array e análise de transcritos em larga escala. O achado de maior impacto atual em literatura refere-se a presença de mutação no gene *MED12* descrita em uma alta proporção dos casos (ao redor de 70%) (Mäkinen et al., 2011). Neste estudo foi avaliada mutações no gene *MED12* em uma abordagem de agrupamento dos dados de expressão gênica. No presente estudo foi investigado o nível de expressão do gene *HMGA2*, que é frequentemente encontrado com aumento de expressão em tumores com a translocação envolvendo o ponto de quebra 12q14-15 e com um menor aumento, porém significativo em tumores sem a translocação. Também foram avaliados os miRNAs preditos de regular esse gene, afim de caracterizar o modo de regulação do *HMGA2* em LU. Além disso, a região 7q22.1 frequentemente envolvida em perda, contém miRNAs que foram avaliados por expressão quantitativa em tempo real.. Dois outros genes descritos como com alto nível de interação em um estudo prévio do grupo, *FANCA* e *BRCA1*, também foram avaliados com o objetivo de confirmar estes dados. Grande parte dos estudos envolvendo miRNAs em LU utiliza análises em larga escala não direcionada, ou seja, investigam o perfil geral dos miRNAs. Porém, nosso estudo investigou o nível de expressão de miRNAs específicos, os quais foram selecionados por estudo prévio do grupo que demonstrou alteração no número de cópias genômicas em 7q22 onde eles estão mapeados (miR-106b, miR-93, miR-25). Outros miRNAs aqui avaliados são identificados como possíveis reguladores dos genes selecionados para este estudo. Como o miR-197 e miR-143 são possíveis reguladores do *BRCA1*, os miR-26a e miR26b do *FANCA*, e do *HMGA2*, assim como o let-7a, miR106b, miR-93. O miR-21 foi incluído no estudo, pois já havia sido descrito por Pan e colaboradores (2010) com expressão alterada nesse tumor. Os genes *BRCA1* e *FANCA* foram descritos como genes moduladores em LU e a análise de sua expressão foi avaliada para confirmar estes achados prévios. A abordagem proposta pode contribuir para o entendimento da biologia do tumor e auxiliar na descrição de novas alterações genômicas que possam ser alvos terapêuticos úteis para o tratamento desta doença.

Objetivos

Considerando os resultados prévios do grupo em um número significativo de leiomiomas uterinos demonstrando a presença de candidatos a marcadores moleculares e o envolvimento de regiões alteradas onde se mapeiam miRNAs, este estudo teve como objetivos:

Objetivos Gerais:

1. Caracterizar as mutações no gene *MED12* para verificar se as amostras de pacientes brasileiras apresentam as mesmas alterações descritas em literatura;
2. Avaliar a expressão dos genes *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA* e dos miRNA preditos como reguladores destes genes.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a expressão de miRNAs (let-7a, miR-106b, miR-93, miR-26a, miR-26b) candidatos a regulação do *HMGA2*;
2. Avaliar a expressão de miRNAs (miR-106b, miR-25, miR-93) mapeados em 7q22, os quais se mostraram envolvidos em perdas genômicas no estudo prévio de aCGH,
3. Avaliar a expressão de miRNAs candidatos a regulação dos genes *BRCA1* (miR-197, miR-143) e *FANCA* (miR-26a, miR-26b), os quais apresentaram a mais forte correlação proteica na análise *in silico* realizada quando da integração dos dados genômicos e transcriptômicos de um estudo prévio do grupo;
4. Selecionar os miRNAs de referência mais estáveis em LU, utilizando o programa geNorm (disponível em, <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>);
5. Comparar os resultados com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes, como idade, número de tumores, endométrio, idade da menarca, índice de massa corpórea (IMC), idade da primeira gestação, número de gestações e história familiar de tumores.

Material e Métodos

Casuística

Foram utilizadas 80 amostras de leiomiomas uterinos de tecido a fresco, as quais foram obtidas de 56 pacientes. O miométrio adjacente dessas pacientes também foi coletado. As amostras foram obtidas de pacientes submetidas a histerectomia junto ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP (UNESP), no período de Outubro de 1995 a Fevereiro de 2004. Após a coleta, as amostras foram imediatamente transferidas para nitrogênio líquido e estocadas a -80°C . Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a coleta das amostras e a pesquisa, o qual se encontra sob a responsabilidade da Dra Anagloria Pontes, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (FMB-UNESP). As amostras fazem parte do Banco de Amostras do NeoGene Laboratório, Departamento de Urologia (FMB-UNESP), sob a responsabilidade da Dra Silvia Regina Rogatto. Todos os tumores foram avaliados pelo patologista responsável do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP (CEP- 4008-2011).

Características clínicas e histopatológicas

Entre as 56 pacientes incluídas no estudo, 13 possuíam tumores únicos e 43 tumores múltiplos ($n=67$). Entre as pacientes com tumores múltiplos, 26 tiveram apenas uma amostra analisada ($n=26$), 10 tiveram duas amostras analisadas ($n=20$) e 7 pacientes tiveram três amostras analisadas ($n=21$).

Todos os leiomiomas uterinos incluídos no estudo foram classificados como típicos. Todas as pacientes eram pré-menopáusicas e não fizeram uso de terapia hormonal por pelo menos três meses antes da cirurgia. O prontuário e os achados histológicos dessas pacientes foram revisados afim de atualizar os dados clínicos, como idade, idade à menarca, idade à primeira gravidez, índice de massa corpórea (IMC), fase do ciclo menstrual, número de tumores, raça, gestações, história familiar de LU e ou outros tumores e tipo histológico tumoral (Anexo 1). Para a determinação da fase do ciclo, foi avaliado o *status* endometrial de cada paciente, utilizando o critério de Noyes et al. (1950). Os valores de referência para o IMC (índice de massa corpórea) foram ≤ 18 abaixo do peso; 18,5 a 24,9 peso normal; 25 a 29,9 sobrepeso e ≥ 30 obesidade (WHO,

1997).

Extração de DNA

Foi utilizado DNA genômico disponível no Banco de Amostras e Macromoléculas do NeoGene Laboratório, UNESP, Botucatu, SP previamente extraído pelo método padrão fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Estas amostras foram tratadas com RNase 20mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para digestão de moléculas de RNA remanescentes do processo de extração. Após a extração do DNA, as amostras foram ressuspensas em até 50µL de água ultra-pura estéril e armazenadas a -20°C. As amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) para avaliação de pureza e qualidade da molécula.

Extração de RNA

Foi realizada a extração de RNA das 78 amostras de LU e de 20 amostras do miométrio adjacente, sendo 10 de pacientes com tumores únicos e 10 de pacientes com tumores múltiplos. Para a extração do RNA foi utilizado o reagente Trizol® (Invitrogen), de acordo com especificações do fabricante. A concentração do RNA foi avaliada no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific), a integridade e pureza foi avaliada pelo equipamento Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100 Agilent Technologies). Foi incluído no estudo RNAs de 34 amostras de miométrios adjacentes os quais foram extraídos utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

Sequenciamento do gene *MED12*

Para o sequenciamento do éxon 2 do gene *MED12* (GeneBank NM_005120) foram utilizados os iniciadores descritos por Makinen et al. (2011) (Tabela 1). O sequenciamento foi realizado em 85 amostras de DNA de leiomiomas uterinos e em 16 amostras de DNA de sangue periférico. A reação de sequenciamento foi realizada em três etapas de acordo com a metodologia de Sanger: (1) amplificação do éxon 2 do gene *MED12* e purificação enzimática do amplicon, (2) incorporação dos dNTPs e (3) precipitação dos produtos obtidos. Na PCR foram utilizados 5 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 10 µL de Master Mix (Promega) e 25 ng de gDNA. As condições de reação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciador utilizado nas reações de amplificação do exon 2 do gene *MED12*.

Referência	Sequências	Tamanho do Amplicon	Condições da PCR
Makinen et al, 2011	F: 5' GCCCTTTTCACCTTGTTTCCTT 3' R: 5' TGTCCCTATAAGTCTTCCCAACC 3'	291 pb	35 ciclos (95°C por 30 seg, 60°C por 45 seg, 72°C por 1 min)

O volume de 8,0 µL do produto amplificado foi purificado com a enzima Exo-Sap I (USB/GE), com o intuito de remover o restante de dNTPs e os iniciadores utilizados na reação de amplificação. A reação de sequenciamento foi realizada com a adição de 1,5 µL 5x Sequencing Buffer BigDye Terminator v1.1, v3.1, 5 µM do iniciador, 0,75 µL de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o respectivo par de iniciador. As condições da reação de sequenciamento foram desnaturação a 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 18 seg, 50°C por 18 seg e 60°C por 3 min e 30 seg.

As amostras foram ressuspendidas em 13µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA), desnaturadas a 95°C em termociclador por 3 min e imediatamente acondicionadas em gelo por 5 min. Em seguida, foram submetidas ao sequenciamento usando o sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

As sequências foram analisadas no Software CLC Main Workbench e comparadas com as sequências, NG_012808 e NM_005120, do gene *MED12*.

Análise de Expressão dos Transcritos *FANCA*, *BRCA1* e *HMGA2*

Obtenção do cDNA

A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1µg de RNA total utilizando a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para este protocolo foi utilizado 1µl de oligodT (500 µg/mL), 1µl de *random primers* (100µg/ml) e 1µl de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 4µl de tampão de transcrição 5x, 1µl de DTT 0,1M e, por último, foi adicionado 1µL da enzima Super-script III (200U/µL) em cada tubo e incubado a 25°C por 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15 minutos. Ao final da

transcrição o cDNA foi armazenado a -20°C .

RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão gênica

Os genes analisados por RT-qPCR foram selecionados de um estudo prévio da equipe, no qual foram identificados 75 genes moduladores a partir da análise integrada dos resultados de CGH array e microarrays de expressão em LU. Entre os 75 genes moduladores, foram selecionados o *BRCA1* e o *FANCA*, os quais mostraram maior conectividade em redes de interação proteína-proteína. Também foi avaliada a expressão do gene *HMGA2*.

Os iniciadores para o gene alvo *FANCA*, *BRCA1* e *HMGA2* foram desenhados usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 2). Os números de acesso das sequências de cada gene spotados na lâmina de *oligoarray* foram anotados e as sequências foram obtidas no site do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os iniciadores foram desenhados com o critério de pelo menos um deles estar localizado na região de junção intron- éxon. Os genes de referência *GUSB* e *RPLP0* foram os descritos como mais estáveis em LU, obtidos de um estudo prévio do grupo.

As reações foram realizadas no termociclador automático StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies), sendo distribuídas em duplicatas em placas de 96 poços, utilizando o reagente Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C . Ao final de cada corrida foram analisadas as curvas de dissociação para a determinação da especificidade dos produtos da PCR. Amostras cujas réplicas mostraram desvio padrão maior que 0,5 entre as quantificações relativas (QR) foram reavaliadas. A média dos valores dos QRs das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak, 2001).

Para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores para o gene *FANCA* e *BRCA1* foi construída uma curva-padrão com diluição seriada 1:4, partindo de 80 ng até 0,3 ng para cada conjunto de iniciador, utilizando um pool de amostras de cDNA de tecido tumoral e normal. Essas diluições foram testadas em triplicata para todos os genes. Os valores dos Cts para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de RNA ($\log_{10}$ RNA) foram plotados num gráfico para a obtenção da curva-padrão. A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*. A eficiência da amplificação foi calculada pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}}$

– 1. As curvas foram construídas para se garantir uma eficiência ótima de amplificação (90% a 110%), sendo aceitos os iniciadores que apresentarem uma eficiência de amplificação considerada razoável (85% a 115%). Foram eliminados da análise os iniciadores que não se enquadravam neste padrão de qualidade.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica.

Genes	Sequência dos iniciadores	Localização cromossômica
<i>HMGA2</i>	D: 5'- AGGACTGTTCTTTGCTGTTGTTGGT-3' R: 5'- AGGAACAGGGAGAAAGTCAACTGCA-3'	12q15
<i>FANCA</i>	D: 5'- GCTCTTTGACAGCCTCCTGA-3' R: 5'- CGTGACTGGGAAGAAAAGTTGC-3'	16q24.3
<i>BRCA1</i>	D: 5'- CTGGACAGAGGACAATG-3' R: 5'-CTGGACAGAGGACAATG-3'	17q21
<i>RPLP0*</i>	D: 5'- GGAGACGCATTACACCTTC-3' R: 5'- CTTCACCTTAGCTGGGG-3'	12q24.2
<i>GUSB*</i>	D: 5'- GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT-3' R: 5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'	7q21.11

Legenda: * genes endógenos.

Análise de expressão de MicroRNAs (miRNA)

Nove miRNAs (miR-106b, miR-25, miR-93, miR-21, let-7a, miR-26a, miR-26b, miR-143 e miR-197) foram selecionados para serem avaliados. Três miRNAs, hsa-mir-25, hsa-mir-93 e hsa-mir-106b, estavam mapeados em 7q22.1, uma região comumente alterada em LU. O hsa-mir-21 foi incluído no estudo por apresentar expressão diferenciada em LU e ter participação importante nos processos de resposta a terapia hormonal, funções regulatórias, de crescimento e apoptose, entre outras (Pan et al., 2010). Outros seis miRNAs foram selecionados por serem candidatos a regulação dos genes *HMGA2* (let-7a, miR-26a, miR-26b, hsa-mir-93 e hsa-mir-106b), *FANCA* (miR-26a, miR-26b) e *BRCA1* (miR-143, miR-197)(Tabela 3).

Para a seleção dos miRNAs candidatos foram consultados três algoritmos de predição: TargetScan (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar>) e miRDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/search.jsp#r>).

Tabela 3. Descrição dos miRNAs selecionados para análise de expressão por RT-qPCR.

MicroRNAs	Genes candidatos avaliados	Sequência miRNA maduro	Sequência Stem Loop
hsa-miR-106b	HMGA2	UAAAGUGCUGA CAGUGCAGAU	CCUGCCGGGGCUAAAGUGCUGAC AGUGCAGAUAGUGGUCCUCUCCG UGCUACCGCACUGUGGGUACUUG CUGCUCCAGCAGG
hsa-miR-25	-	CAUUGCACUUG UCUCGGUCUGA	GGCCAGUGUUGAGAGGCGGAGAC UUGGGCAAUUGCUGGACGCUGCC CUGGGCAUUGCACUUGUCUCGGU CUGACAGUGCCGGCC
hsa-miR-93	HMGA2	AAAGUGCUGUU CGUGCAGGUAG	CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUC GUGCAGGUAGUGUGAUUACCCAA CCUACUGCUGAGCUAGCACUUC CGAGCCCCCGG
hsa-miR-21	-	UAGCUUAUCAG ACUGAUGUUGA	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGA UGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGC AACACCAGUCGAUGGGCUGUCUG ACA
hsa-miR-26a	FANCA, HMGA2	UUCAAGUAAUC CAGGAUAGGCU	GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAG GAUAGGCUGUGCAGGUCCCAAUG GGCCUAUUCUUGGUUACUUGCAC GGGGACGC
hsa-miR-26b	FANCA, HMGA2	UUCAAGUAAU CAGGAUAGGU	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUC AGGAUAGGUUGUGUGCUGUCCAG CCUGUUCUCCAUUACUUGGCUCG GGGACCGG
hsa-let-7a	HMGA2	UGAGGUAGUAG GUUGUAUAGUU	UGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAU AGUUUUAGGGUCACACCCACCAC UGGGAGAUAAACUAUACAAUCUAC UGUCUUUCCUA
hsa-miR-143	BRCA1	UGAGAUGAAGC ACUGUAGCUCA	GCGCAGCGCCCUGUCUCCCAGCC UGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUG GUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAA GCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGA AGUUGUUCUGCAGC
hsa-mir-197	BRCA1	UUCACCACCUU CUCCACCCAGC	GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGGCA GUGGGAGGUAAGAGCUCUUCACC CUUCACCACCUUCUCCACCCAGCA UGGCC

Legenda: o miR-25 foi incluído pois está mapeado na região 7q22; o miR-21 foi incluído no estudo pois já havia sido previamente relacionado com LU por Pan e colaboradores (2010).

Obtenção do cDNA

Após extração do RNA, as amostras foram diluídas em uma concentração de 2ng/μL e a síntese dos cDNAs foi realizada usando o *Taqman miRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies), conforme especificações do fabricante. Nesta etapa foram utilizados iniciadores em forma de *loop*, os quais apresentam uma região complementar a sequência de cada miRNA maduro.

RT-qPCR para análise de expressão de miRNAs

As PCRs foram realizadas no termociclador automático StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os miRNAs de referência testados foram: RNU48, RNU44, U47, RNU6b, miR-23b e miR-16. Para a análise de expressão do miRNAs foi utilizado o sistema TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) no qual são incluídas sondas marcadas com agentes que emitem fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando o TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems – Life Technologies).

Seleção dos microRNAs de referência para a normalização de RT-qPCR

Os miRNAs RNU44, RNU48, RNU6B, U47, miR-23b e miR-16 foram avaliados como referências para as amostras de LU. Para um pré-teste, foram utilizadas amostras de LU e de miométrio adjacente. A seleção dos microRNAs foi realizada pelo site da empresa fabricante (<http://www.invitrogen.com>).

A estimativa da estabilidade de expressão dos microRNAs candidatos a referência (pré-teste) e a estabilidade real de expressão do conjunto de microRNAs selecionados entre o total de amostras alvo foi realizada pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Esse algoritmo foi desenvolvido por Vandesompele et al. (2002) para determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras.

Análise dos resultados

Os níveis de expressão gênica dos genes candidatos e dos miRNAs foram correlacionados com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa SPSS (*Statistics Packet for Social Sciences*), versão 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Testes paramétricos ANOVA (com pós-teste de Tukey) ou t-Student foram utilizados para avaliar os níveis de transcritos nos diferentes grupos avaliados (amostras tumorais *versus* controles; tumores agrupados de acordo com os dados clínicos e histopatológicos). O Teste de Pearson foi aplicado para análises de correlação. O teste F de Levene foi utilizado para assumir ou não variâncias iguais entre os grupos comparados. Em todas as análises estatísticas a hipótese nula foi rejeitada quando o valor de P bicaudado foi $\leq 0,05$. As representações

gráficas foram feitas pelo programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Análise funcional – IPA

Os genes e os miRNAs encontrados com expressão significativamente alterada em relação ao miométrio adjacente, obtidos a partir das análises de RT-qPCR, foram submetidos a análises funcionais *in silico* utilizando o *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>). Abaixo, esta apresentada a descrição de cada etapa das análises funcionais:

Geração de redes: uma lista de genes e miRNAs e o *status* correspondente (valores de expressão gênica) foi importada ao sistema. O IPA identifica cada gene, miRNA e seu *status* e associa-os com as informações depositadas nos bancos de dados. A maioria dos genes e miRNAs é classificada como “moléculas elegíveis para rede”. Utilizando algoritmos próprios do IPA, as redes das moléculas elegíveis foram geradas baseadas em suas conexões. Os dados foram representados em valores de *scores* obtidos a partir da presença dos genes importados em relação aos genes do IPA.

Funções biológicas: esta análise identificou as funções biológicas e doenças que foram mais significativamente observadas. O teste exato de Fisher foi utilizado para calcular o *P* valor que determinou a probabilidade de que cada função biológica e ou doença atribuídos a esse conjunto de dados fosse resultante do acaso ou que apresentasse algum significado estatístico. Os dados foram convertidos em $-\log(P \text{ valor})$.

Vias canônicas: esta análise permitiu identificar as vias depositadas no IPA que foram mais significativamente observadas entre os dados importados. A significância da associação entre os dados foram calculadas de duas formas: a) a razão entre o número de moléculas dos dados importados dividida pelo número total de moléculas das vias canônicas; b) teste exato de Fisher foi utilizado para calcular o *P* valor que determinou a probabilidade da associação entre os genes e miRNAs importados e as vias canônicas.

Representação gráfica: as redes são representadas graficamente para verificar as relações entre as moléculas. As moléculas são representadas como “nós” e as relações biológicas entre dois nós são representadas pelas “linhas”. Todas as linhas são baseadas em pelo menos uma referência da literatura ou nas informações canônicas depositadas no banco de dados do IPA. Genes ortólogos são armazenados separadamente no IPA, porém, são representados como nós únicos nas redes. No caso

dos dados de expressão, variações na intensidade das cores nos nós indicam o grau de regulação gênica (vermelho=expressão aumentada e verde=expressão diminuída). Os nós são representados de várias formas geométricas que indicam a classe funcional do produto gênico. As linhas são representadas em duas formas principais, indicam a relação direta e indireta entre os nós.

Resultados

Análise de mutações do gene *MED12*

No presente estudo, o sequenciamento do éxon 2 do gene *MED12* foi realizado em 85 amostras de DNA de leiomiomas uterinos e em 16 amostras de DNA de sangue periférico (amostras pareadas com os tumores). As sequências foram analisadas no Software CLC Main Workbench (CLC Bio, Agilent Technologies) e comparadas com as sequências NG_012808 e NM_005120 do gene *MED12*.

Não foi verificada mutação no sangue periférico das 16 pacientes e em 51/85 tecidos tumorais. Trinta e quatro casos (40%) apresentaram mutações em ponto (Tabela 4). Assim, 40% dos casos apresentaram alterações na sequência do gene *MED12*. A tabela 5 também apresenta uma comparação com os dados relatados em literatura da mesma região avaliada do gene *MED12*. As Figuras 1 e 2 ilustram os eletroferogramas dos LU com a presença da mutação em *MED12*.

Tabela 4. Dados obtidos da análise de mutação no gene *MED12* em 85 amostras de LU e a comparação entre os resultados descritos em literatura.

Mutação	Presente estudo		Mäkinen et al. 2011		Markowski et al., 2012		McGuire et al., 2012		Je et al., 2012	
	Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%
c.107T>G	p.L36R	1,2	11	5,0	—	—	3	2,0	—	—
c.128A>C	p.Q43P	1,2	3	1,3	1	1,3	5	3,4	1	1,5
c.130G>A	p.G44S	4,7	17	7,6	8	10,0	9	6,1	4	6,0
c.130G>C	p.G44R	2,4	16	7,1	9	11,2	7	4,7	—	—
c.130G>T	p.G44C	5,9	7	3,1	2	2,5	8	5,4	2	3,0
c.131G>A	p.G44D	10,6	47	20,9	18	22,5	32	21,6	11	16,4
c.131G>C	p.G44A	3,5	11	5,0	1	1,3	5	3,4	2	3,0
c.131G>T	p.G44V	10,6	12	5,3	6	7,5	9	6,1	5	7,4
outras	—	-	—	—	1	1,3	1	0,7	2	3,0
Íntron 1	na	-	14	6,1	-	—	4	2,8	na	—
Ins/del	na	-	21	9,4	1	1,3	17	11,9	8	12,0
sem mutação	51	60,0	66	29,3	33	41,2	48	32,4	32	47,7
TOTAL	85		225		80		148		67	

na: não analisado

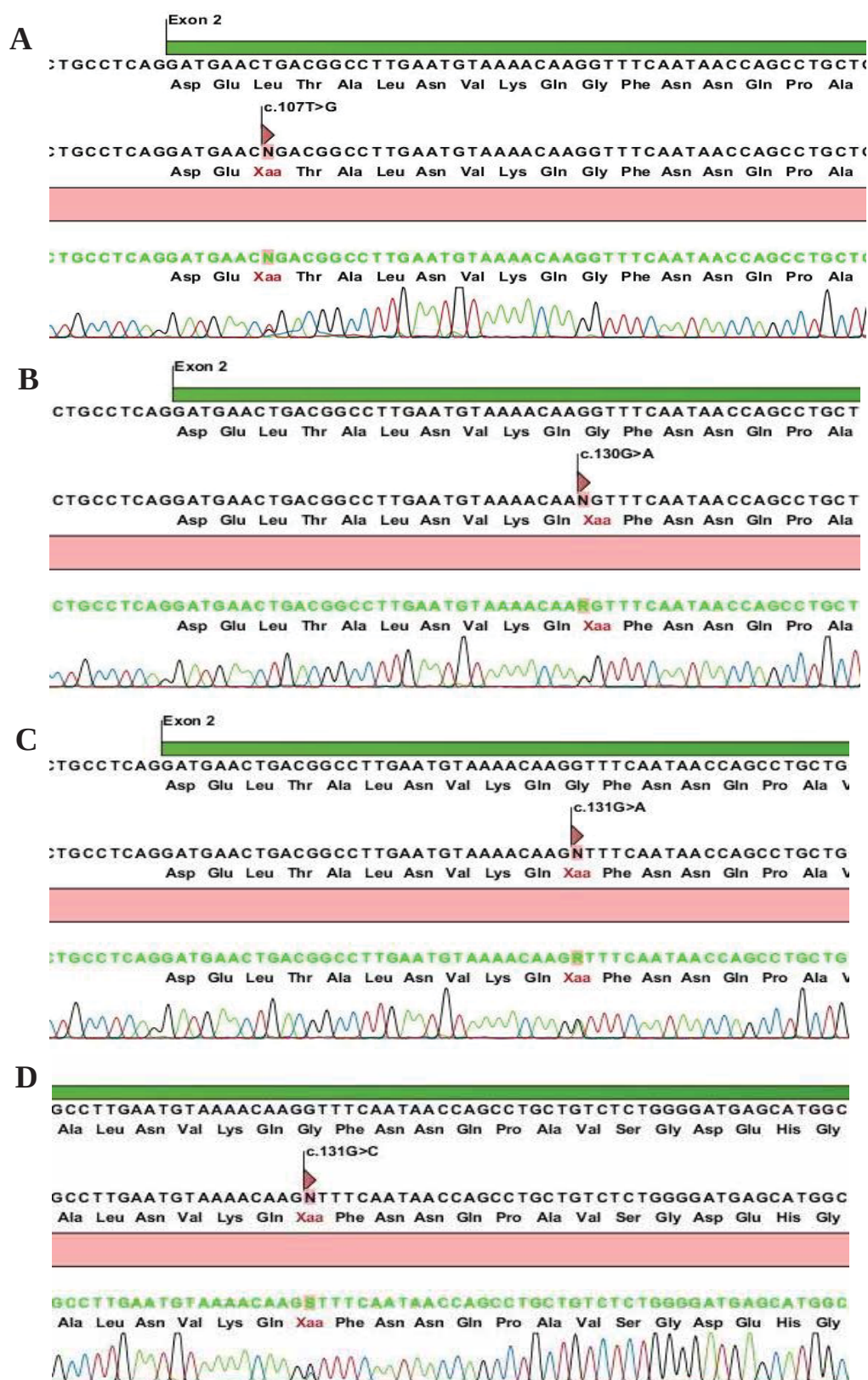


Figura 1. Eletroferogramas resultantes do sequenciamento do gene *MED12*. **A.** Caso 729TA com a mutação c.107T>G, p.L36R; **B.** Caso 683TB com a mutação c.130G>A, p.G44S; **C.** Caso 733TB com a mutação c.131G>A, p.G44D; **D.** Caso 954T com a mutação c.131G>C, p.G44A.

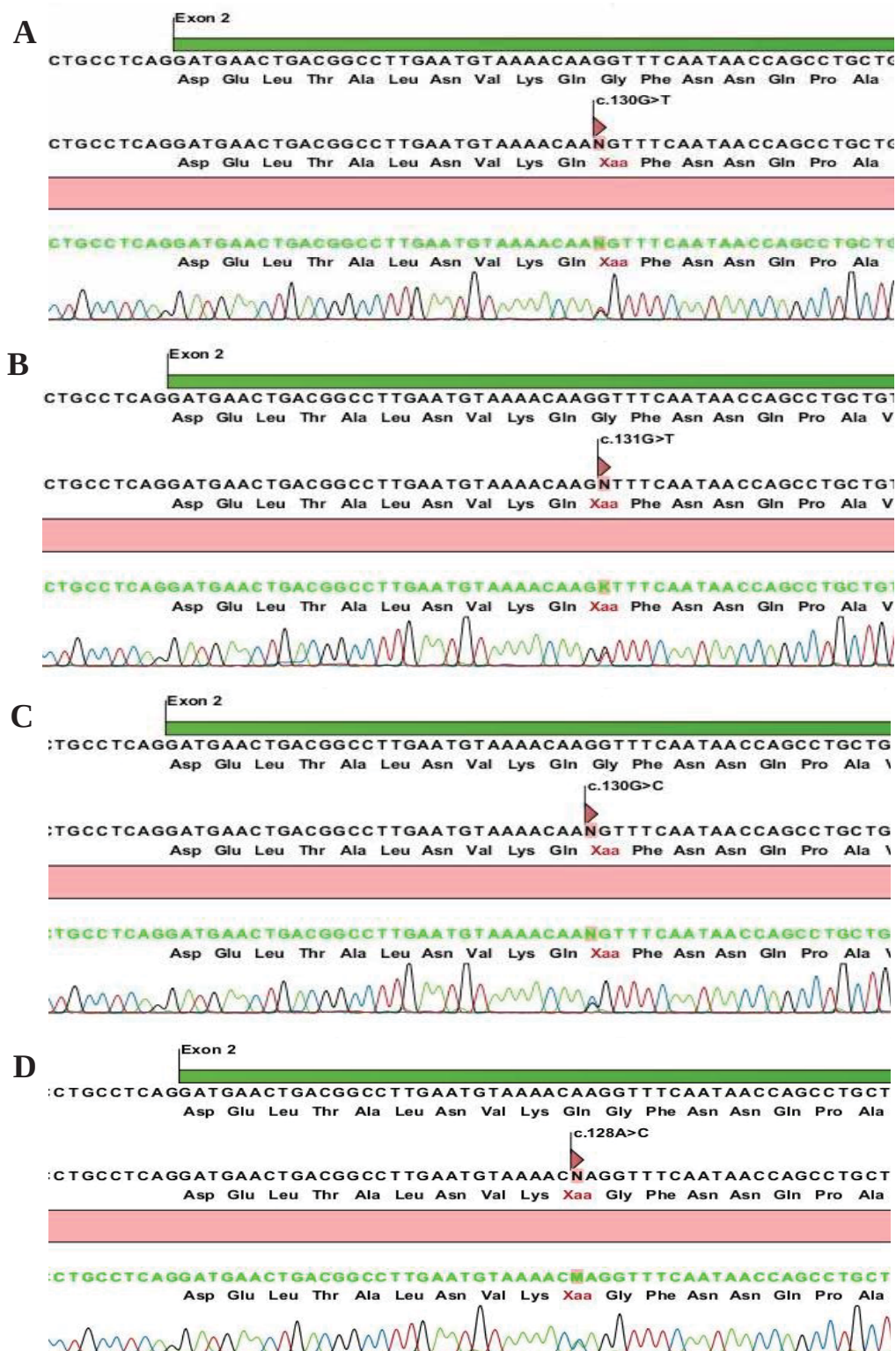


Figura 2. Eletroferogramas resultantes do sequenciamento do gene *MED12*. **A.** Caso 853T com a mutação c.130G>T, p.G44V; **B.** Caso 842T com a mutação c.131G>T, p.G44C; **C.** Caso 630TA com a mutação c.130G>C, p.G44R; **D.** Caso 304T com a mutação c.128A>C, p.Q43P.

Expressão relativa dos genes alvos *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA*

Foi avaliada a expressão dos genes-alvo usando RT-qPCR nas amostras de leiomiomas uterinos e miométrio adjacente. Foram utilizadas duas estratégias para a análise estatística, uma pareada entre o LU e o miométrio adjacente (MA) e uma não pareada, envolvendo todos os tumores e todos os MA. A Figura 3 ilustra os resultados obtidos da expressão dos genes *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA* nas duas análises.

Na análise pareada, foi observado aumento significativo dos níveis de expressão dos genes *BRCA1*, *FANCA* e *HMGA2*, nos LU quando comparado com MA ($P=0,002$; $P<0,001$ e $P=0,007$, respectivamente). Na análise não pareada, também foi verificado um aumento significativo da expressão dos genes *BRCA1* ($P<0,001$), *FANCA* ($P<0,001$) e *HMGA2* ($P<0,001$).

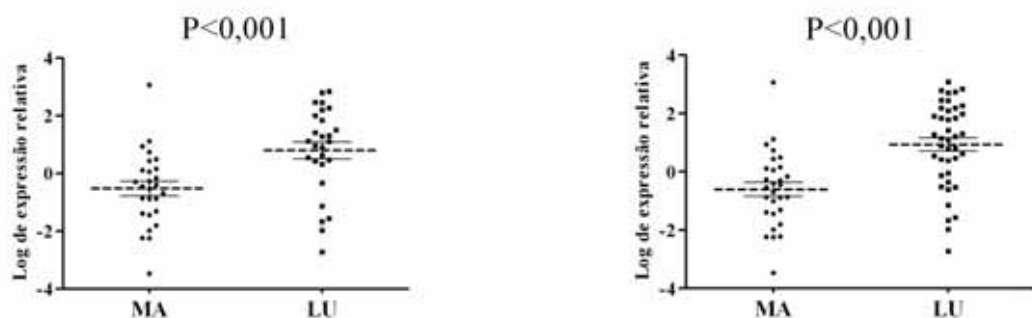
Análise Pareada

Análise Não Pareada

A. *BRCA1*



B. *FANCA*



C. *HMGA2*

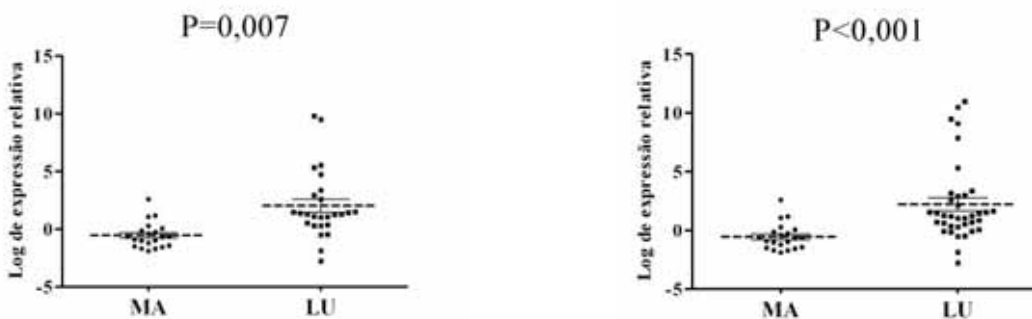


Figura 3 - Expressão relativa de *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA*, avaliados por RT-qPCR em amostras de leiomiomas uterinos e miométrios adjacentes. A coluna à esquerda mostra a análise pareada entre o LU e MA (31 amostras pareadas). A coluna à direita mostra a análise não pareada entre LU e MA (31 MA e 46 LU). O gráfico apresenta a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos normais. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student. Os níveis de expressão relativa de cada gene estão apresentados em escala logarítmica. O número de amostras (normais e tumorais) variou porque alguns casos não mostraram resultados confiáveis ou detectáveis nos genes candidatos ou de referência.

Expressão relativa dos genes e as variáveis clínicas e histopatológicas

Os resultados obtidos das análises de expressão dos transcritos foram comparados a todos os parâmetros clínicos e histopatológicos disponíveis, como idade, número de tumores, endométrio, raça, idade da menarca, índice de massa corpórea (IMC), idade da primeira gestação, número de gestações e história familiar de câncer. As figuras 4, 5 e 6 mostram os níveis de expressão dos genes *HMGA2*, *BRCA1* e *FANCA*, respectivamente, de acordo com as principais características clínicas avaliadas.

Para o gene *BRCA1* (Figura 4), não foi observada nenhuma correlação significativa com os dados clínicos. Pacientes com idade de menarca tardia foram associadas com menor nível de expressão do gene *FANCA* ($P=0,017$) (Figura 5B).

As pacientes que se encontram na fase secretória do ciclo menstrual apresentam um aumento marginalmente significativo ($P=0,047$) no nível de expressão do gene *HMGA2* quando comparado às pacientes na fase proliferativa do ciclo menstrual (Figura 6C).

Os testes de correlação dos genes com a idade das pacientes não mostrou ter significado estatístico (teste de Pearson) (Figura 7). Os genes *BRCA1* e *FANCA* apresentaram uma forte correlação ($R=0,613$) ($P<0,001$).

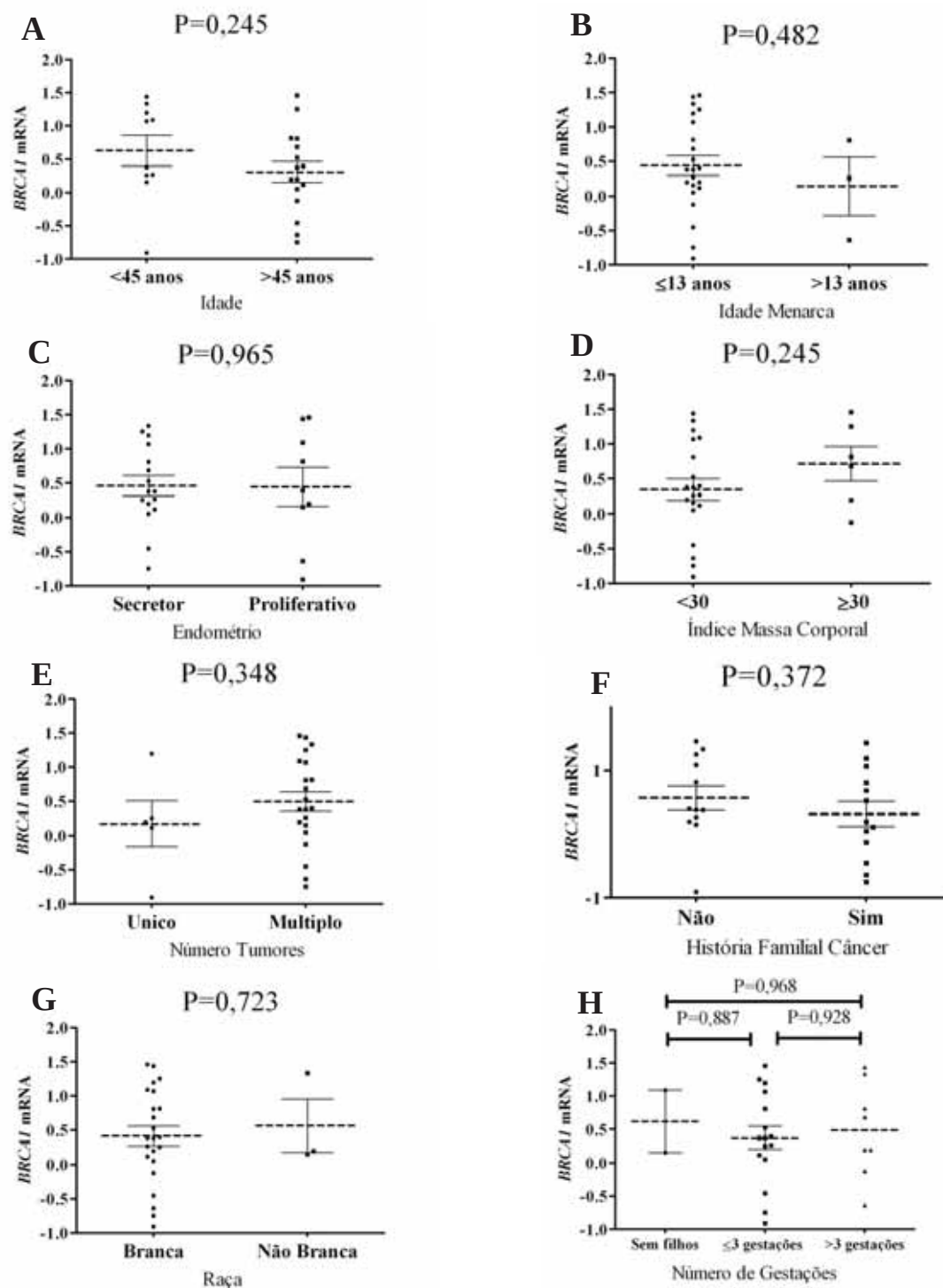


Figura 4 - Níveis dos transcritos de *BRCA1* segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Turkey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

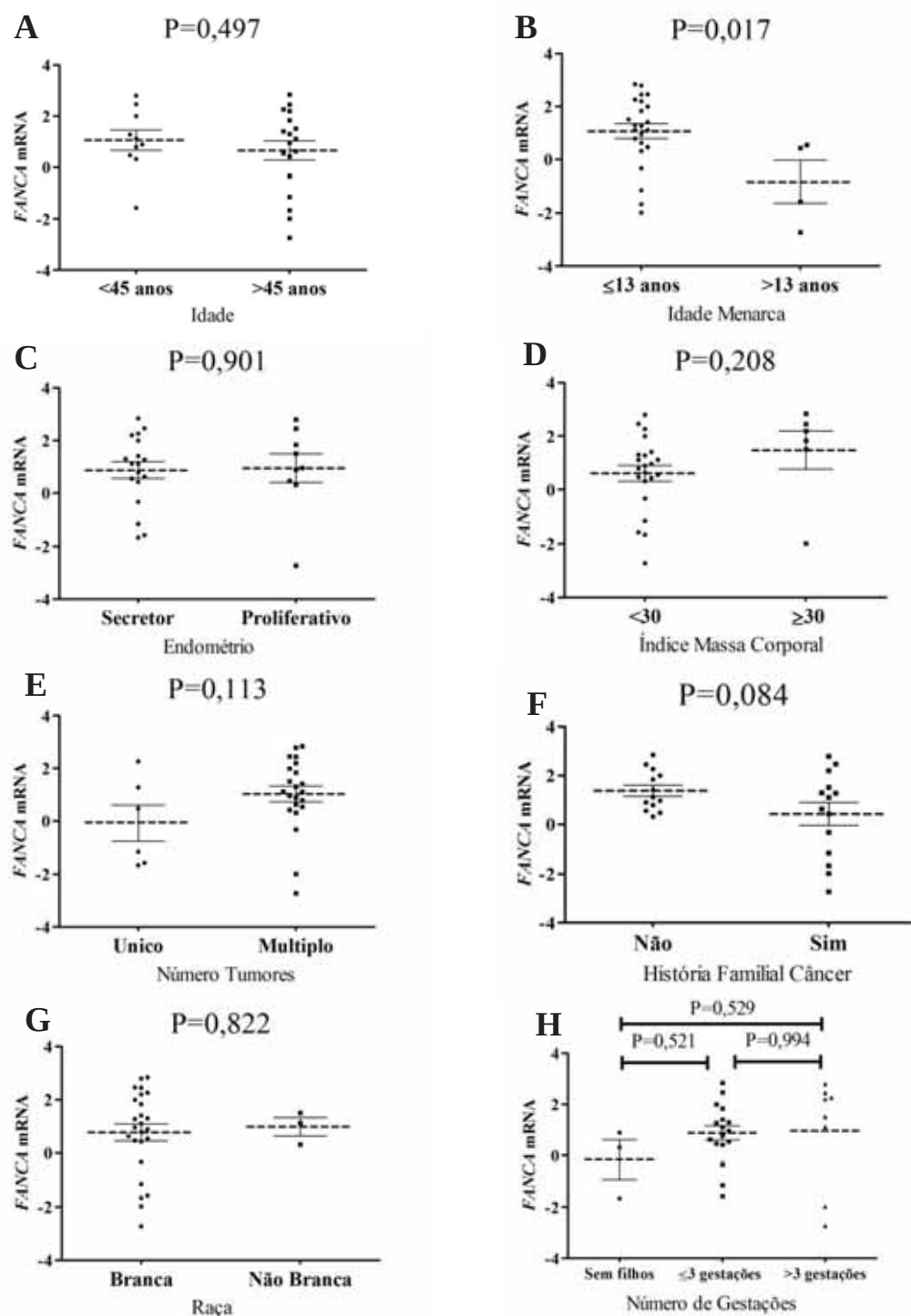


Figura 5- Níveis dos transcritos de *FANCA* segundo: **A.** Idade; **B.** Idade menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Esta apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Turkey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

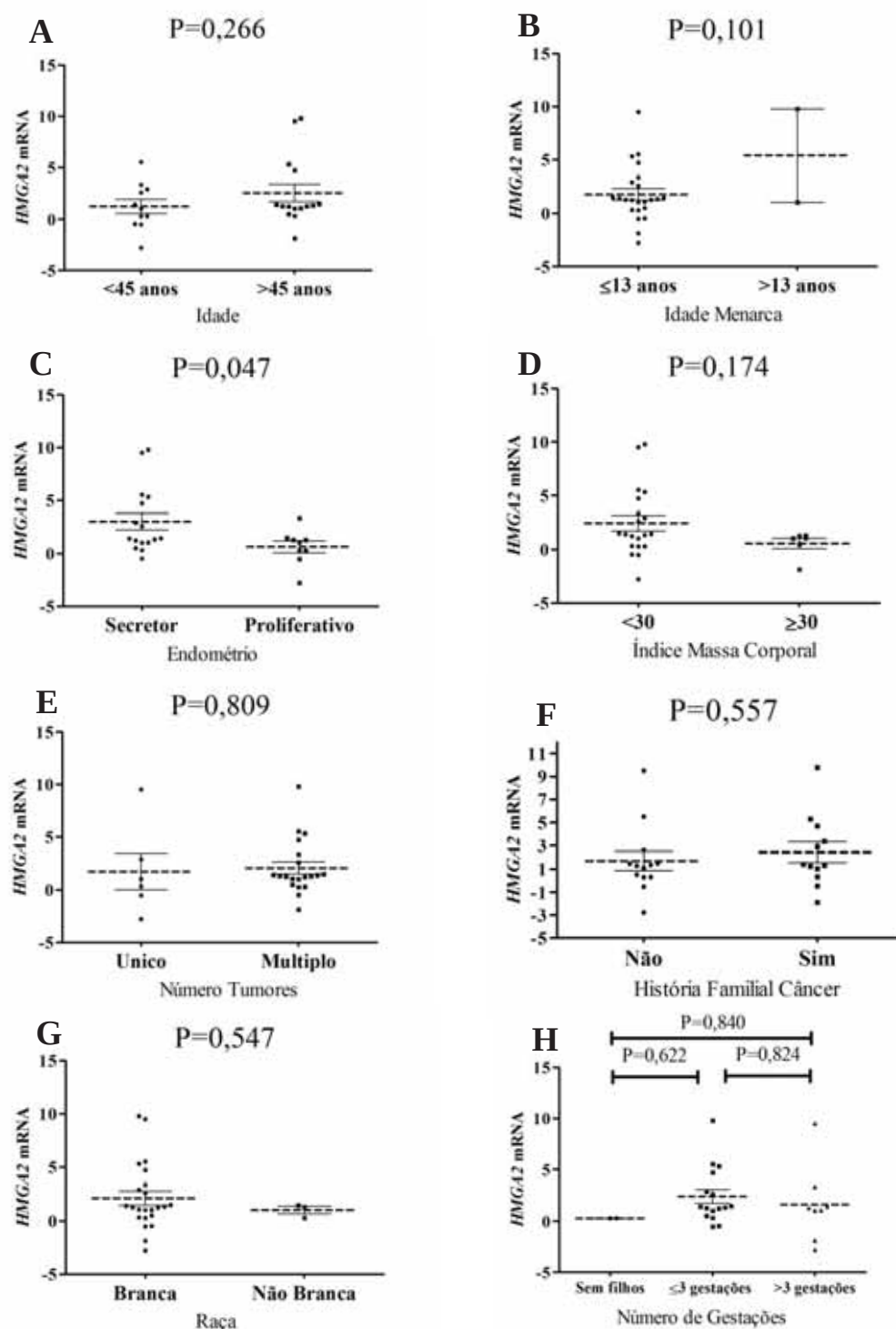


Figura 6 - Níveis dos transcritos de *HMG42* segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do Ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Turkey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

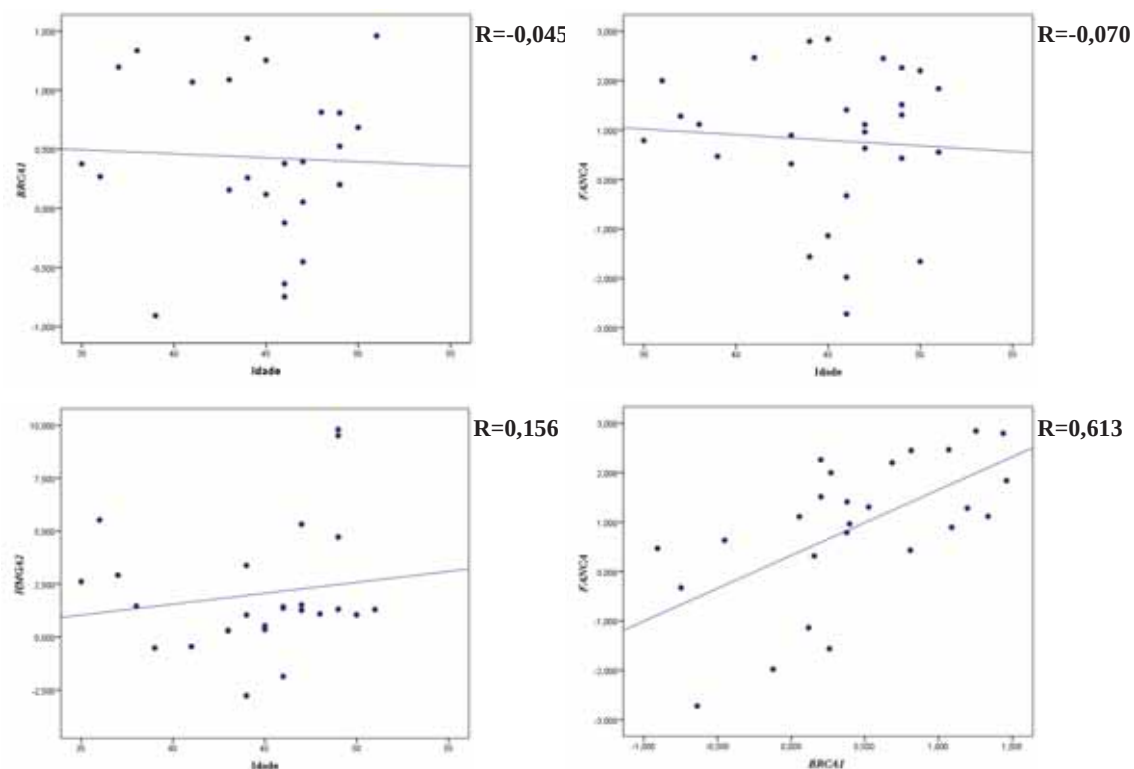


Figura 7 – Análise de correlação entre os genes e a idade: **A.** *HMGA2*; **B.** *BRCA1*; **C.** *FANCA*. Análise de correlação entre os genes: **D.** *BRCA1* e *FANCA*. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Expressão relativa dos miRNAs: miR-106b, miR-25, miR-93, miR-21, let-7a, miR-26a, miR-26b, miR-143 e miR-197

Escolha das referências para a normalização de RT-qPCR dos miRNAs

Foram selecionados como possíveis miRNAs de referência dois transcritos codificadores de miRNAs (miR-23b e miR-16) e um conjunto de quatro transcritos codificadores de pequenos RNAs nucleolares (RNU44, RNU48, RNU6B e RNU47). O pré-teste para a análise de expressão de miRNAs incluiu sete controles (miométrio adjacente) e sete amostras de leiomiomas uterinos (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão relativa, fator de normalização e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos seis transcritos (miR-16, miR-23b, RNU6B, RNU44, U47 e RNU48) candidatos a normalizadores que foram testados no estudo. Observa-se que o RNU48 apresentou expressão mais estável (verde) individualmente e RNU6B é o mais variável (vermelho) nas 14 amostras testadas (7 amostras de miométrio adjacente e 7 leiomiomas uterinos). O fator de normalização representa a média geométrica da expressão relativa dos seis candidatos avaliados.

	RNU44	RNU48	RNU6B	miR16	miR23b	U47	Fator de Normalização
1015	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,1620
300M	0,740	0,641	0,230	1,005	1,724	1,005	0,8810
317M	0,529	0,519	0,166	1,227	1,402	0,762	0,7265
644	0,252	0,441	0,391	0,520	0,884	0,229	0,4734
761	0,763	0,803	1,123	1,194	2,895	0,916	1,3230
769M	1,067	0,792	0,546	0,711	0,731	0,613	0,8442
790	1,227	0,775	0,998	1,031	1,984	1,009	1,2998
842T	1,040	0,838	1,106	0,741	2,828	0,761	1,2483
844	1,147	1,182	1,055	1,007	2,293	1,666	1,5440
844M	1,089	0,798	0,715	1,239	1,630	1,123	1,2304
855M	0,550	0,686	0,736	1,102	0,880	0,782	0,8963
867	1,080	1,163	0,756	0,860	1,695	0,968	1,2201
901M	0,599	0,559	0,280	2,031	1,659	0,762	0,9165
947M	0,770	0,548	0,172	0,963	1,863	0,970	0,8231
M < 1.5	0,614	0,578	0,989	0,746	0,735	0,621	

Os resultados do teste demonstraram que RNU6B e miR-16 apresentavam expressão muito variável para uso como calibradores de expressão dos miRNAs (M=0,989 e M=0,746 respectivamente). Após a remoção em série dos transcritos menos estáveis, o programa geNorm (disponível em,

<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) indicou que RNU44 e RNU48 era o melhor par de transcritos, seguidos da inclusão de U47, miR-16, miR-23b e RNU6B, respectivamente (Figura 8).

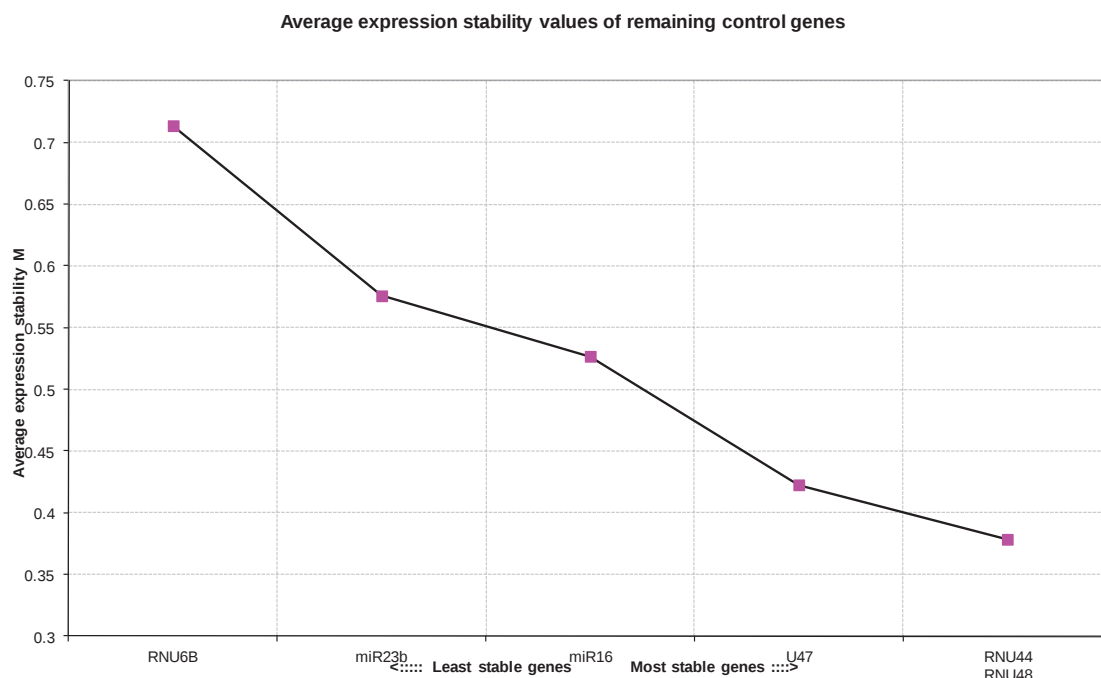


Figura 8 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos (RNU44, U47, RNU48, miR-16, miR-23b, RNU6B) candidatos a normalizadores. O cálculo para a determinação das melhores referências após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estáveis, indicou o RNU44, RNU48 e U47 como o melhor grupo de genes.

O conjunto de microRNAs para referência foi também estimado e esta análise mostrou que deveriam ser utilizados dois ou três microRNAs de referência. O desvio ideal entre os fatores de normalização foi obtido com a utilização de apenas dois transcritos (RNU44 e RNU48), a inclusão de um terceiro transcrito (U47) não alterou o resultado ($V2/3=0.135$). Portanto, com a utilização de apenas três microRNAs de referência, foi possível atingir o ideal ($<0,150$) proposto por Vandesompele et al. (2002). Assim, neste estudo optou-se por utilizar três microRNAs de referência: RNU44, U47 e RNU48 (Figura 9).

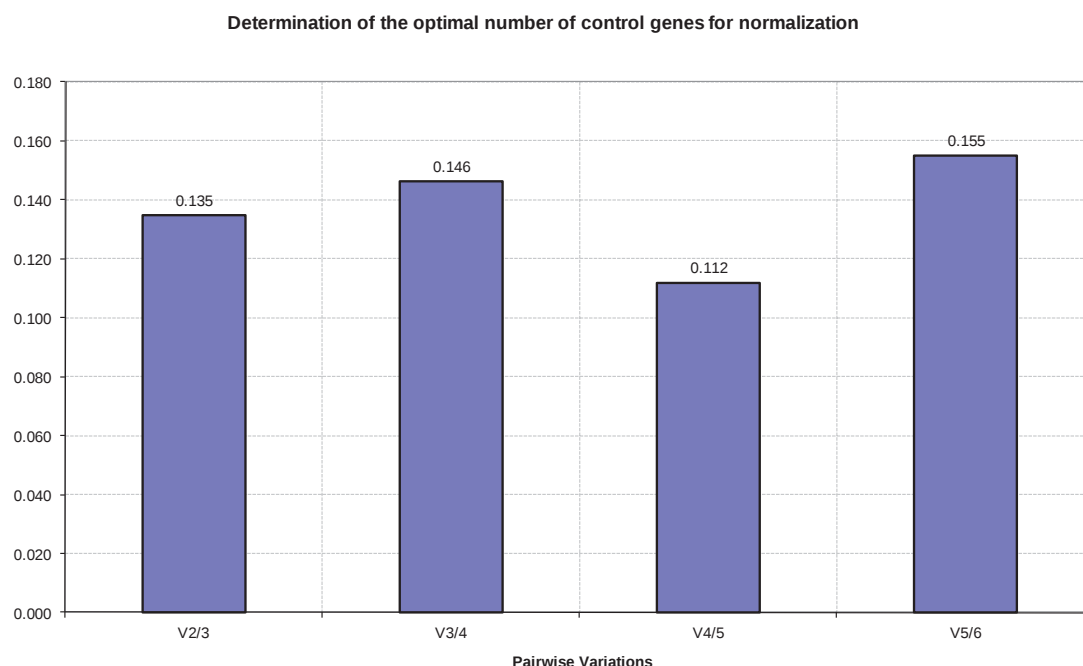


Figura 9 - Determinação do número adequado dos transcritos (miR-16, miR-23b, RNU6B, RNU44, U47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados. O uso dos três transcritos mais estáveis (2/3) permitiu a normalização com grande fidelidade (RNU44, U47 e RNU48). Esta análise estima o número de transcritos de referência mais apropriado pelo impacto da adição sequenciada dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização.

Expressão diferencial dos miRNAs entre as amostras de leiomiomas uterinos e miométrio adjacente

Foram realizadas comparações entre as amostras tumorais e normais, mostrando uma diminuição significativa dos níveis de expressão dos microRNAs nas amostras tumorais quando comparados com as amostras de miométrio: miR-106b ($P < 0,001$, Figura 10A), miR-25 ($P = 0,016$, Figura 10B), miR-93 ($P = 0,003$, Figura 10C), let-7a ($P < 0,001$, Figura 10E), miR-26a ($P < 0,001$, Figura 8F), miR-26b ($P < 0,001$, Figura 10G), miR-197 ($P < 0,001$, Figura 10H), e miR-143 ($P < 0,001$, Figura 10I).

O miR-21 analisado, não apresentou diferença significativa entre as amostras tumorais e normais ($P = 0,365$) (Figura 10D).

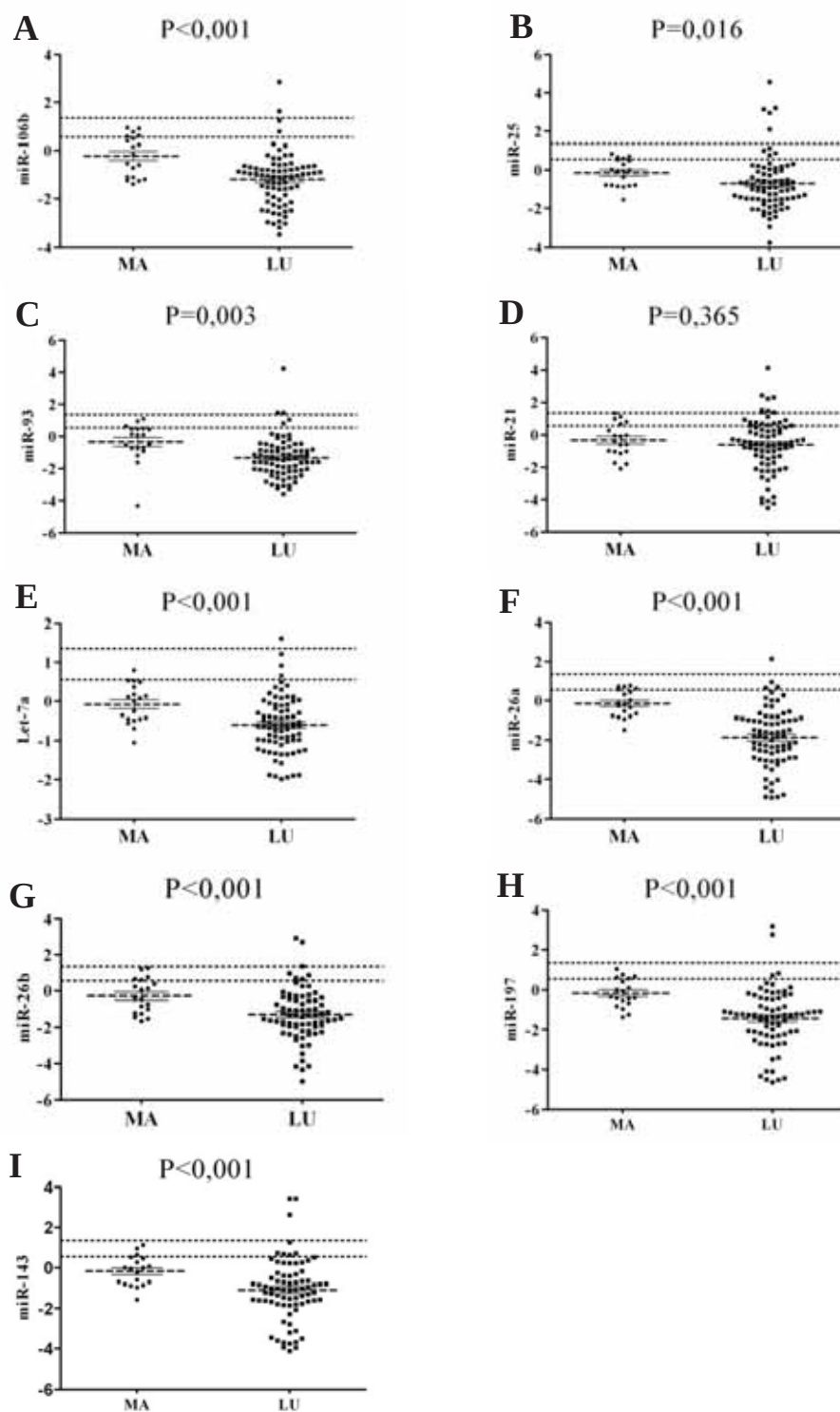


Figura 10 - Expressão relativa dos miRNAs: A. miR-106b (*HMGA2*); B. miR-25; C. miR-93 (*HMGA2*); D. miR-21; E. let-7a (*HMGA2*); F. miR-26a (*HMGA2*, *FANCA*); G. miR-26b (*HMGA2*, *FANCA*); H. miR-197 (*BRCA1*); I. miR-143 (*BRCA1*) avaliados por RT-qPCR em amostras de leiomiomas uterinos (N=77) e miométrio (N=19). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos tecidos normais. Está apresentada a mediana da expressão de cada miRNA em cada grupo (linhas pontilhadas). Os valores de *P* foram obtidos pelo teste t-Student. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Todos, exceto o miR-21 mostraram diferença nos níveis de expressão entre os LU e o MM.

Expressão relativa dos miRNAs e as variáveis clínicas e histopatológicas

Os dados dos níveis de expressão dos miRNAs testados foram comparados com os parâmetros clínicos e histopatológicos disponíveis, como idade, número de tumores, fase do ciclo menstrual, raça, idade menarca, IMC, idade da primeira gestação, número de gestações e história familiar de câncer.

A figura 11 ilustra os níveis de expressão dos miRNAs que apresentaram associação significativa com os dados clínicos (os dados completos estão apresentados no Suplemento). Foi encontrada uma diminuição significativa na expressão do miR-106b em pacientes na fase secretora do ciclo menstrual ($P=0,050$; Figura 11.A). O miR-25 também apresentou uma diminuição significativa na expressão durante essa fase do ciclo ($P=0,032$; Figura 11.B). Pacientes com idade inferior a 45 anos apresentaram menores níveis de expressão do miR-26a ($P=0,045$; Figura 11.C). Apesar do miRNAs miR-143 e miR-26b não apresentarem nenhuma associação significativa com os dados clínicos, foi observada uma tendência a diminuição de expressão durante a fase secretória do ciclo celular ($P=0,054$, Figura 11.D; $P=0,051$; Figura 11.E, respectivamente). Pelo teste de Pearson, o miR-143 mostrou correlação baixa com o aumento da idade ($R=0,323$, $P=0,017$; Figura 11.F).

Não foram detectadas associações significativas dos miR-93, miR-21, let-7a e miR-197 com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes (Suplemento).

As figuras 12 e 13 representam os gráficos das análises de correlação dos miRNAs testados que possuem valores de R superiores a 0,5 (teste de Pearson). Os gráficos referente às análises de correlação com valores de R inferiores a 0,5 estão disponíveis em Suplemento. Todos os miRNAs analisados apresentaram correlação significativa entre eles. No quadro 2 estão descritos os miRNAs com correlação significativa, e o valor de R obtido pelo teste de Pearson. O miR-106b apresentou uma correlação acima de 80% com os miR-25 e miR-93, esses miRNAs também apresentaram correlação acima de 0,8 entre si. O miR-26a também estava fortemente correlacionado ($R>0,8$) com os miR-26b, miR-197 e miR-143. E o miR-26b com os miR-197 e miR-143. Os quais também apresentaram correlação superior a 80% entre si.

Quadro 2. Resultados da análise de correlação (Teste de Pearson) obtidos entre as comparações com os níveis de expressão do miRNAs avaliados no estudo.

		miR25	miR93	Let-7a	miR-21	miR-26a	miR-26b	miR-197	miR-143
miR106b	Correlação Pearson	0,819	0,909	0,570	0,663	0,590	0,634	0,716	0,608
	Valor p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
miR25	Correlação Pearson		0,888	0,540	0,507	0,486	0,693	0,704	0,636
	Valor p		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
miR93	Correlação Pearson			0,446	0,537	0,441	0,577	0,632	0,513
	Valor p			0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
Let-7a	Correlação Pearson				0,315	0,462	0,533	0,526	0,490
	Valor p				0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
miR-21	Correlação Pearson					0,749	0,617	0,798	0,669
	Valor p					0,000	0,000	0,000	0,000
miR-26a	Correlação Pearson						0,872	0,898	0,819
	Valor p						0,000	0,000	0,000
miR-26b	Correlação Pearson							0,895	0,891
	Valor p							0,000	0,000
miR-197	Correlação Pearson								0,844
	Valor p								0,000

Em negrito: valores de correlação entre os miRNA superiores a 80%.

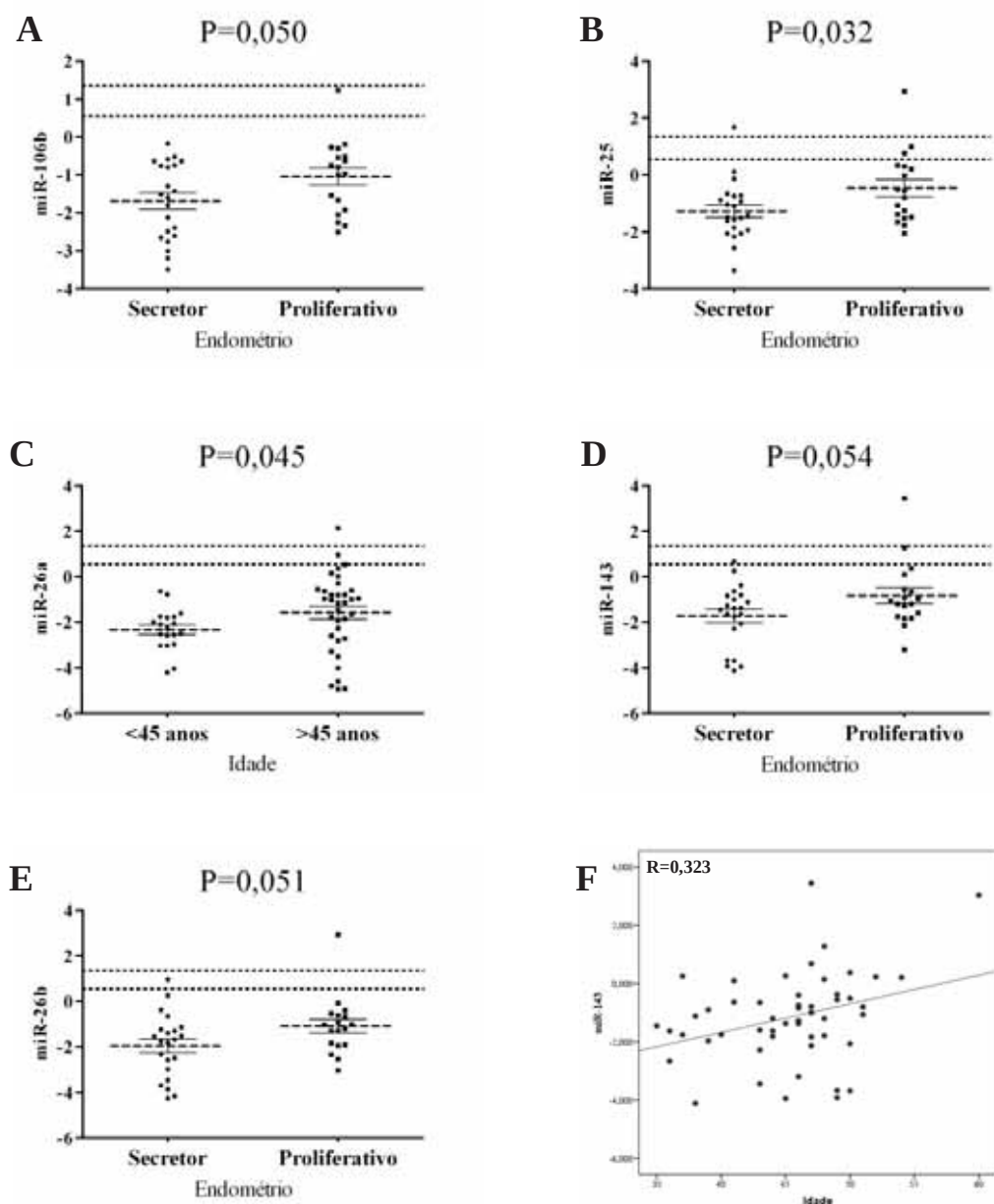


Figura 11 - Níveis de expressão dos miRNAs avaliados neste estudo segundo: **A.** miR-106b e fase do ciclo; **B.** miR-25 e fase do ciclo; **C.** miR-26a e idade; **D.** miR-143 e fase do ciclo; **E.** miR-26b e fase do ciclo; **F.** Análise de correlação entre o miR-143 e idade. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

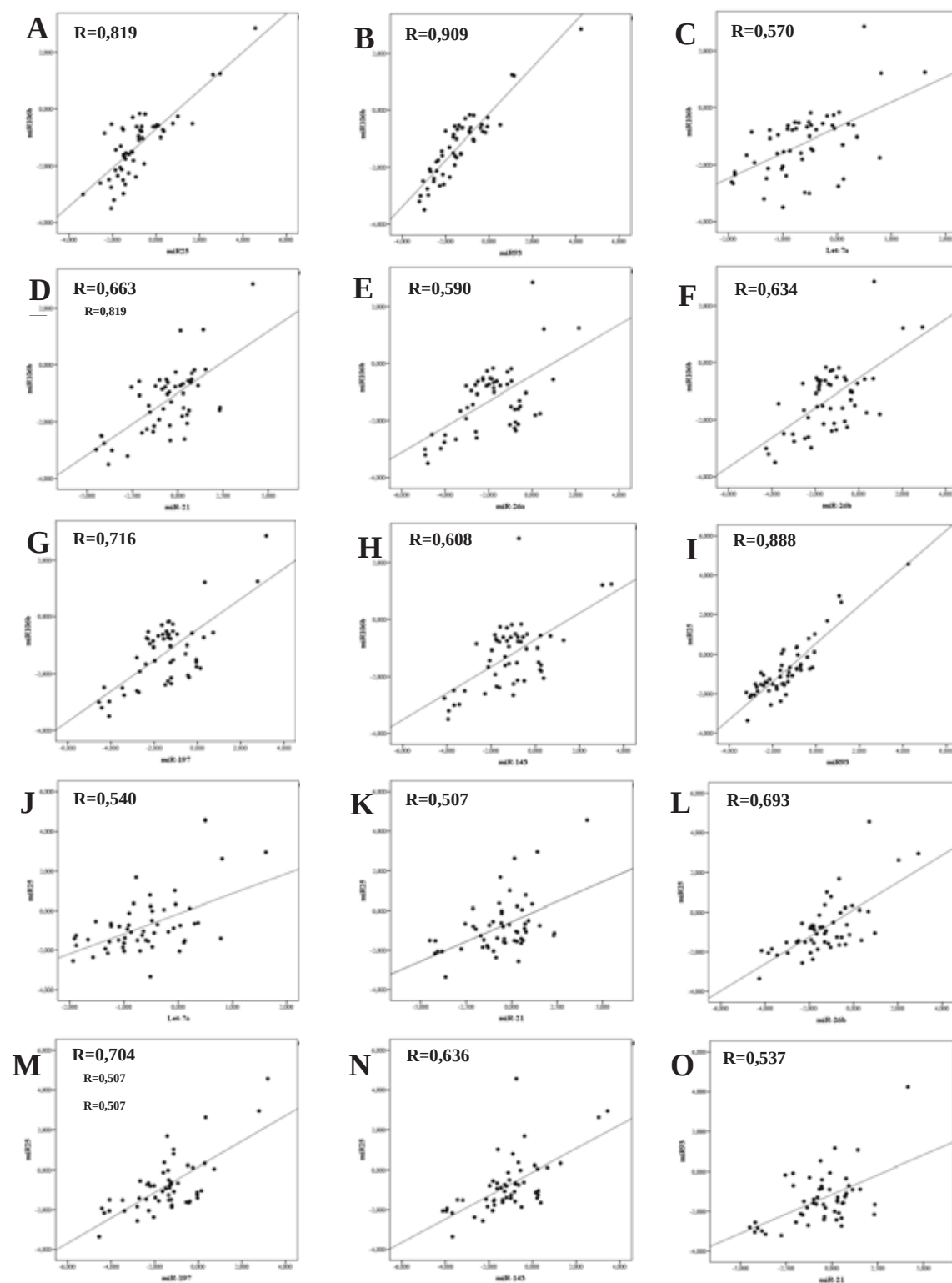


Figura 12 – Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs: **A.** miR-106b e miR-25; **B.** miR-106b e miR-93; **C.** miR-106b e let-7a; **D.** miR-106b e miR-21; **E.** miR-106b e miR-26a; **F.** miR-106b e miR-26b; **G.** miR-106b e miR-197; **H.** miR-106b e miR-143; **I.** miR-25 e miR-93; **J.** miR-25 e let-7a; **K.** miR-25 e miR-21; **L.** miR-25 e miR-26b; **M.** miR-25 e miR-197; **N.** miR-25 e miR-143; **O.** miR-93 e miR-21. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

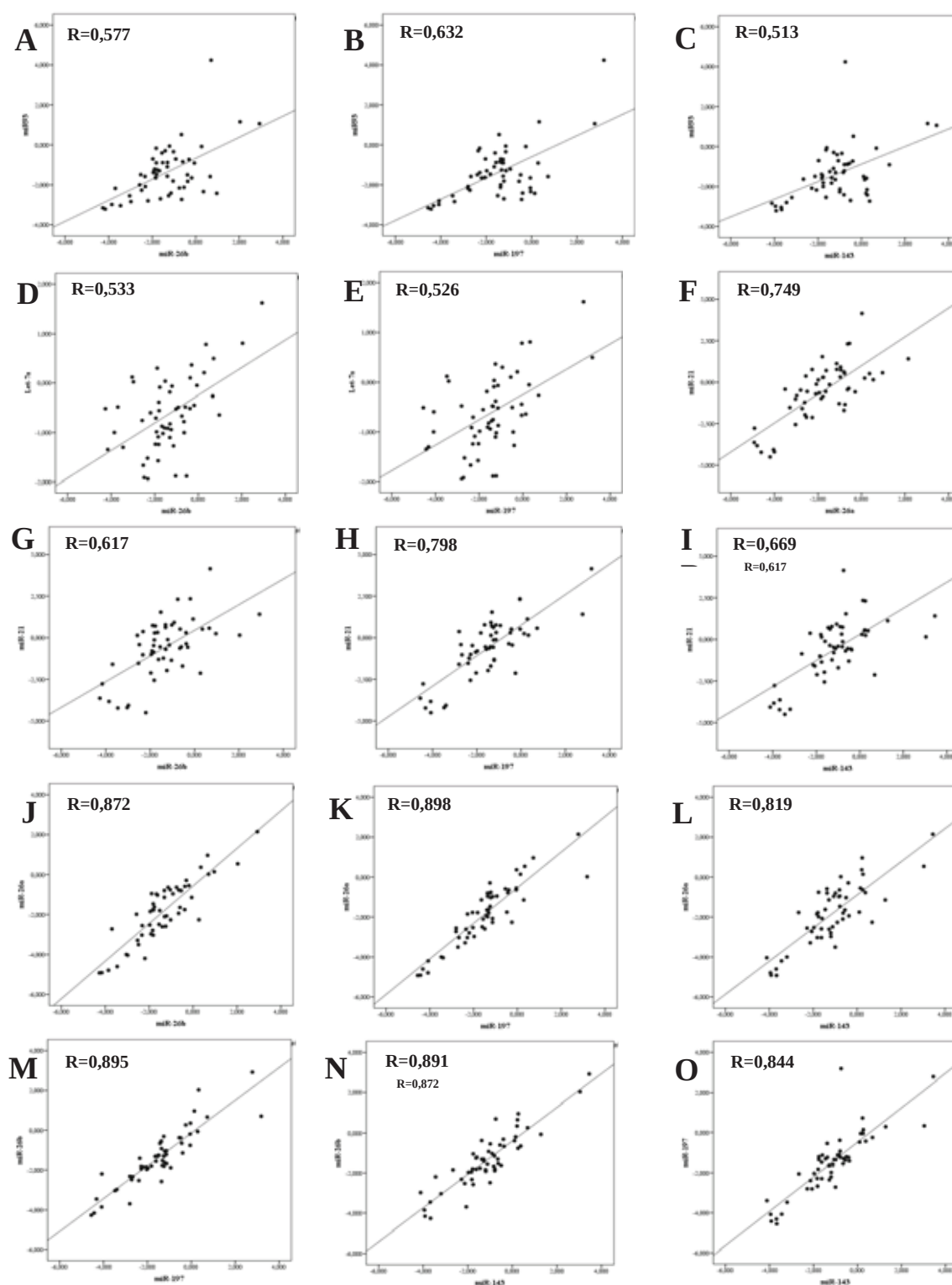


Figura 13 – Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs: **A.** miR-93 e miR-26b; **B.** miR-93 e miR-197; **C.** miR-93 e miR-143; **D.** let-7a e miR-26b; **E.** let-7a e miR-197; **F.** miR-21 e miR-26a; **G.** miR-21 e miR-26b; **H.** miR-21 e miR-197; **I.** miR-21 e miR-143; **J.** miR-26a e miR-26b; **K.** miR-26a e miR-197; **L.** miR-26a e miR-143; **M.** miR-26b e miR-197; **N.** miR-26b e miR-143; **O.** miR-197 e miR-143. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Correlação dos resultados com dados obtidos de estudo prévio de expressão gênica de receptores de estrogênio e progesterona

Foi realizado um teste de correlação entre os genes e miRNAs avaliados, com o resultado da análise de expressão gênica dos receptores de estrogênio (*ERS1*) e receptores de progesterona (*PGR*), obtidos a partir de um estudo prévio do grupo (Tese de Cirilo, 2011) (Quadro 3). A figura 14 representa os gráficos das análises que possuem correlação significativa. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Pode-se verificar uma baixa correlação entre os genes e miRNAs testados.

Quadro 3. Resultados da análise de correlação (R) (teste de Pearson) e significância estatística (P) obtidos entre as comparações com os níveis de expressão dos miRNAs e genes.

	<i>ERS1</i> R	<i>ESR1</i> P	<i>PGR</i> R	<i>PGR</i> P
miR106b	0,176	0,160	0,239	0,055
miR25	0,185	0,141	0,417	0,001
miR93	0,111	0,379	0,267	0,032
Let-7a	0,176	0,161	0,093	0,463
miR-21	0,193	0,123	0,186	0,139
miR-26a	0,151	0,230	0,041	0,745
miR-26b	0,267	0,033	0,249	0,047
miR-197	0,161	0,207	0,070	0,585
miR-143	0,222	0,075	0,179	0,153
<i>BRCA1</i>	0,094	0,437	0,229	0,056
<i>HMGA2</i>	-0,022	0,870	0,374	0,004
<i>FANCA</i>	0,276	0,021	0,249	0,038

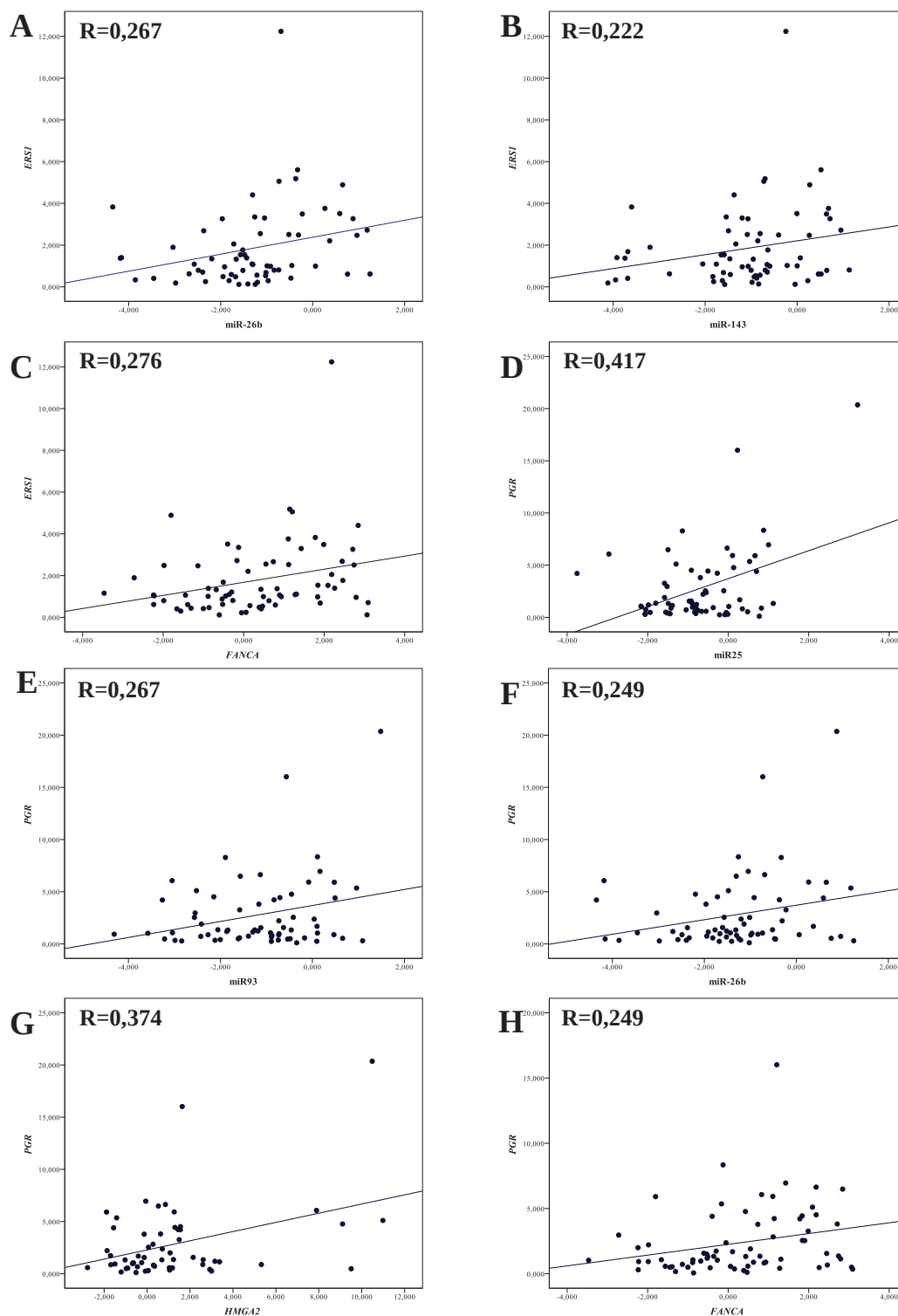


Figura 14 – Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs e genes: **A.** *ERS1* e miR-26b; **B.** *ERS1* e miR-143; **C.** *ERS1* e *FANCA*; **D.** *PGR* e miR-25; **E.** *PGR* e miR-93; **F.** *PGR* e miR-26b; **G.** *PGR* e *HMGA2*; **H.** *PGR* e *FANCA*. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Discussão

A mutação no gene *MED12* foi um dos achados de maior impacto publicado recentemente em leiomiomas uterinos (Mäkinen et al., 2011). Esse gene codifica uma das proteínas que fazem parte do complexo mediador (McGuire et al., 2012) o qual permite a ligação entre os fatores de transcrição gene-específico e a RNA polimerase II. A proteína *MED12* atua tanto na ativação quanto na repressão da transcrição e está envolvida em diversos processos do desenvolvimento (Je et al., 2012). Devido ao fato desse gene estar mapeado no cromossomo X, a inativação randômica do cromossomo X pode resultar na expressão exclusiva do alelo mutado, dando origem ao processo tumoral (McGuire et al., 2012). McGuire et al. (2012) realizaram sequenciamento do *MED12* em 148 amostras de LU. Os autores detectaram a presença de mutação heterozigota em 100/148 (67%) tumores, sendo que 53% dos leiomiomas apresentaram um SNV (do inglês, *single nucleotide variation*) *missense* no éxon 2, 11% dos leiomiomas possuíam uma inserção/deleção no éxon 2, 1% com SNV em sítio de *splicing* alternativo e 1% com inserção/deleção no sítio de *splicing* alternativo (McGuire et al., 2012). Numa análise de 1862 diferentes tecidos tumorais, Je et al (2012) analisaram relataram a presença da mutação *MED12* em 36 amostras, sendo 35 (35/67) leiomiomas uterinos e uma (1/389) em câncer de cólon, sugerindo que esta alteração é tecido-específica.

No presente estudo foi realizado o sequenciamento do éxon 2 do gene *MED12* em 85 amostras de DNA de leiomiomas uterinos e em 16 amostras de DNA de sangue periférico de um subgrupo de pacientes. Não foi observada mutação no sangue periférico pacientes testadas, semelhante ao relatado em literatura. Em adição, foi verificada uma frequência de mutação aproximada ao previamente descrito em literatura (mutações presentes em valores variáveis de 50 a 70% dos casos testados) (Mäkinen et al. 2011; Je et al., 2012; Markowski et al., 2012; McGuire et al., 2012). Em aproximadamente 40% (34/85) dos LU foi detectada a mutação no éxon 2 do *MED12*, sendo essas, mutações em ponto. Foi observado oito tipos de mutação em ponto, seis delas envolvendo o códon 44, uma no códon 43 e outra no códon 36. As mutações envolvendo o códon 44 causam a troca de uma guanina por outros nucleotídeos, a mutação no códon 43 leva a uma troca de uma adenina por uma citosina, e a mutação do códon 36 causa a troca de uma timina por uma guanina. As mutações encontradas em maior frequência foram c.131G>A e c.131G>T envolvendo 22% dos casos. Os achados descritos em literatura mostram que a mutação c.131G>A é a mais frequente e presente em cerca de 20% dos casos. Todas as mutações

encontradas no nosso estudo já foram descritas em literatura (Mäkinen et al., 2011; Je et al., 2012; Markowski et al., 2012; McGuire et al., 2012).

Markowski et al. (2012) correlacionaram a presença de mutações em *MED12* e alterações citogenéticas frequentemente relatadas nestes tumores. Os autores observaram que os tumores com presença de rearranjos em 12q14-15 envolvendo o gene *HMGA2* não apresentavam mutação no gene *MED12*. Eles concluíram que podem haver duas vias alternativas para o desenvolvimento tumoral sendo mutuamente exclusivas. Porém outros tipos de rearranjos, como a del(7q) parecem coexistir com a mutação no *MED12* e o rearranjo do *HMGA2*, sugerindo que esses rearranjos são secundários durante o desenvolvimento do tumor (Markowski et al., 2012). Porém o presente estudo mostra alguns resultados que apontam para direções contrárias. Segundo os autores, os tumores que apresentam mutação no gene *MED12* não expressariam altos níveis de *HMGA2*, uma característica de tumores com t(12;14). Quando comparamos os resultados da expressão gênica do *HMGA2* e alterações no gene *MED12*, não foi verificada a presença de dois grupos distintos. Os nossos resultados mostram que altos níveis de ganhos do *HMGA2* independem da presença ou ausência de mutação no *MED12*. O grupo de casos com a mutação inclui 5/12 casos que apresentam altos níveis de expressão, e o grupo com ausência de mutação possui 4/9 casos com aumento de expressão do gene *HMGA2*. Estes dados mostram que ambos os eventos tem relevância em LU e podem contribuir para o desenvolvimento destes tumores.

A alteração mais frequentemente relatada em leiomiomas uterinos é a translocação entre o cromossomo 12 e 14, presente em cerca de 20% dos casos que apresentam cariótipos anormais (Meloni, et al., 1992; Hodge et al., 2012). Em 12q14-15 está mapeado o gene *HMGA2*, que codifica uma proteína reguladora da transcrição gênica e de ligação ao DNA pertencente a uma família de proteínas de alta mobilidade. Esse gene é frequentemente encontrado com expressão alterada em diversos tumores benignos de origem mesenquimal, incluindo os leiomiomas uterinos (Hunter et al., 2002; Levy et al., 2012). Bormmann et al. (2003) relataram que o aumento da expressão desse gene pode alterar o mecanismo de reparo a danos no DNA. A proteína codificada por esse gene pode se ligar ao DNA levando a uma mudança na conformação de substratos ligados ao DNA e apresentar diversos efeitos biológicos, como a ativação da transcrição (Cleynen e Van De Ven 2008).

Neste estudo foram avaliadas 42 amostras de LU para análise do nível de expressão do *HMGA2* comparados a miométrios normais das mesmas pacientes. Foi

verificado um aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis de expressão do *HMGA2* na comparação com o *MA*. Este achado é concordante com outros relatos em literatura (Hunter et al., 2002; Peng et al., 2008; Klemke et al., 2009; Hodge et al., 2012). Também já foi demonstrado que os LU que apresentam a $t(12;14)$ possuem um nível de expressão ainda maior do que o verificado em tumores com cariótipos normais (Klemke et al., 2009). Nosso estudo revela que há um subgrupo de casos (casos 300TB, 629TA, 629TB, 683TB, 684T, 625T) com níveis muito altos do transcrito *HMGA2*, entretanto, não foi realizada a análise citogenética nestes tumores. Nossos achados reforçam as evidências em literatura que indicam que esse gene tem um papel fundamental no desenvolvimento dos LU, e não apenas em tumores com o rearranjo cromossômico mais comumente descrito [$t(12;14)$].

Muitos estudos tem relatado a associação entre o *HMGA2* e o miRNA let-7 (Peng et al., 2008; Klemke et al., 2009; Klemke et al., 2010). O transcrito do *HMGA2* possui aproximadamente sete sítios alvo de ligação do let-7 na região 3'UTR regulando negativamente a sua expressão (Fusco e Fedele 2007; Cleynen e Van De Ven 2008). Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo do *HMGA2* ($P < 0,001$) e uma diminuição na expressão do let-7 ($P < 0,001$) nos tumores, com um coeficiente de correlação baixo ($r = -0,364$). Peng et al. (2008) verificaram que essa associação inversa dos níveis de expressão do *HMGA2* e let-7 também pode estar correlacionada com o tamanho do tumor. Os autores relataram que tumores maiores apresentam aumento de expressão do *HMGA2* e diminuição do miRNA let-7, enquanto tumores pequenos se comportam da maneira inversa. Em nosso estudo não foi possível avaliar essa associação pois não haviam dados disponíveis sobre o tamanho dos tumores.

Usando banco de dados de predição de genes alvos de microRNAs, foram identificados outros miRNAs que poderiam atuar como reguladores do gene *HMGA2*. Foi avaliada a expressão de quatro miRNAs preditos para regular o *HMGA2* incluindo: miR-106b, miR-93, miR-26a e miR-26b. Todos esses miRNAs foram observados com expressão significativamente diminuída nos tumores sugerindo que a regulação do *HMGA2* em LU pode envolver outros miRNAs além do let-7. Para o nosso conhecimento, até o momento não foi relatada a associação desses miRNAs com o *HMGA2* em leiomiomas uterinos. A análise de correlação entre a expressão desses miRNAs e o *HMGA2* reforça essa hipótese, pois três miRNAs apresentaram correlação negativa com o gene: miR-106b ($r = -0,424$), miR-26a ($r = -0,480$) e miR-26b

($r=-0,365$). Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que estes três miRNAs podem regular negativamente a expressão do gene *HMGA2*.

Outra região frequentemente envolvida em rearranjos em LU é 7q22. Deleções envolvendo 7q22 estão presentes em aproximadamente 15% dos leiomiomas uterinos (Wang et al., 2007; Hodge et al., 2009b). Mapeado nessa região, há um *cluster* de miRNAs: miR-93, miR-106b e miR-25. Devido a alta incidência desse rearranjo em LU, estes miRNAs foram selecionados para análise da expressão por RT-qPCR. Foi observado que todos esses miRNAs apresentavam diminuição significativa de expressão no tumor (miR-106b: $P<0,001$; miR-25: $P=0,016$; miR-93: $P=0,003$). Wang e colaboradores (2007) também avaliaram o perfil de expressão dos miRNAs mapeados na região 7q22-q31.1 em 55 amostras de LU, porém apenas o miR-106b foi observado com diminuição de expressão em mais de 50% dos casos (Wang et al., 2007). No estudo prévio do grupo (Cirilo, 2011) foi encontrada perda por aCGH em 7q22 em aproximadamente 15% dos casos. No presente estudo, foi observado que mais de 50% das amostras apresentaram diminuição da expressão desses miRNAs em relação ao miométrio adjacente por RT-qPCR. Os dados apresentados sugerem que as alterações na expressão dos miRNAs não ocorrem exclusivamente pela deleção em 7q22, podendo estar envolvidos outros mecanismos de regulação além da alteração no número de cópias genômicas.

Os miRNAs mapeados em 7q22 regulam genes importantes associados com o desenvolvimento de LU. O miR-106b regula a expressão do *ESR1* e *IGF-1*, os quais foram descritos como participantes da regulação da transcrição e proliferação celular de LU (Swartz 2005; Strissel et al., 2007). Um dado adicional de um estudo prévio do grupo foi o aumento de expressão desses genes pelo método de expressão gênica global (Cirilo et al., 2012) em LU. Similarmente, foi encontrado nesse estudo prévio um aumento de expressão do gene *COL1A2*, cuja regulação é predita pelo miR-25, o qual em nosso estudo foi detectado com perda de expressão. Esse gene é importante na formação dos LU, pois está associado ao aumento de deposição de colágeno, característico desses tumores (Mesquita et al., 2010).

Recentemente, Liu e colaboradores (2012) avaliaram o papel do miR-93 na proliferação e diferenciação de células-tronco mamárias normais e tumorais. Os autores demonstraram que o aumento da expressão do miR-93 pode induzir a transição epitélio-mesênquima associada com a diminuição da expressão de diversos genes reguladores de células-tronco, como o *HMGA2* (Liu et al., 2012). Estes resultados suportam a hipótese que o miR-93 é um regulador do *HMGA2*. Chuang e

colaboradores (2012) avaliaram o nível de expressão dos miR-93 e miR-106b e do gene *MCM7*. Os autores verificaram uma expressão significativamente menor do miR-93 e maior do *MCM7* nos leiomiomas comparado ao miométrio. Foi observado que o ganho de função dos miR-93 e miR-106b em linhagens celulares do músculo liso de leiomiomas e do endométrio, dependente da dosagem, reduz *F3* e *IL8* por meio da interação direta a região 3'UTR dos genes e pela repressão de *F3*, o qual indiretamente inibe a expressão de *IL8*, *CTGF* e *PAI-1*. Os autores concluíram que a expressão alterada dos miR-93 e miR-106b, sua função regulatória direta ou indireta na expressão de *F3*, *IL8*, *CTGF* e *PAI-1*, e seu papel fundamental na inflamação e inibição de proliferação tecidual, podem ser um importante mecanismo no crescimento dos leiomiomas e estarem associados com a manifestação dos sintomas (Chuang et al., 2012).

Entre os nove miRNAs avaliados nesse estudo, oito apresentaram diminuição no nível de expressão em LU quando comparados ao miométrio. Estes dados revelam um importante envolvimento dos miRNA em LU. A desregulação de diversos microRNAs em câncer já é bem estabelecido. Um estudo em leiomiomas uterinos avaliou o perfil de expressão de 213 miRNAs sendo relatado que 91 deles possuíam expressão alterada (Pan et al., 2007). A maior parte desses miRNAs apresentou diminuição de expressão no tecido tumoral em relação ao miométrio. Assim como o resultado observado em nosso estudo, entre os oito miRNAs encontrados alterados, sete apresentavam perfil de expressão semelhante ao relatado por Pan et al. (2007). A diferença do nosso estudo com o descrito pelos autores, é que não foi observada diferença significativa da expressão do miR-21 no nosso relato. Wang et al. (2007) analisaram o perfil de expressão de 206 miRNAs em LU, e 45 deles apresentaram expressão desregulada. Dentre os cinco miRNAs com maior nível de alteração, está presente o miR-197, com diminuição de expressão, assim como verificado no presente estudo. Porém o miR-21 também estava entre os cinco mais desregulados, com aumento de expressão, enquanto em nosso estudo essa alteração não foi observada. Esses achados indicam que a desregulação da expressão de miRNAs pode influenciar no processo tumoral dos LU de uma maneira global, e não apenas por alterações em determinados miRNAs.

Uma diferença entre estes estudos publicados em LU envolvendo miRNAs é que os autores utilizaram uma abordagem de triagem para identificar aqueles que teriam relevância nestes tumores. No presente estudo, a seleção dos miRNAs investigados foi realizada baseada em estudos prévios do grupo. O fato de

confirmarmos os achados esperados em oito dos nove miRNAs testados demonstra a confiabilidade dos resultados obtidos.

Wang et al. (2007) relataram diferenças no perfil de expressão de miRNAs entre mulheres brancas e negras. No presente estudo, não houve diferença quanto a raça, entretanto é muito difícil estratificar a população brasileira. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo o resultado de cinco séculos de cruzamentos entre diferentes etnias de três continentes: imigrantes e colonizadores Europeus; escravos Africanos; e os índios Americanos. Por esta razão, é muito difícil estratificar os indivíduos baseando-se na cor de pele, por exemplo. Diversos estudos foram realizados durante as últimas décadas, com o objetivo de caracterizar o perfil genético da população Brasileira não indígena (Salzano et al. 1997; Callegari-Jacques and Salzano 1999; Guerreiro et al., 1999). Estes estudos incluíram diversas amostras das regiões do norte e sul do país. Com base nos marcadores genéticos clássicos, esses estudos demonstraram que todos os grupos analisados apresentam um grau de miscigenação e a variação desse grau depende da região analisada. Além disso, o estado de São Paulo é um centro de imigração. Assim, a cor como determinante físico, é uma fraca característica de predição da ancestralidade genética (Salzano, 2002; Sans, 2000) e de difícil avaliação quanto sua correlação com determinadas características clínicas.

Wang et al (2007) também relataram diferenças no nível de expressão dos miR-31 e miR-368 em relação a fase do ciclo ovariano da paciente (classificada como folicular, luteínica e inativa). Em nosso estudo, o miR-106b ($P=0,05$) e miR-25 ($P=0,032$) apresentaram correlação significativa com a fase do ciclo do endométrio, ambos demonstraram uma diminuição de expressão na fase secretória do ciclo. Outros dois miRNAs, o miR-26b ($P=0,051$) e o miR-143 ($P=0,054$), apresentaram uma significância apenas marginal na comparação com a fase do ciclo menstrual. Esses dados indicam que a expressão desses miRNAs pode estar associada as mudanças hormonais do ciclo e a regulação de genes envolvidos nessas mudanças.

Assim como os miRNAs, espera-se que diversos genes possuam expressão alterada nas diferentes fases do ciclo menstrual, devido a dependência hormonal desses tumores, podendo ser diferencialmente estimulados segundo a variação do estrógeno e progesterona durante o ciclo menstrual. Entretanto, um estudo anterior do grupo avaliou expressão global de transcritos as amostras de LU de 20 pacientes na fase proliferativa e 31 na fase secretora do ciclo menstrual, a fim de verificar se havia um perfil de expressão característico de cada fase do ciclo. Porém os resultados

demonstraram que as amostras não se agruparam de acordo com a fase do ciclo, sugerindo que os tumores possuem um perfil de expressão semelhante independente da fase do ciclo. Apesar dos LU não apresentarem um perfil de expressão característico da fase do endométrio, no presente estudo foi encontrado um aumento marginalmente significativo ($P=0,047$) no nível de expressão do gene *HMGA2* em pacientes na fase secretória do ciclo menstrual. A função desse gene ainda não foi correlacionada com a manutenção do ciclo menstrual e regulação dos receptores de estrógeno e progesterona.

O miR-26a apresentou uma correlação significativa ($P=0,045$) com a idade da paciente, estando com menor expressão em mulheres com menos de 45 anos e maior expressão em mulheres acima de 45 anos. Wang et al. (2007) também relataram quatro miRNAs (miR-208, miR-381, miR-339 e o miR-7-1) associados à idade quando separaram as pacientes em três grupos: com menos de 40 anos, entre 41 e 50, e mais de 50 anos. Para o nosso conhecimento, a associação do miR-26a com a idade ainda não foi descrita em LU.

Um dos genes preditos para regulação do miRNA-26a é o *FANCA*. Esse gene está associado a anemia Fanconi, uma doença caracterizada pelo aumento de quebras cromossômicas, aumento da sensibilidade aos agentes que causam danos no DNA e câncer (Hays et al., 2012). A anemia de Fanconi é causada por uma mutação bialélica (doença recessiva) ou ligada ao cromossomo X. São descritos 15 genes relacionados à anemia de Fanconi, sendo um deles o *FANCA* (Hays et al., 2012). Recentemente, este gene também foi associado ao câncer de mama familiar, envolvendo deleções heterozigotas da sua região promotora (Solyom et al., 2011). Crabtree et al. (2009) identificaram expressão reduzida desse gene em LU. Porém no nosso estudo foi observado um aumento significativo ($P=0,011$) da expressão do gene *FANCA* em LU quando comparados com o miométrio normal.

O gene *FANCA* e o *BRCA1* foram selecionados para validação nesse estudo, por serem identificados no estudo prévio como tendo a maior interação proteica entre todos os demais genes identificados na análise integrada de expressão de transcritos e alterações genômicas identificadas por aCGH (Cirilo et al, 2012). Nesse estudo prévio, 51 amostras de LU tiveram seus dados de alterações no número de cópias e expressão de transcritos integrados para identificar genes moduladores relacionados com o fenótipo tumoral. Foi possível a identificação de 75 genes moduladores que explicaram o comportamento de expressão dos genes diferencialmente expressos. Entre esses genes, 26 apresentaram correlação positiva (ganho genômico/aumento de expressão), três apresentaram correlação negativa (perda genômica/diminuição de expressão), e 45

genes e uma ORF apresentaram correlação inversa. O resultado de correlação inversa revela o envolvimento de outros mecanismos de regulação gênica associado aos LU, por exemplo, epigenéticos. A amplificação ou deleção na sequência do DNA é apenas um dos vários mecanismos possíveis para alterações nos níveis de expressão. O papel dos miRNAs no processo tumoral de vários tipos de câncer tem sido muito estudado atualmente. Por essa razão foi realizado um levantamento dos genes que poderiam ser regulados por miRNAs dessa lista de genes considerados moduladores. Entre os genes moduladores que apresentavam correlação inversa, 30 eram preditos de regulação por miRNA de acordo os softwares de predição de genes alvos. Os genes que mostraram correlação inversa podem ser regulados por outros mecanismos epigenéticos por exemplo, a metilação do DNA. Considerando que mais de 50% dos genes moduladores apresentam relação inversa entre os resultados de alterações no número de cópias e nível de expressão, podemos supor que alterações no número de cópias genômicas pode não ser o principal mecanismo de regulação da expressão dos genes alterados em sua expressão em LU. Frente a esses resultados, selecionamos os genes *FANCA* e *BRCA1* que foram detectados como genes moduladores pela análise integrada, e que apresentaram correlação inversa ente os dados genômicos e transcriptômicos.

Para predição dos miRNAs que regulam esses genes foram utilizados três algoritmos disponíveis online, o TargetScan (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar>) e miRDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/search.jsp#r>). Como reguladores do gene *FANCA* foram selecionados dois miRNAs: miR-26a e miR-26b, e do *BRCA1* foram selecionados os miR-143 e miR-197. Primeiramente foi avaliado o nível de expressão dos genes por RT-qPCR. O gene *FANCA* apresentou aumento significativo ($P=0,011$) de expressão nos tumores em relação ao miométrio adjacente. Pelo algoritmo de predição usado na análise integrada de Cirilo et al (2012), que gerou os 75 genes moduladores, esse gene apresentava um perfil de ganho genômico e diminuição de expressão do transcrito. Ao reavaliar, caso a caso as amostras estudadas no estudo prévio e que também fazem parte deste estudo, verificamos que 35 LU estavam envolvidos em ganho genômico e 16 em perda genômica do gene *FANCA*, enquanto o resultado do *microarray* de expressão mostrou diminuição significativa da expressão do transcrito pelos métodos de análises utilizados. A metodologia de RT-qPCR tem maior poder para identificar alteração nos níveis dos transcritos do que a técnica de arrays de expressão. A literatura apresenta vários exemplos onde o detectado na análise de *microarrays* de expressão não é confirmado por técnicas mais refinadas. O ganho

genômico observado anteriormente em 35 LU pode estar correlacionado com o aumento de expressão verificado em 30/44 amostras tumorais analisadas por RT-qPCR. Além disso, a diminuição significativa de expressão dos miR-26a e miR-26b, preditos por regular esse gene, poderiam explicar o achado de aumento da expressão do transcrito verificada por RT-qPCR.

O gene *BRCA1* apresentou um aumento significativo de expressão no grupo tumoral em relação ao miométrio adjacente ($p < 0,001$). No estudo de Cirilo et al (2012), a análise integrada revelou esse gene como um modulador, estando envolvido em ganho genômico e diminuição de expressão. Analisando individualmente esses dados, foi verificada a presença de 22 casos com perda genômica e 29 casos com ganho no número de cópias para esse gene. A análise de expressão gênica global mostrou um perfil de diminuição da expressão para os casos analisados segundo os parâmetros utilizados. O ganho genômico observado em 29 casos pela metodologia de CGH array poderia explicar o aumento de expressão desse gene encontrado em 15/39 casos por RT-qPCR. Por outro lado, o perfil observado na análise de expressão gênica global entra em contradição com esses resultados, podendo novamente ser explicado pelas diferenças nas metodologias usadas e pelos parâmetros utilizados na análise de expressão gênica global. Esse resultado condiz com o observado para os miRNAs preditos para regular esse gene, pois o miR-197 e miR-143 apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente) no nível de expressão. Esse achado sugere que os miRNAs selecionados para validação podem ser reguladores do *BRCA1* em LU. Recentemente, Chang e Sharan (2012) descreveram que o mRNA do *BRCA1* possui uma cauda 3'UTR de 1,5kb que é um alvo predito de ligação de 20-100 miRNAs, e a repressão desse gene pela ação dos miRNAs pode ter o mesmo efeito de perda de função de uma mutação. Os autores revisaram uma série de miRNAs experimentalmente validados que regulam o *BRCA1* (incluindo miR-182, miR-146a, miR-146-5p, miR-15a, miR-16, miR-638 e miR-17); os miRNAs investigados no nosso estudo não estavam presentes nessa lista. Assim, outros miRNAs também parecem atuar na regulação do *BRCA1*.

No estudo prévio do grupo, foi identificada como principal correlação proteica a associação entre as proteínas BRCA1 e FANCA no desenvolvimento dos LU. No presente estudo foi verificada uma forte correlação entre os transcritos dos genes *BRCA1* e *FANCA* ($r=0,631$), reforçando a importância deles em LU. O gene *FANCA* também apresentou uma diminuição significativa ($P=0,017$) de expressão em pacientes que tiveram menarca tardia.

Além da mutação no gene *MED12* descrita recentemente como um dos fatores relacionados ao desenvolvimento dos leiomiomas uterinos, também já foi bem relatada a influência de hormônios ovarianos nesses tumores (Flake et al., 2003; Ishikawa et al., 2010). O estrógeno atua no desenvolvimento, crescimento e manutenção do miométrio pela via dos receptores de estrógeno (ER) como um regulador de transcrição (Jakimiuk et al., 2004). O papel da progesterona na etiologia LU ainda é controverso, sendo que alguns estudos sugerem que a progesterona pode inibir a formação e o crescimento dos LU, enquanto, outros mostraram que a progesterona estimula o crescimento tumoral. Porém já é bem estabelecido que este hormônio possui influência na etiologia desses tumores (Walker e Stewart, 2005; Kim e Sefton, 2011). Em um estudo prévio da equipe, o nível de expressão gênica dos genes *ESR1* e *PGR* foram avaliados no mesmo conjunto de amostras utilizado nesse estudo. A fim de verificar uma possível correlação entre esses genes e os miRNAs e genes avaliados nesses estudo, foi realizado um teste de correlação de Pearson. Porém não foi verificada nenhuma forte correlação entre esses transcritos, apenas uma correlação marginalmente significativa entre o *ESR1* e o miR-26b, miR-143 e *FANCA* ($R=0,267$; $R=0,222$; $R=0,276$, respectivamente). Para o nosso conhecimento, ainda não foi descrita nenhuma dessas associações em literatura. O gene *PGR* também apresentou correlação marginalmente significativa com o miR-93, miR-26b e *FANCA* ($R=0,267$; $R=0,249$; $R=0,249$, respectivamente), mas foi verificada uma correlação significativa com o miR-25 e *HMGA2* ($R=0,417$ e $R=0,374$, respectivamente).. Apesar do *PGR* não ter sido associado com esses miRNAs, Zhou et al. (2010) relataram que ele pode ser regulado por miRNAs e alguns potenciais alvos são o miR-378 e miR-768-3p. Utilizando softwares de predição, os autores também verificaram que o *ESR1* pode ser regulado por miRNAs, como o miR-100 e o miR-99a (Zhou et al., 2010).

Um achado importante envolvendo os miRNAs foi a alta correlação entre alguns deles. Os miR-106b, miR-25 e miR-93 apresentaram uma correlação entre si acima de 80%. Isso pode se dar devido ao fato deles estarem mapeados na mesma região genômica (7q22), a qual estava envolvida em perda, também detectada no estudo prévio utilizando aCGH nas mesmas amostras. Os miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-197 e miR-143, também apresentaram forte correlação entre si (acima de 80%), porém eles estão mapeados em regiões distintas do genoma (3p22.2; 2q35; 1p13.3; 5q32, respectivamente). Portanto, a alta correlação desses miRNAs em LU poderia ser explicado por outros mecanismos. Por exemplo, os miR-26a e miR-26b ($R=0,872$) são candidatos a regulação do *FANCA*, sendo assim, os dois miRNAs tiveram alteração no

seu padrão de expressão para contribuir para a perda da regulação deste gene. O mesmo mecanismo pode ser suposto para a alta correlação entre o miR-197 e miR-143 ($R=0,844$), pois apesar de eles não estarem mapeados na mesma região, são candidatos a regulação do gene *BRCA1*. É possível que haja algum mecanismo de sinergismo entre miRNAs reguladores de alvos importantes nestes tumores, independente de sua localização.

Em resumo, esse estudo confirmou o envolvimento de mutações no gene *MED12* em LU. Foi possível também verificar um aumento de expressão do *HMGA2* possivelmente relacionado com miRNAs preditos como reguladores desse gene. A diminuição de expressão dos miRNAs mapeados em 7q22 observada em 50% dos tumores não pode ser explicada exclusivamente por deleções nessa região já que foi observada em apenas 15% dos casos apresentavam deleção em 7q22 por aCGH. Estes dados sugerem que outros mecanismos devem atuar para promover a diminuição da expressão dos miRNAs mapeados nessa região. São necessários estudos adicionais a fim de elucidar o envolvimento dos genes *MED12* e *HMGA2* em LUs e a possível associação entre essas duas vias moleculares na etiologia dos leiomiomas uterinos.

Conclusões

- Mutações no gene *MED12* foram verificadas numa frequência de 40% dos casos avaliados, frequência um pouco menor à descrita em outras populações (50 a 70%).
- Os genes *FANCA* e *BRCA1* apresentaram um aumento de expressão nos LU comparado ao miométrio adjacente. Os miRNAs preditos de regular esses genes (miR-26a e miR-26b; miR-197 e miR-143, respectivamente) apresentaram uma diminuição no nível de expressão nos LU em comparação com o MA. No estudo prévio do grupo esses genes apresentaram forte correlação proteica, esse achado corrobora ao encontrado previamente, pois eles também apresentaram forte correlação nos níveis de expressão gênica.
- O gene *HMGA2* apresentou um aumento de expressão nos LU em comparação com o MA, assim como previamente descrito em literatura. Alguns casos apresentaram um aumento muito superior à média dos casos com expressão aumentada, sugerindo assim a presença de uma possível translocação envolvendo esse gene. O miRNA let-7a previamente descrito e validado como regulador desse gene apresentou expressão diminuída nos tumores, em concordância com a literatura.
- Os demais miRNAs candidatos a regulação do *HMGA2* (miR-106b, miR-93, miR-26a e miR-26b) também apresentaram uma diminuição de expressão nos LU em relação ao MA. O que indica que o gene *HMGA2* pode ser regulado por outros miRNAs além do let-7a.
- Foi possível confirmar a diminuição de expressão dos miR-106b, miR-25 e miR-93 mapeados em 7q22. Esta região que se mostrou envolvida em perdas genômicas em 15% dos casos no estudo prévio utilizando aCGH nas mesmas amostras.
- Os níveis de expressão do gene *BRCA1* não apresentaram associação com nenhuma variável clínica. Em adição, foi verificada uma expressão diminuída do gene *FANCA* em pacientes que se encontravam na fase secretória do ciclo menstrual. Os miR-106b, miR-25, miR-26b e miR-143 apresentaram apenas correlação marginalmente significativa com a fase do ciclo menstrual da paciente. E o miR-26a apresentou correlação marginalmente significativa com a idade da paciente.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acesso a Internet:

<http://www.datasus.gov.br/datasus/datasus.php> (10/12/20012).

Al-Hendy A, Lee EJ, Wang HQ, Copland JA. Gene therapy of uterine leiomyomas: adenovirus-mediated expression of dominant negative estrogen receptor inhibits tumor growth in nude mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(5):1621-31.

Al-Hendy A, Salama SA. Ethnic distribution of estrogen receptor-alpha polymorphism is associated with a higher prevalence of uterine leiomyomas in black Americans. *Fertil Steril*. 2006;86(3):686-93.

Anderson SE, Nonaka D, Chuai S, Olshen AB, Chi D, Sabbatini P, et al. p53, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in uterine leiomyosarcoma and leiomyomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(2):849-53.

Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ. Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene*. 1999;18(36):5076-87.

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

Borrmann L, Schwanbeck R, Heyduk T, Seebeck B, Rogalla P, Bullerdiek J, et al. High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(23):6841-51.

Borsari R, Bozzini N, Junqueira CR, Soares JM, Hilário SG, Baracat EC. Genic expression of the uterine leiomyoma in reproductive-aged women after treatment with goserelin. *Fertil Steril*. 2010;94(3):1072-7.

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

Brosens I, Deprest J, Dal Cin P, Van den Berghe H. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in uterine myomas. *Fertil Steril.* 1998;69(2):232-5.

Canevari RA, Pontes A, Rosa FE, Rainho CA, Rogatto SR. Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(4):1395-403.

Canevari ReA, Pontes A, Rogatto SR. Microallelotyping defines novel regions of loss of heterozygosity in uterine leiomyomas. *Mol Carcinog.* 2005;42(3):177-82.

Canevari RA e Rogatto SR. Uterine Leiomyoma: updates in cytogenetics and molecular analysis. *Recent Advances iResearch Updates* 2006; 7:187-206.

Cannell IG, Bushell M. Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? *Cell Cycle.* 2010;9(14):2726-30.

Carlson KJ, Miller BA, Fowler FJ. The Maine Women's Health Study: II. Outcomes of nonsurgical management of leiomyomas, abnormal bleeding, and chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol.* 1994;83(4):566-72.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2002;16(21):2733-42.

Catherino WH, Malik M. Uterine leiomyomas express a molecular pattern that lowers retinoic acid exposure. *Fertil Steril.* 2007;87(6):1388-98.

Chang S, Sharan SK. BRCA1 and microRNAs: emerging networks and potential therapeutic targets. *Mol Cells.* 2012;34(5):425-32.

Chen HW, Liu JC, Chen JJ, Lee YM, Hwang JL, Tzeng CR. Combined differential gene expression profile and pathway enrichment analyses to elucidate the molecular mechanisms of uterine leiomyoma after gonadotropin-releasing hormone treatment. *Fertil Steril*. 2008;90(4):1219-25.

Cho YL, Bae S, Koo MS, Kim KM, Chun HJ, Kim CK, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2005;99(3):545-51.

Chuang TD, Luo X, Panda H, Chegini N. miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8. *Mol Endocrinol*. 2012;26(6):1028-42.

Cirilo PDR, et al. Alterações no número de cópias de DNA por CGH array em Leiomiomas Uterinos. 2011 (in preparation).

Cirilo PD, Marchi FA, Barros Filho MeC, Rocha RM, Domingues MA, Jurisica I, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals potential targets associated with cell proliferation in uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2013;8(3):e57901.

Cleynen I, Van de Ven WJ. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol*. 2008;32(2):289-305.

Cook JD, Walker CL. The Eker rat: establishing a genetic paradigm linking renal cell carcinoma and uterine leiomyoma. *Curr Mol Med*. 2004;4(8):813-24.

Coronado GD, Marshall LM, Schwartz SM. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. *Obstet Gynecol*. 2000;95(5):764-9.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins. Pathologic basis of disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989.

Crabtree JS, Jelinsky SA, Harris HA, Choe SE, Cotreau MM, Kimberland ML, et al. Comparison of human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Res.* 2009;69(15):6171-8.

Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med.* 2010;16(6):257-67.

Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, Mansueto G, Salvatore G, Somma P, et al. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(2):123-8.

Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell.* 2010;140(5):652-65.

Eisinger SH, Bonfiglio T, Fiscella K, Meldrum S, Guzick DS. Twelve-month safety and efficacy of low-dose mifepristone for uterine myomas. *J Minim Invasive Gynecol.* 2005;12(3):227-33.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-69.

Fan SX, Sreekantaiah C, Berger CS, Medchill M, Pedron S, Sandberg AA. Cytogenetic findings in nine leiomyomas of the uterus. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990;47(2):179-89.

Farquhar CM, Steiner CA. Hysterectomy rates in the United States 1990-1997. *Obstet Gynecol.* 2002;99(2):229-34.

Febrasgo - Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, Manual de Orientação: Leiomioma Uterino – São Paulo, 117, 2004

Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect.* 2003;111(8):1037-54.

Franco MH, Brennan SO, Chua EK, Kragh-Hansen U, Callegari-Jacques SM, Bezerra MZ, et al. Albumin genetic variability in South America: Population distribution and molecular studies. *Am J Hum Biol.* 1999;11(3):359-66.

Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(12):899-910.

Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):775-89.

Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenski LA, Vasile E, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res.* 2010;70(11):4528-38.

Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature.* 2008;451(7177):414-6.

Hammond SM, Sharpless NE. HMGA2, microRNAs, and stem cell aging. *Cell.* 2008;135(6):1013-6.

Hart R, Khalaf Y, Yeong CT, Seed P, Taylor A, Braude P. A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum Reprod.* 2001;16(11):2411-7.

Hays LE, Meyer S, van de Vrugt HJ. A molecular, genetic, and diagnostic spotlight on fanconi anemia. *Anemia.* 2012;2012:650730.

Hodge JC, Kim TM, Dreyfuss JM, Somasundaram P, Christacos NC, Rousselle M, et al. Expression profiling of uterine leiomyomata cytogenetic subgroups reveals distinct signatures in matched myometrium: transcriptional profiling of the t(12;14) and evidence in support of predisposing genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 2012;21(10):2312-29.

Hodge JC, Park PJ, Dreyfuss JM, Assil-Kishawi I, Somasundaram P, Semere LG, et al. Identifying the molecular signature of the interstitial deletion 7q subgroup of uterine leiomyomata using a paired analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(10):865-85.

Hodge JC, Quade BJ, Rubin MA, Stewart EA, Dal Cin P, Morton CC. Molecular and cytogenetic characterization of plexiform leiomyomata provide further evidence for genetic heterogeneity underlying uterine fibroids. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1403-10.

Houston KD, Hunter DS, Hodges LC, Walker CL. Uterine leiomyomas: mechanisms of tumorigenesis. *Toxicol Pathol*. 2001;29(1):100-4.

Hunter DS, Klotzbücher M, Kugoh H, Cai SL, Mullen JP, Manfioletti G, et al. Aberrant expression of HMGA2 in uterine leiomyoma associated with loss of TSC2 tumor suppressor gene function. *Cancer Res*. 2002;62(13):3766-72.

Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(6):1126-33.

Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*. 2010;151(6):2433-42.

Islam MS, Protic O, Stortoni P, Grechi G, Lamanna P, Petraglia F, et al. Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2013.

Jacoby VL, Fujimoto VY, Giudice LC, Kuppermann M, Washington AE. Racial and ethnic disparities in benign gynecologic conditions and associated surgeries. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(6):514-21.

Je EM, Kim MR, Min KO, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of MED12 exon 2 in uterine leiomyoma and other common tumors. *Int J Cancer*. 2012;131(6):E1044-7.

Kawaguchi K, Fujii S, Konishi I, Okamura H, Mori T. Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. *Gynecol Oncol.* 1985;21(1):32-41.

Khalaf Y, Ross C, El-Toukhy T, Hart R, Seed P, Braude P. The effect of small intramural uterine fibroids on the cumulative outcome of assisted conception. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2640-4.

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

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

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

Klemke M, Meyer A, Nezhad MH, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, et al. Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48(2):171-8.

Kogan EA, Ignatova VE, Rukhadze TN, Kudrina EA, Ishchenko AI. [A role of growth factors in development of various histological types of uterine leiomyoma]. *Arkh Patol.* 2005;67(3):34-8.

Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res.* 2011;717(1-2):77-84.

Laughlin SK, Schroeder JC, Baird DD. New directions in the epidemiology of uterine fibroids. *Semin Reprod Med.* 2010;28(3):204-17.

Lee EJ, Kong G, Lee SH, Rho SB, Park CS, Kim BG, et al. Profiling of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15(1):146-54.

Leppert PC, Catherino WH, Segars JH. A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(2):415-20.

Levy B, Mukherjee T, Hirschhorn K. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;121(1):1-8.

Levy G, Hill MJ, Beall S, Zarek SM, Segars JH, Catherino WH. Leiomyoma: genetics, assisted reproduction, pregnancy and therapeutic advances. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(8):703-12.

Ligon AH, Morton CC. Genetics of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28(3):235-45.

Liu S, Patel SH, Ginestier C, Ibarra I, Martin-Trevino R, Bai S, et al. MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002751.

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

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

Mangioni S, Viganò P, Lattuada D, Abbiati A, Vignali M, Di Blasio AM. Overexpression of the Wnt5b gene in leiomyoma cells: implications for a role of the Wnt signaling pathway in the uterine benign tumor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5349-55.

Markowski DN, Bartnitzke S, Löning T, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J. MED12 mutations in uterine fibroids--their relationship to cytogenetic subgroups. *Int J Cancer*. 2012;131(7):1528-36.

McGuire MM, Yatsenko A, Hoffner L, Jones M, Surti U, Rajkovic A. Whole exome sequencing in a random sample of North American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2012;7(3):e33251.

Meloni AM, Surti U, Contento AM, Davare J, Sandberg AA. Uterine leiomyomas: cytogenetic and histologic profile. *Obstet Gynecol*. 1992;80(2):209-17.

Meola N, Gennarino VA, Banfi S. microRNAs and genetic diseases. *Pathogenetics*. 2009;2(1):7.

Mesquita FS, Dyer SN, Heinrich DA, Bulun SE, Marsh EE, Nowak RA. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biol Reprod*. 2010;82(2):341-51.

Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):563-8.

Nana-Sinkam SP, Croce CM. Non-coding RNAs in cancer initiation and progression and as novel biomarkers. *Mol Oncol*. 2011;5(6):483-91.

Nilbert M, Heim S, Mandahl N, Flodérus UM, Willén H, Mitelman F. Characteristic chromosome abnormalities, including rearrangements of 6p, del(7q), +12, and t(12;14), in 44 uterine leiomyomas. *Hum Genet*. 1990;85(6):605-11.

Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*. 2008;135(2):227-39.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;122(2):262-3.

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

Packenham JP, du Manoir S, Schrock E, Risinger JI, Dixon D, Denz DN, et al. Analysis of genetic alterations in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas by comparative genomic hybridization. *Mol Carcinog*. 1997;19(4):273-9.

Pan Q, Luo X, Chegini N. Differential expression of microRNAs in myometrium and leiomyomas and regulation by ovarian steroids. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):227-40.

Pan Q, Luo X, Chegini N. microRNA 21: response to hormonal therapies and regulatory function in leiomyoma, transformed leiomyoma and leiomyosarcoma cells. *Mol Hum Reprod*. 2010 Mar;16(3):215-27.

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

Parker WH, Fu YS, Berek JS. Uterine sarcoma in patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma. *Obstet Gynecol*. 1994;83(3):414-8.

Peddada SD, Laughlin SK, Miner K, Guyon JP, Haneke K, Vahdat HL, et al. Growth of uterine leiomyomata among premenopausal black and white women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19887-92.

Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, et al. Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol Cancer Res*. 2008;6(4):663-73.

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.

Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005;11(12):1753-61.

Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(1 Pt 1):14-8.

Rosa FE, Canevari ReA, Ambrosio EP, Ramos Cirilo PD, Pontes A, Rainho CA, et al. Polymorphisms of CYP17A1, CYP19, and androgen in Brazilian women with uterine leiomyomas. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(6):814-23.

Ross RK, Pike MC, Vessey MP, Bull D, Yeates D, Casagrande JT. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;293(6543):359-62.

Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc*. 2002;74(2):223-63.

Salzano FM, Franco MH, Weimer TA, Callegari-Jacques SM, Mestriner MA, Hutz MH, et al. The Brazilian Xavante Indians revisited: new protein genetic studies. *Am J Phys Anthropol*. 1997;104(1):23-34.

Sans M. Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Hum Biol*. 2000;72(1):155-77.

Sarlomo-Rikala M, El-Rifai W, Lahtinen T, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Hum Pathol*. 1998;29(5):476-81.

Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008;299(4):425-36.

Schoenmakers EF, Bunt J, Hermers L, Schepens M, Merks G, Janssen B, et al. Identification of CUX1 as the recurrent chromosomal band 7q22 target gene in human uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(1):11-23.

Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. Clin Obstet Gynecol. 2001;44(2):316-26.

Solyom S, Winqvist R, Nikkilä J, Rapakko K, Hirvikoski P, Kokkonen H, et al. Screening for large genomic rearrangements in the FANCA gene reveals extensive deletion in a Finnish breast cancer family. Cancer Lett. 2011;302(2):113-8.

Somigliana E, De Benedictis S, Vercellini P, Nicolosi AE, Benaglia L, Scarduelli C, et al. Fibroids not encroaching the endometrial cavity and IVF success rate: a prospective study. Hum Reprod. 2011;26(4):834-9.

Sória HLZ, Fagundes DJ, Sória-Vieira S, Cavalli N, Santos CRCd. Histerectomia e as doenças ginecológicas benignas: o que está sendo praticado na Residência Médica no Brasil? Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2007;29:67-73.

Sozen I, Arici A. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. Fertil Steril. 2002;78(1):1-12.

Stewart EA, Friedman AJ, Peck K, Nowak RA. Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79(3):900-6.

Stewart EA, Morton CC. The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know. Obstet Gynecol. 2006;107(4):917-21.

Stovall DW, Parrish SB, Van Voorhis BJ, Hahn SJ, Sparks AE, Syrop CH. Uterine leiomyomas reduce the efficacy of assisted reproduction cycles: results of a matched follow-up study. Hum Reprod. 1998;13(1):192-7.

Strissel PL, Swiatek J, Oppelt P, Renner SP, Beckmann MW, Strick R. Transcriptional analysis of steroid hormone receptors in smooth muscle uterine leiomyoma tumors of postmenopausal patients. J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;107(1-2):42-7.

Swartz CD, Afshari CA, Yu L, Hall KE, Dixon D. Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(6):441-50.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

Vanharanta S, Wortham NC, Langford C, El-Bahrawy M, van der Spuy Z, Sjöberg J, et al. Definition of a minimal region of deletion of chromosome 7 in uterine leiomyomas by tiling-path microarray CGH and mutation analysis of known genes in this region. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(5):451-8.

Viswanathan M, Hartmann K, McKoy N, Stuart G, Rankins N, Thieda P, et al. Management of uterine fibroids: an update of the evidence. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2007(154):1-122.

Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod*. 1997;12(4):815-22.

Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science*. 2005;308(5728):1589-92.

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):336-47.

Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008;14(11):2348-60.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-98.

Zavadil J, Ye H, Liu Z, Wu J, Lee P, Hernando E, et al. Profiling and functional analyses of microRNAs and their target gene products in human uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2010;5(8):e12362.

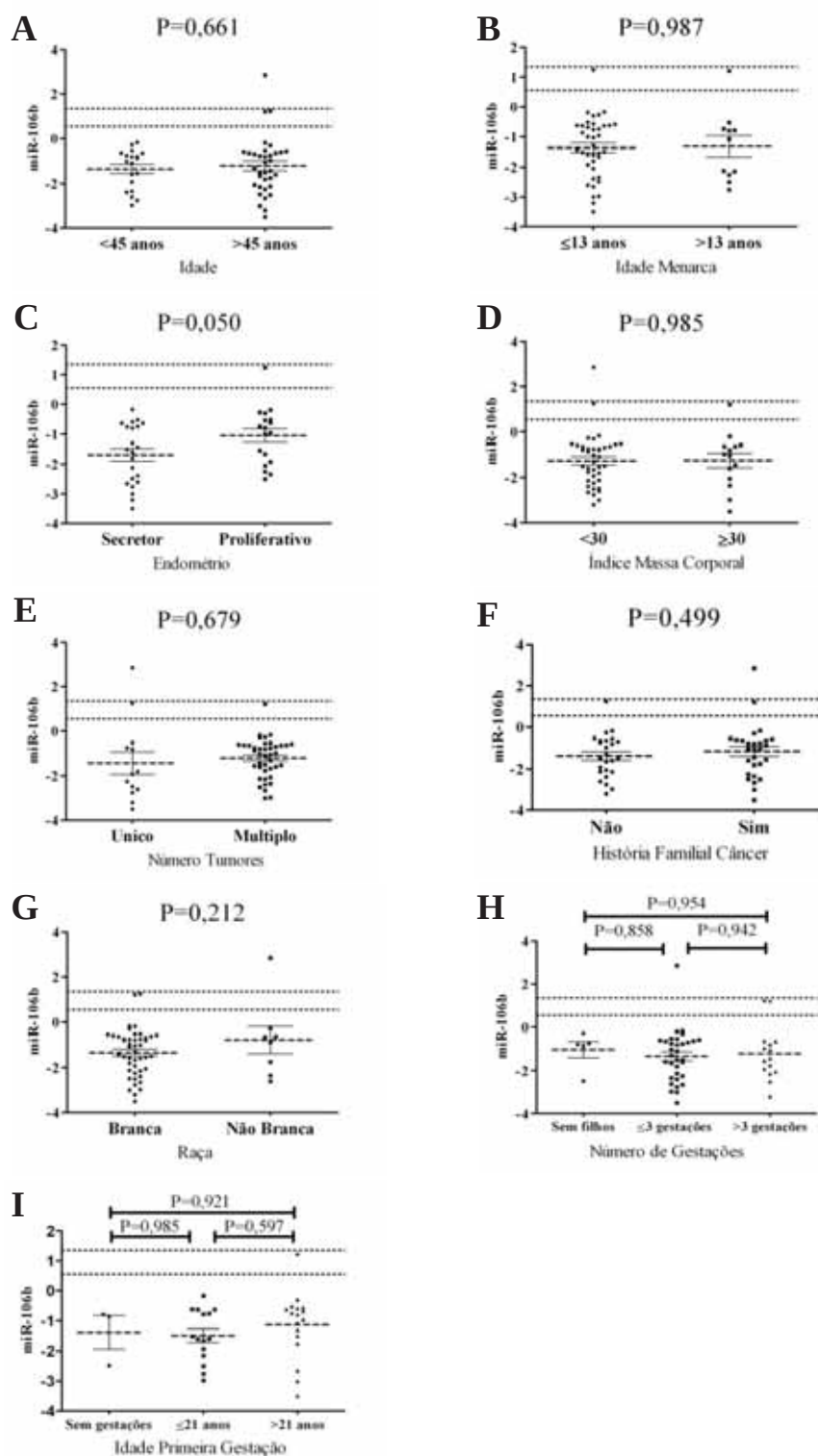
Anexos

Suplemento 1. Estudos prévios de expressão gênica em larga escala em Leiomiomas Uterinos.

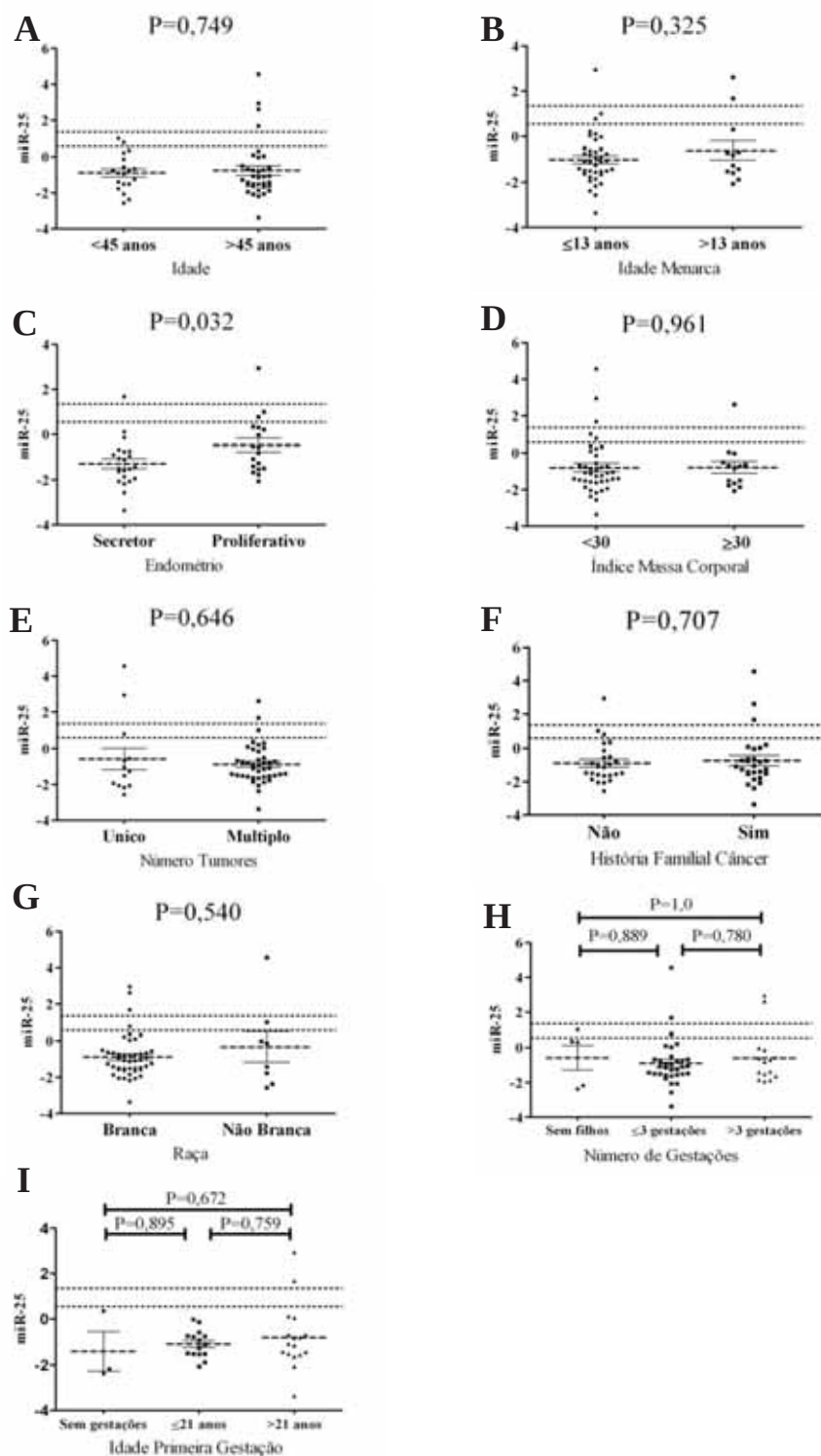
Caso	Amostras	Idade	Número de tumores	Endométrio	Raça	Idade Menarca	IMC	Idade 1a gestação	Gestações	História familiar ca	História pessoal ca
1	046T_A 046T_B	60	M	outros	B	18	42,2	ND	9	irmã gêmea LU e 2 irmãs ca endométrio	ca pele
2	084T	48	M	outros	B	13	28,3	23	3	tio materno ca hepático/tia paterna ca endometrial/irmã ca mama/ irmã LU	nega
3	085T	37	M	proliferativo	B	12	27,5	26	2	nega	nevus intradérmico/fibroma mole
4	091T	48	M	proliferativo	B	14	29,9	ND	0	nega	nega
5	092T	47	U	proliferativo	B	10	23,2	23	4	nega	nega
6	147T_A 147T_B 147T_C	41	M	proliferativo	B	13	26,0	ND	3	ca mama (irmã)	nega
7	300T_A 300T_B	36	M	secretor	B	13	26,2	ND	3	nega	nega
8	301T_A 301T_B 301T_C	49	M	proliferativo	NB	11	36,1	15	7	pai ca próstata	nega
9	303T	47	M	secretor	B	13	29,3	23	1	pai ca?	nega
10	304T	44	M	proliferativo	B	13	26,6	ND	10	avó ca intestino	nega
11	307T_A 307T_B	48	M	proliferativo	B	12	34,9	26	4	nega	nega
12	317T_A 317T_B	38	M	secretor	NB	12	24,8	20	5	nega	nega

317T_C											
13	614T	44	U	proliferativo	B	12	29,9	17	10	nega	nega
14	615T	43	M	proliferativo	B	ND	22,9	0	0	nega	nega
15	625T	47	M	secretor	B	12	24,5	24	3	tia ca mama/tia ca estômago	nega
16	629T_A 629T_B	49	M	secretor	B	15	21,2	26	3	irmã LU	nega
17	630T_A 630T_B	47	M	proliferativo	B	13	26,3	18	2	nega	nega
18	631T_A 631T_B 631T_C	43	M	proliferativo	NB	9	24,1	ND	0	nega	nega
19	633T	46	U	outros	NB	ND	26,2	ND	3	mãe LU	nega
20	634T	44	U	secretor	B	15	23,6	23	3	ND	ND
21	642T_A 642T_B	46	M	secretor	B	9	29,9	21	1	mãe ca útero	nega
22	643T_A 643T_B 643T_C	39	M	outros	B	14	25,4	31	1	irmão leucemia	nega
23	644T	39	U	proliferativo	B	12	24,3	ND	2	nega	nega
24	670T	38	U	secretor	B	15	26,6	18	3	nega	nega
25	681T	46	M	proliferativo	B	15	21,5	21	4	tia materna ca útero	pólipo endometrial
26	683T_A 683T_B	49	M	secretor	B	13	28,7	23	3	irmã LU	nega
27	684T	49	U	secretor	B	13	25,6	ND	6	nega	nega
28	708T	45	U	secretor	B	13	33,9	22	3	tia paterna ca mama	nega
29	711T	43	M	outros	B	12	30,0	18	2	nega	exérese cisto no pescoço
30	719T	50	U	secretor	B	13	24,2	0	0	pai óbito ca metastático?	nega
31	722T_A 722T_B 722T_C	50	M	secretor	B	11	34,9	ND	4	mãe ca rim	nega
32	728T	50	M	outros	B	16	27,3	18	6	nega	nega
33	729T_A	46	M	secretor	B	12	24,3	25	1	nega	nega

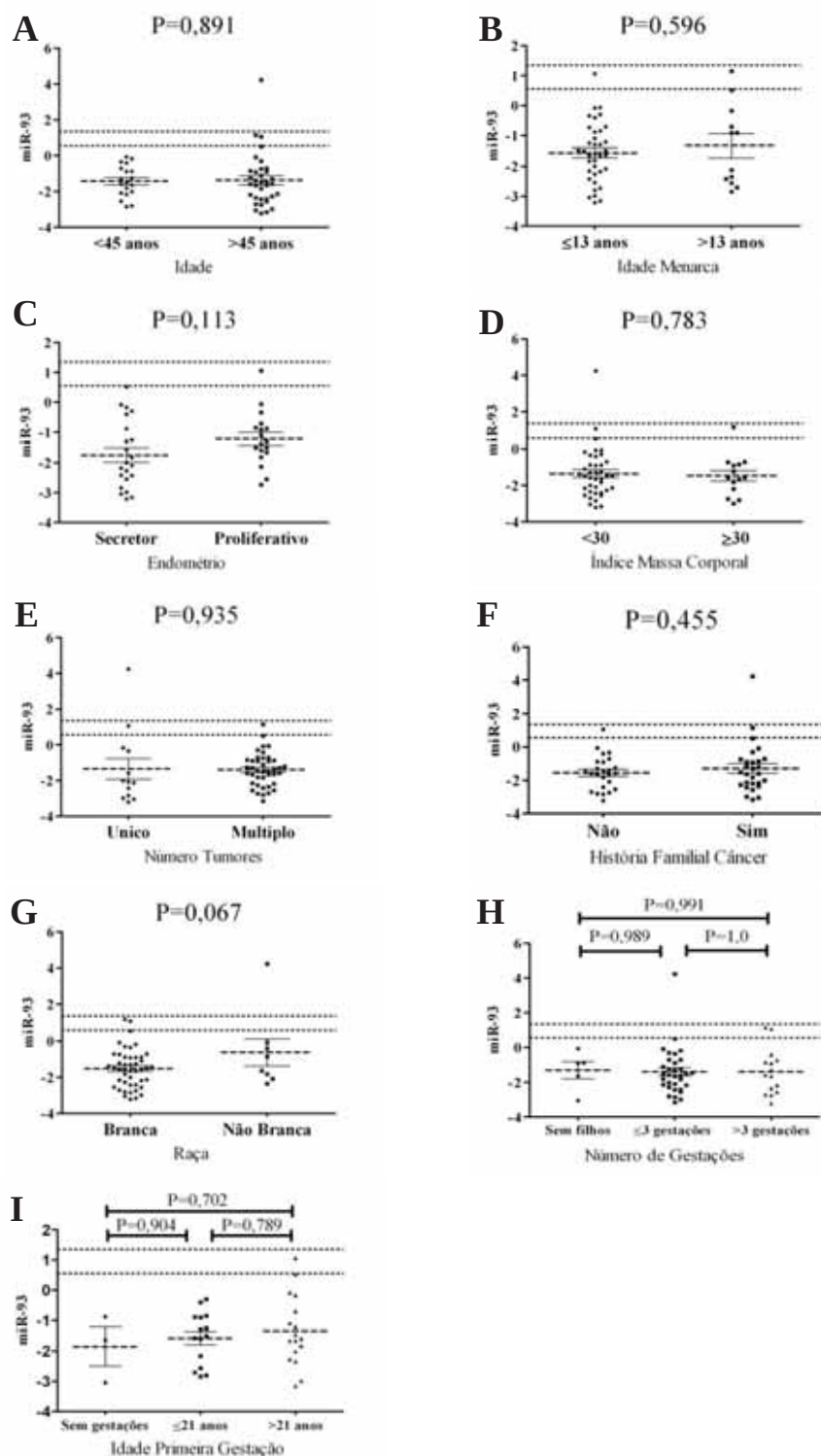
729T_B 729T_C											
34	733T_A 733T_B	48	M	outros	B	11	25,8	25	2	nega	nega
35	759T	51	M	secretor	B	15	21,2	ND	3	nega	nega
36	761T	45	U	secretor	B	13	18,7	ND	3	ca intestino (mãe)	nega
37	769T	47	U	proliferativo	B	14	23,1	ND	2	tio ca?	nega
38	790T	52	M	outros	B	12	32,0	26	3	irmã ca mama	nega
39	842T	37	M	outros	B	11	29,5	20	1	mãe e irmã LU/avó, avô e tio ca?	nega
40	844T_A 844T_B	50	M	proliferativo	B	12	36,8	ND	4	nega	LU
41	845T_A 845T_B	54	M	outros	NB	14	22,4	28	6	pai ca intestino	nega
42	853T	35	M	secretor	B	11	26,8	21	2	nega	nega
43	854T	47	M	outros	B	12	34,4	33	1	pai ca próstata	nega
44	855T	37	U	secretor	B	13	24,9	23	2	tio ca estômago	nega
45	857T	41	M	secretor	B	13	23,7	20	3	3 irmãs LU	nega
46	867T	46	M	outros	B	14	33,5	17	4	irmã ca intestino/sobrinha ca ósseo	nega
47	901T	51	M	proliferativo	B	9	34,1	ND	3	nega	nega
48	942T	48	M	outros	B	13	27,5	25	3	nega	nega
49	947T	47	M	proliferativo	B	ND	27,6	ND	ND	nega	nega
50	948T	46	M	proliferativo	B	13	26,6	29	2	tia paterna ca mama	nega
51	954T	45	M	secretor	B	12	33,7	18	3	nega	nega
52	1001T	46	M	outros	B	12	32,9	ND	10	avô ca boca	nega
53	1002T	46	M	secretor	B	13	27,5	18	2	nega	nega
54	1003T	36	M	outros	NB	13	21,6	0	0	avó materna ca estômago	nega
55	1005T	40	M	proliferativo	NB	12	34,2	ND	2	mãe ca cólon	nega
56	1015T	43	U	secretor	NB	13	24,2	ND	2	nega	nega



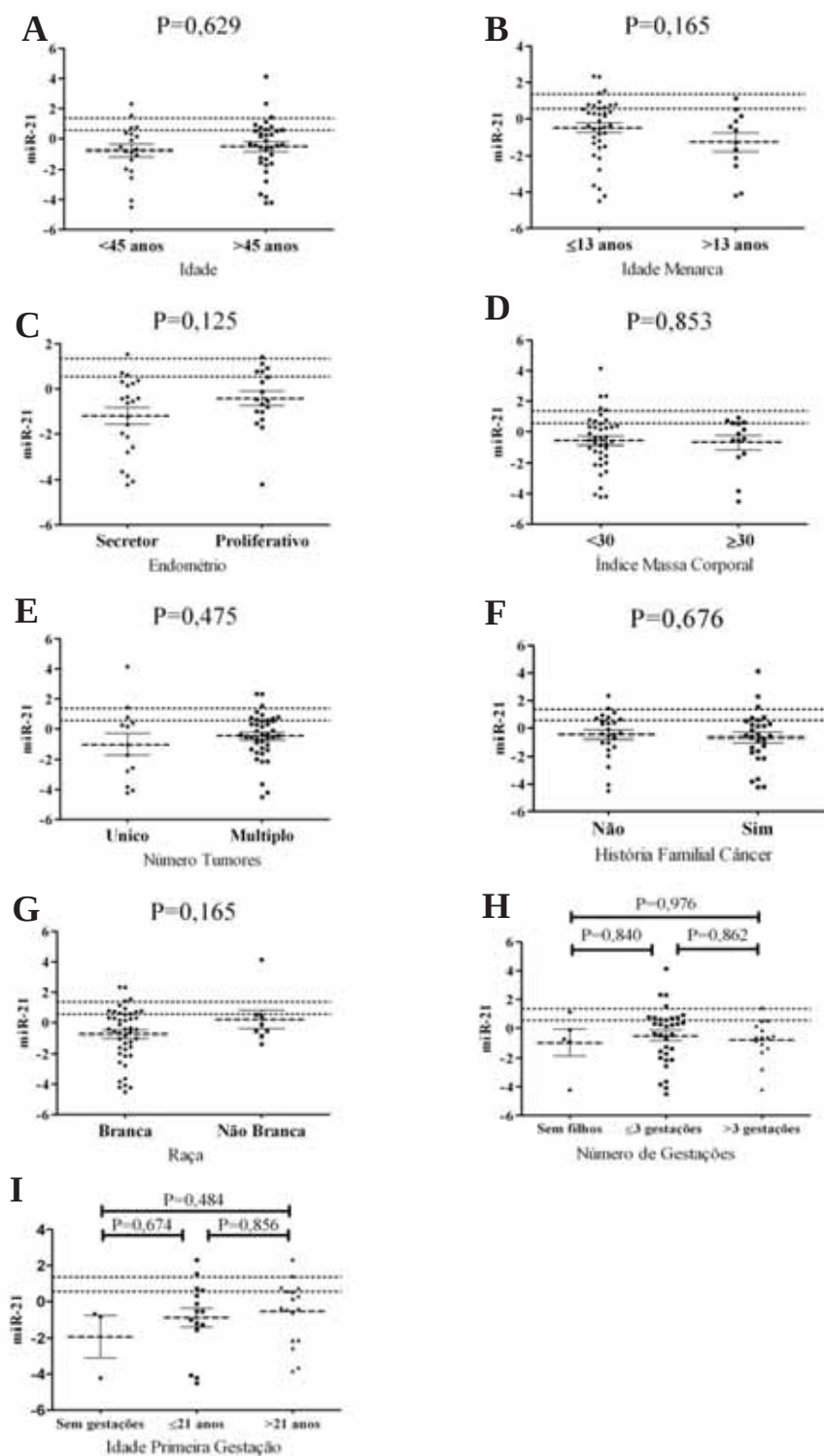
Suplemento 2 - Níveis dos transcritos de mir-106b segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo menstrual; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana da expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



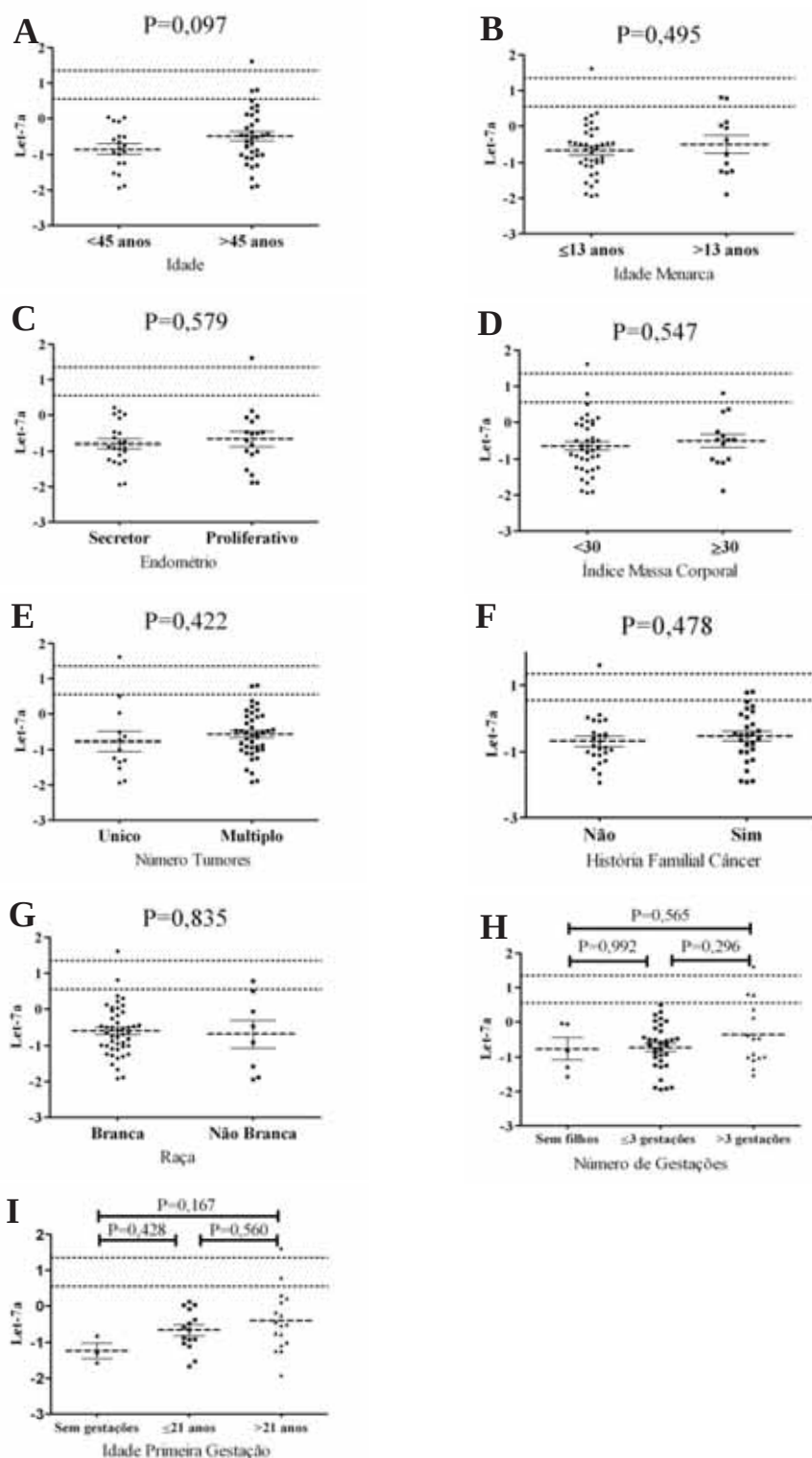
Suplemento 3 - Níveis dos transcritos de miR-25 segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo menstrual; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Esta apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



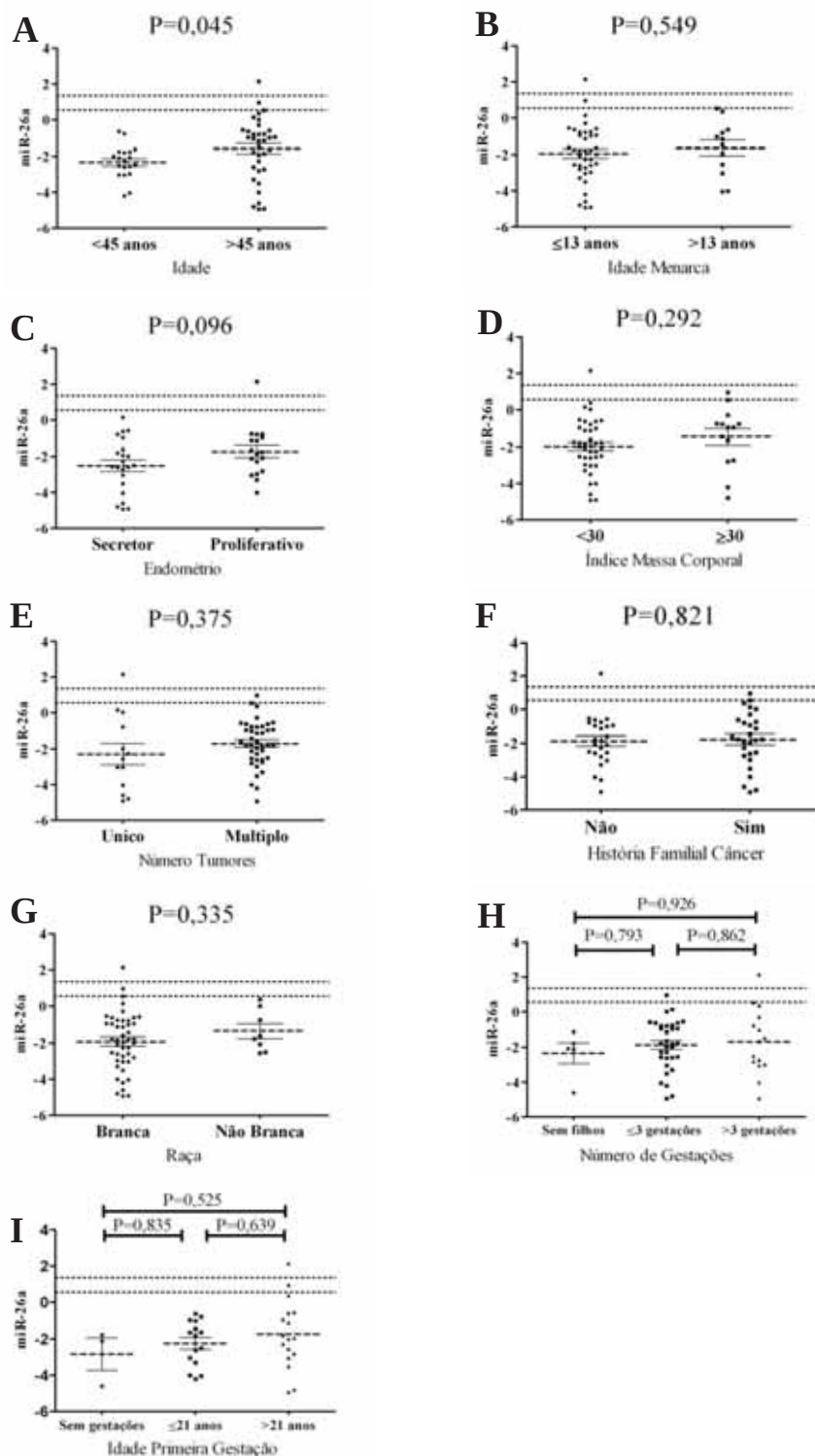
Suplemento 4 - Níveis dos transcritos de miR-93 segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo menstrual; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Esta apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



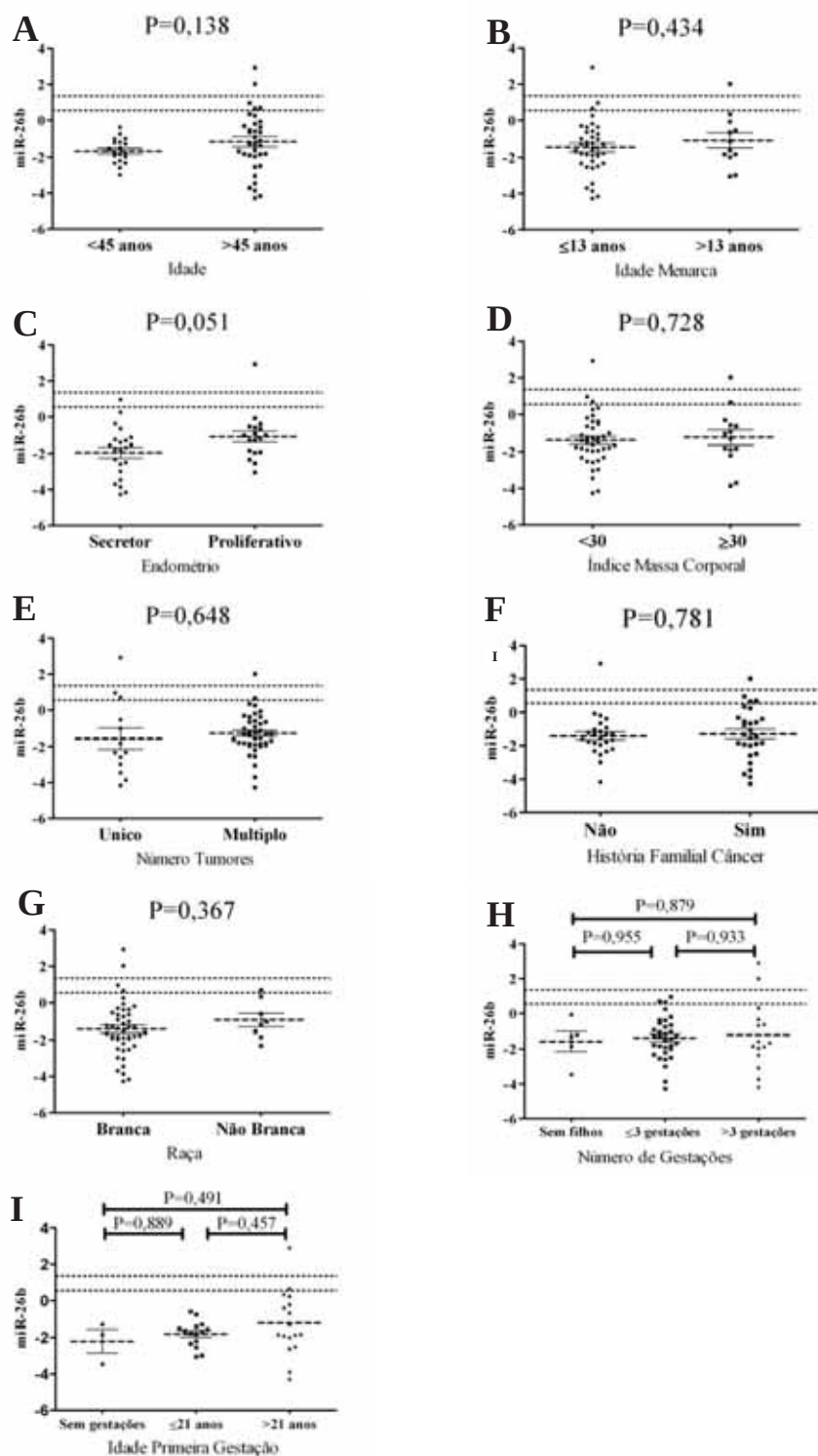
Suplemento 5 - Níveis dos transcritos de miR-21 segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



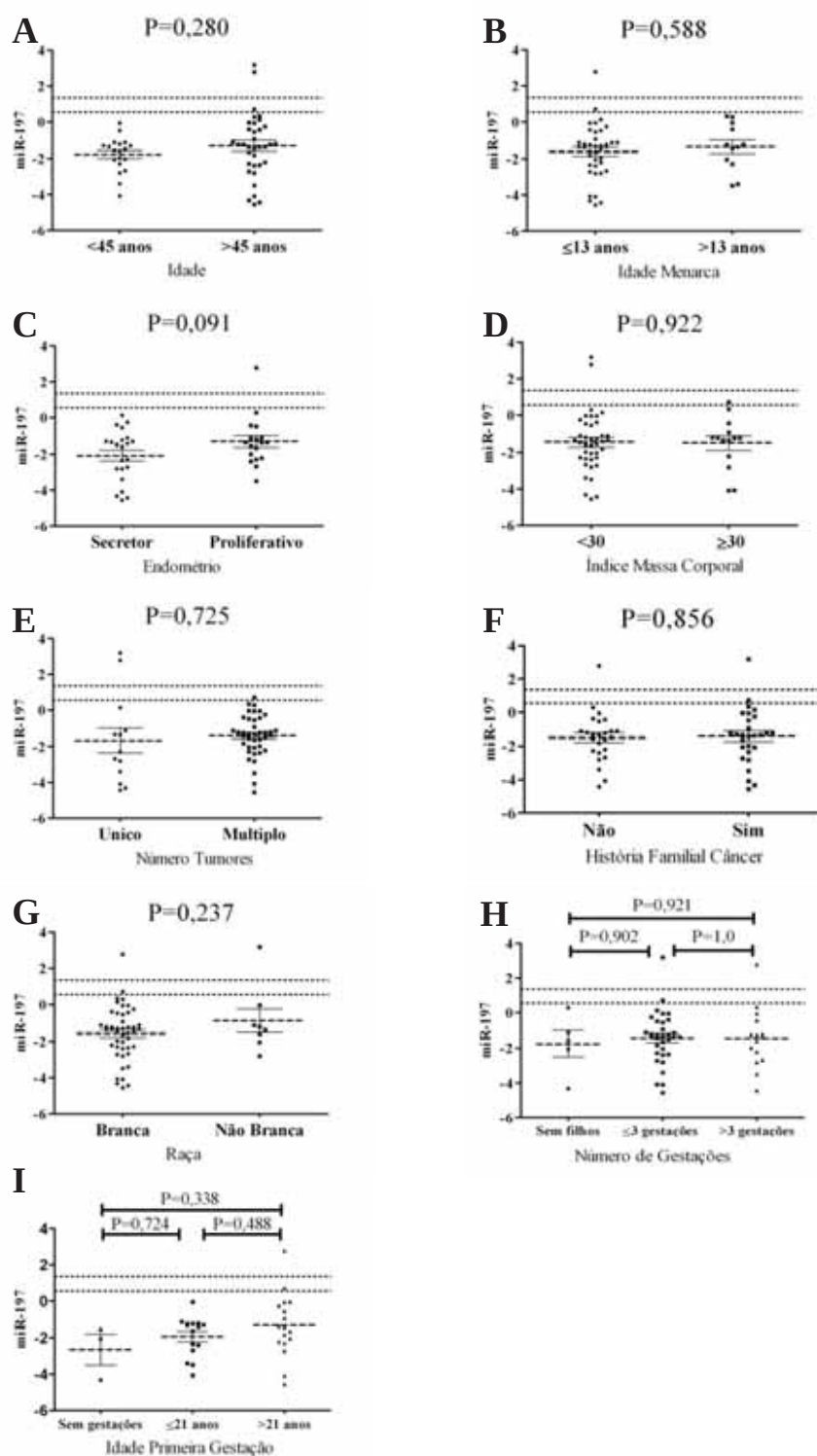
Suplemento 6 - Níveis dos transcritos de let-7a segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica



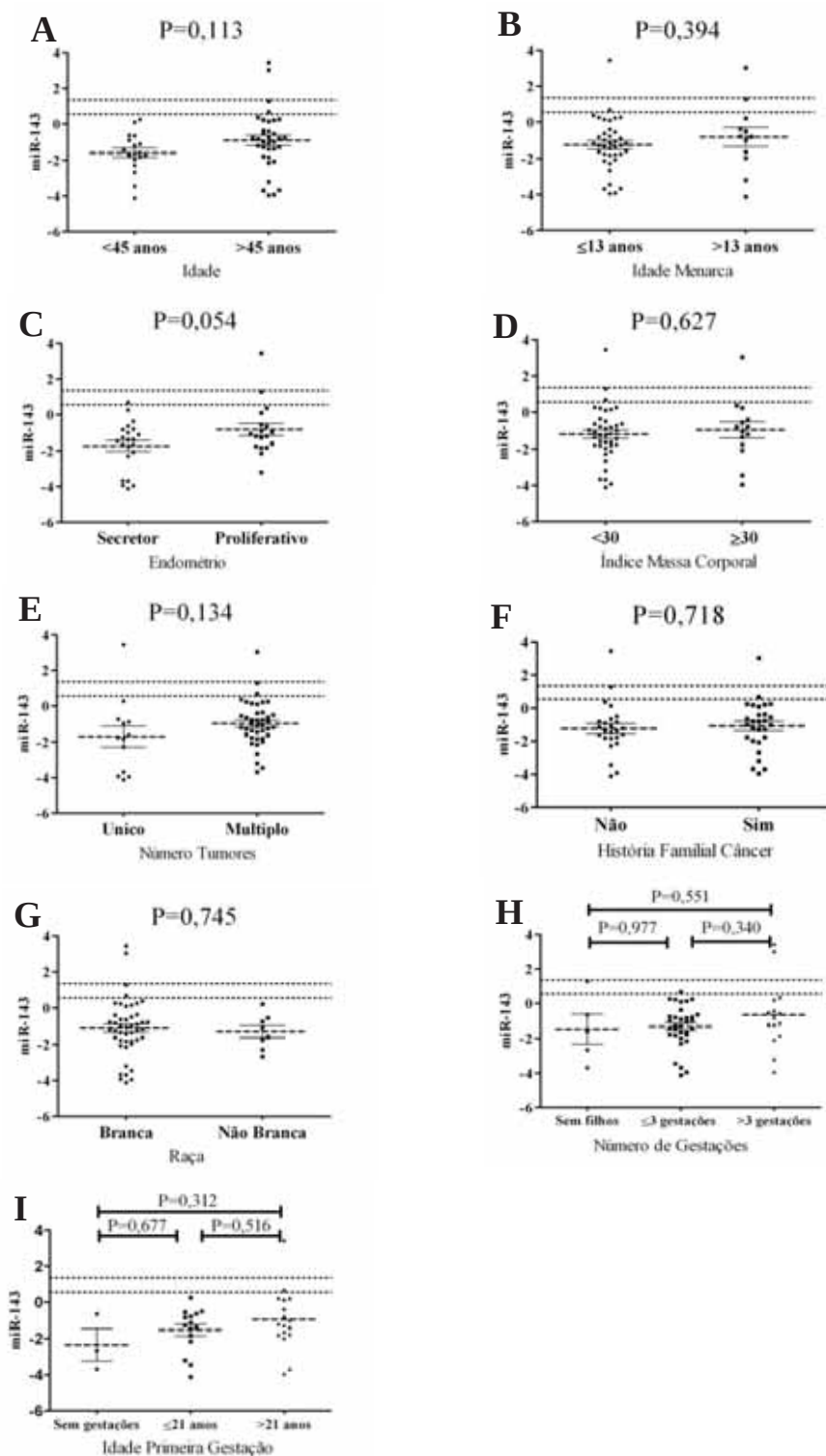
Suplemento 7 - Níveis dos transcritos de miR-26a segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



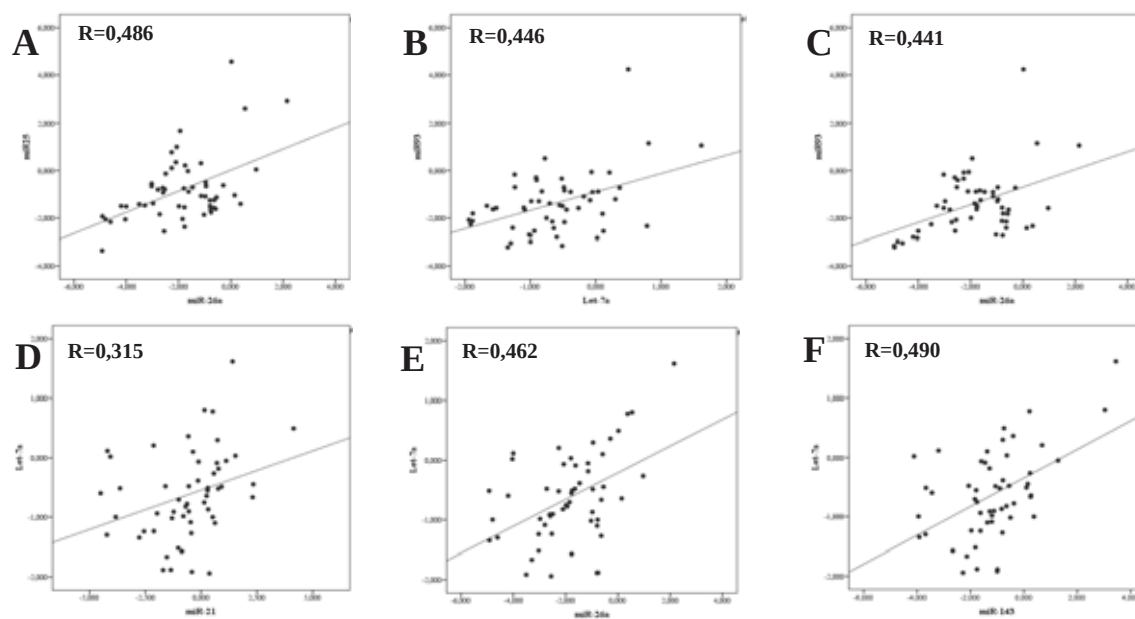
Suplemento 8 - Níveis dos transcritos de miR-26b segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



Suplemento 9 - Níveis dos transcritos de miR-197 segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



Suplemento 10 - Níveis dos transcritos de miR-143 segundo: **A.** Idade; **B.** Idade da menarca; **C.** Fase do ciclo; **D.** IMC; **E.** Número de tumores; **F.** História familiar de câncer; **G.** Raça; e **H.** Número de gestações. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado ANOVA (pós-teste de Tukey). Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.



Suplemento 11 – Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs: **A.** miR-25 e miR-26a; **B.** miR-93 e let-7a; **C.** miR-93 e miR-26a; **D.** let-7a e miR-21; **E.** let-7a e miR-26a; **F.** let-7a e miR-143. Os valores de R foram obtidos pelo teste de Pearson. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.