**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**“Perfil de expressão tecidual e plasmática dos
microRNAs miR-130a, miR-181c e miR-181d em
meningiomas grau I, II e III”**

VINICIUS MARQUES CARNEIRO

**Ribeirão Preto
2015**

VINICIUS MARQUES CARNEIRO

**“Perfil de expressão tecidual e plasmática dos
microRNAs miR-130a, miR-181c e miR-181d em
meningiomas grau I, II e III”.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, área de concentração Clínica
Cirúrgica - opção: Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.

RIBEIRÃO PRETO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Vinicius Marques

Perfil de expressão tecidual e plasmática dos microRNAs miR-130a, miR-181c e miR-181d em meningiomas grau I, II e III.

51 p. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior.

1.Meningioma. 2. microRNAs 3. Progressão tumoral. 4. Biomarcadores

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Marques Carneiro

Perfil de expressão tecidual e plasmática dos microRNAs
miR-130a, miR-181c e miR-181d em meningiomas grau I,
II e III.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção:
Cirurgia.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

CARNEIRO, VM. Perfil de expressão tecidual e plasmática dos microRNAs miR-130a, miR-181c e miR-181d em meningiomas grau I, II e III. 2015. 51f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introdução: Os meningiomas são neoplasias intracranianas de crescimento lento que se originam das células meningoteliais da aracnoide e representam os tumores intracranianos mais comuns, contabilizando 13-26% deste total, sendo um dos primeiros tumores sólidos a terem alterações genéticas identificadas. Inúmeros tem sido os avanços para a melhor compreensão das vias moleculares correlacionadas com a tumorigênese e progressão tumoral dos meningiomas, neste contexto tem se destacado o papel dos microRNAs que são RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, cuja função é o silenciamento do RNAm em nível pós-transcricional. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a expressão tecidual e plasmática dos miRNAs miR-181d, miR-181c e miR-130a.

Pacientes e métodos: Os miRNAs miR-181d, miR-181c e miR-130a foram selecionados a partir de estudo prévio do nosso grupo pela técnica de análise em larga escala de microarrays, onde foram comparados meningiomas grau I com amostras controles de aracnóides. Neste trabalho foi avaliada expressão destes miRNAs no tecido tumoral e plasma de meningiomas grau I, II e III.

Resultados: O miR-181d apresentou-se hiperexpresso nos grupos estudados, no tecido tumoral quanto no plasma. O nível de expressão foi maior de acordo com a progressão do grau do tumor. Os miR-181c e miR-130a não apresentaram diferença estatística nos grupos estudados em ambos tecido tumoral e plasma.

Conclusões: O miR-181d tem potencial para ser utilizado como biomarcador para meningiomas e está associado com sua progressão tumoral.

Palavras-chave: Meningiomas, microRNAs, Progressão tumoral, Biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: Meningiomas are intracranial tumors of slow growth that originate from meningotheelial arachnoid cells and represents the most common intracranial tumors, accounting for 13-26% of this total, being one of the first solid tumors to have identified genetic alterations. There are technological advances available to a better understanding of the molecular pathways correlated with tumorigenesis and tumor progression of meningiomas. The role of microRNAs in this process is very important. MicroRNAs are non-coding RNAs (ncRNAs) consisting of 19 to 25 nucleotides, with function of mRNA silencing post-transcriptional level. The aim of our study was to evaluate the tissue expression and plasma of miRNAs miR-181d, miR-181c and miR-130a.

Patients and methods: The miRNAs miR-181d, miR-181c and miR-130a were selected from a previous study of our group by analysis technique on large scale called microarrays, which were compared meningiomas grade I with arachnoid controls samples. In this study, we evaluated expression of these miRNAs in tumor tissue and plasma meningiomas grade I, II and III.

Results: The miR-181d was presented upregulated in the all groups in both tumor tissue and in plasma. The level of expression was increased according to the progression of tumor grade. The miR-181c and miR-130a showed no statistical difference in the groups studied in both tumor tissue and plasma.

Conclusions: The miR-181d has potential as a biomarker for meningiomas and is associated with tumor progression.

Keywords: Meningiomas, microRNAs, microRNAs, tumor progression, biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo molecular associado à tumorigênese e à progressão maligna nos meningiomas.....	22
Figura 2.	Biogênese dos microRNAs.....	24
Figura 3.	Análise de mircoarrays.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA miR-181d no tecido tumoral entre os grupos meningiomas grau I, meningiomas grau II e meningiomas grau III.....	36
Gráfico 2	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA miR-181d no plasma entre os grupos meningiomas grau I, meningiomas grau II e meningiomas grau III.....	37
Gráfico 3	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA miR-181c no tecido tumoral entre os grupos meningiomas grau I, meningiomas grau II e meningiomas grau III.....	38
Gráfico 4	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA miR-181c no plasma entre os grupos meningiomas grau I, meningiomas grau II e meningiomas grau III.....	39
Gráfico 5	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA miR-130a no tecido tumoral entre os grupos meningiomas grau I, meningiomas grau II e meningiomas grau III.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação proposta pela OMS para os meningiomas com baixo grau de agressividade e recorrência.....	16
Tabela 2.	Classificação proposta pela OMS para os meningioma atípico e anaplásico (maligno).....	18
Tabela 3.	Classificação proposta pela OMS para os meningiomas com alto grau de agressividade e recorrência.....	19

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
2.	Revisão da Literatura.....	13
	2.1. Epidemiologia dos meningiomas.....	13
	2.2. Biologia Molecular dos meningiomas.....	16
	2.3. microRNAs.....	19
3	Objetivos.....	23
4	Pacientes e Métodos.....	24
5	Resultados	30
6	Discussão	38
7	Conclusões	43
8	Referências.....	44

1. INTRODUÇÃO

“Meningioma é, muitas vezes, a essência da neurocirurgia. O progresso no tratamento dos meningiomas representa um avanço na neurocirurgia, visto que estes avanços são utilizados ao máximo para melhorar o tratamento dos meningiomas” (Al-Mefty O, 1991) . Nos últimos 20 anos houve enorme progressão, tanto no tratamento quanto na melhor compreensão biológica dos meningiomas. Estes tumores, quando benignos, são suscetíveis para a cura cirúrgica e esta deve ser sempre almejada, pois não há tratamentos alternativos eficientes (Couldwell WT et al., 2007). O surgimento de técnicas microcirúrgicas e melhor compreensão anatômica destes tumores, proporcionou redução da morbidade e mortalidade, além de uma maior sobrevida. Porém, em alguns casos, seja por sua localização em áreas eloqüentes ou proximidade de estruturas anatômicas na base do crânio, não se consegue a remoção cirúrgica completa. Assim, o entendimento mais preciso das vias biológicas e sua história natural, permitirá que no futuro tenhamos alternativas terapêuticas para alcançar a cura dos meningiomas (He et al., 2013).

A classificação da *World Health Organization* (WHO) para meningiomas os divide em benignos (grau I), atípicos (grau II) e anaplásicos (grau III), é amplamente utilizada e estabelece apenas parâmetros histopatológicos para a sua estratificação. Com o advento de novas tecnologias, alterações biomoleculares foram descritas. A deleção do braço longo (q) do cromossomo 22 é a mais freqüente, presente em até 70% dos meningiomas esporádicos e correlacionada com a iniciação tumoral (Mathias et al, 2007). A deleção do

braço curto (p) do cromossomo 1 é a segunda mais comum. A presença em 70% dos tumores atípicos e quase 100% dos anaplásicos indica uma correlação com a progressão tumoral (Ragel et al., 2005). Recentemente foi descoberta uma nova classe de RNAs, não codificadores de proteínas, os microRNAs. Agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Estudos enfatizam a importância destas moléculas ao relatarem alterações na expressão de microRNAs em diferentes patologias humanas. São estáveis no plasma e seu perfil de expressão altera-se sobre diferentes condições fisiológicas e patológicas, podendo ser utilizados como potenciais biomarcadores (Wang et al., 2014). Assim, pela técnica de microarrays pode-se analisar o perfil de expressão global de microRNAs em meningiomas. Após esta análise, foram selecionados os miR-130a, miR-181c e miR181d como candidatos moleculares diferencialmente expressos. Portanto, o objetivo deste estudo foi validar a expressão dos miR-130a, miR-181c e miR181, assim como analisar o seu possível papel como biomarcadores e a sua correlação com a progressão tumoral dos meningiomas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Não há nenhum relato de tumores que possam ser reconhecidos como meningiomas até o século 17, quando na autopsia de um paciente com demência progressiva, foi identificada uma massa arredondada, firme e extra-axial, adjacente à folce e que não infiltrava o cérebro (Netsky MG, 1956). Um dos primeiros relatos cirúrgicos foi do cirurgião Frances Antoine Louis em 1774, que removeu um meningioma parietal (Louis A, 1774). Uma melhor correlação entre história clínica, sintomas, exame físico e dados de autopsia, permitiu o melhor entendimento dos meningiomas; tendo a obra de Jean Cruveilhier (*Anatomie pathologique du corps humain* – publicado 1829-1842) como um marco, contendo ilustrações detalhadas de meningiomas, suas típicas localizações e correlação entre sintomas e exame físico. Francesco Durante, professor de cirurgia em Roma, em 1885 procedeu uma remoção cirúrgica de um meningioma de goteira olfatória, cujo resultado cirúrgico e seu excelente resultado neurológico foi publicado na revista Lancet e posterior apresentação no Congresso Internacional Médico de Washington de 1887 (Durante F, 1887).

Harvey Cushing ao longo de sua carreira apresentou inúmeras contribuições para o melhor tratamento dos meningiomas, desde relatos clínicos até técnicas cirúrgicas apuradas. Primeiramente, estabeleceu conceitos sobre uma adequada hemostasia. Foi o primeiro a reconhecer a sua importância. Dentre as inovações técnicas; o uso de cliques de prata, fragmentos de músculo como fonte de fibrina e a introdução do eletrocautério de Bovie em 1926, foram as mais popularizadas (Horrax G, 1981). Sua

exaustiva atenção para detalhes contribuiu para definir síndromes clínicas associadas à meningiomas de goteira, asa esfenoidal e outros. Ajudou a popularizar o uso da monitorização cardiorespiratória durante suas cirurgias. Além de melhor compreensão fisiológica da pressão intracraniana. Estes relatos podem ser observados em sua obra de 1938, onde descreveu os 313 casos de meningiomas operados entre 1903 à 1932 (Cushing H, 1938).

O século XX é marcado pelo surgimento de técnicas microcirúrgicas propostas pelo Professor M. G. Yasargil e grande avanço de estudos radiológicos, desde o surgimento da tomografia na década de 70 até a Ressonância Magnética na década de 90. Isto possibilitou o melhor preparo pré-operatório, planejamento cirúrgico e execução de cirurgias mais radicais com menor morbidade.

O melhor detalhamento das vias moleculares das neoplasias consiste em grande esperança para a formação de novos alvos terapêuticos . A teoria de evolução citogenética proposta por Nowell, onde um clone original de células neoplásica pode adquirir alterações genéticas adicionais que permite a sua seleção com maior capacidade para a proliferação, iniciou uma era de melhor entendimento fisiopatológico e o surgimento de novos alvos terapêuticos (Nowell PC, 1976). Os meningiomas não apresentam nenhum tratamento efetivo além da cirurgia. Assim, é fundamental elucidar suas vias moleculares para que haja mais opções de tratamento. Este estudo visa a melhor compreensão biomolecular dos meningiomas e no futuro contribuir no estabelecimento de novas terapias curativas.

2.1. Epidemiologia e Patologia dos Meningiomas

Os meningiomas são neoplasias intracranianas de crescimento lento e que se originam das células meningoteliais da aracnóide, com incidência anual de aproximadamente seis a cada 100.000 pessoas, sendo mais comum em adultos, mulheres e após a quinta década de vida. Representam os tumores intracranianos mais comuns, contabilizando 13-26% deste total (Cotran, Kumar e Collins, 2000; Whittle et al., 2004).

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), os meningiomas são divididos em três tipos: benignos (WHO grade I), atípico (WHO grau II) e anaplásico (WHO grau III) (Louis et AL., 2007; Riemenschneider et al, 2006 e Mathias et al, 2007). Diferentes parâmetros histológicos são usados para graduação em benigno, atípico e anaplásico. O índice mitótico é considerado o fator mais importante para determinar o meningioma como atípico e/ou anaplásico . Além deste, também são importantes a celularidade; a presença de células pequenas com alta relação núcleo-citoplasma; nucléolos proeminentes e necrose de padrão geográfico (Louis et al., 2007). O MIB, antígeno monoclonal ki-67, tem sido usado em vários estudos de meningioma como suporte adicional na graduação do mesmo. Assim, altos índices de MIB-1 têm sido associados à agressividade, mau prognóstico e/ou crescimento do tumor residual (Perry et al.; 2004).

Aproximadamente 80% de todos os meningiomas são de crescimento lento, WHO grau I, com presença de ocasionais mitoses e com baixo risco de recidivas. Os subtipos histológicos mais comuns neste grau são : o meningotelial ou sincicial, fibroblástico e o transicional. O meningotelial

apresenta células poligonais com abundante citoplasma eosinofílico e borda celular escassa, núcleo arredondado e a presença de pseudo-inclusões nucleares, decorrente da invasão do citoplasma no núcleo. O fibroblástico contém células alongadas com vasto depósito de colágeno entre elas. E o transicional possui características do meningotelial e do fibroblástico (Perry, Gutmann e Reifenberger, 2004). Os meningiomas grau I podem ser removidos cirurgicamente; no entanto, a ressecção total é limitada quando há o envolvimento dos nervos cranianos, vasos cruciais ou invasão do tumor nos ossos basais. Embora este tipo de invasão traga mais dificuldade de remoção, não são considerados atípicos ou malignos. Há uma taxa de recidivas entre 7 a 20% (Perry et al, 1999 e Perry et al, 1997, Louis et al., 2007).

Tabela 1. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para os meningiomas com baixo grau de agressividade e recorrência.

Subtipo histológico	Grau OMS
Meningotelial	I
Fibroso ou fibroblástico	I
Transicional ou misto	I
Psamomatoso	I
Angiomatoso	I
Micorocístico	I
Secreter	I
Linfoplasmocítico	I
Metaplástico	I

Os meningiomas atípicos, WHO grau II, constituem 15 a 20 % dos meningiomas. A taxa de recorrência é de 40 % em cinco anos, após ressecção cirúrgica completa (Perry et al, 1999 e Perry et al, 1997). É caracterizado pela presença de pelo menos três das seguintes características: alta celularidade, tendência de crescimento das células tumorais, nucléolo proeminente, mitose, necrose e invasão cerebral e um índice mitótico de $\geq 4/10$ HPF (High Power Factor) (Louis et al., 2007; Perry, Gutmann e Reifenberger, 2004). No grau II são reconhecidos três padrões arquiteturais; os atípicos, de células claras e os meningiomas cordóides. Estas duas últimas variantes são associadas à altas taxas de recorrências, mesmo não apresentando todas as características citadas acima. Os meningiomas cordóides possuem características similares aos cordomas; cordões ou trabéculas de células eosinofílicas, associadas à células vacuoladas numa matriz mucóide abundante. Os tumores de células claras são compostos por células poligonais, com citoplasma claro e rico em glicogênio e proeminentes blocos perivascular e intersticial de colágeno.

Tabela 2. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para os meningioma atípico e anaplásico (maligno).

Subtipo histológico
Meningioma atípico (grau II) Índice mitótico >4/10 campos de grande aumento e Pelo menos 3 dos seguintes parâmetros : Hiper celularidade Células pequenas com elevada razão citoplasma:núcleo Nucléolos proeminentes Perda do padrão de redemoinhos e/ou fascículos Necrose geográfica
Meningioma anaplásico (grau III) Índice mitótico >20/10 campos de grande aumento ou Franca anaplasia (aspecto de sarcoma, carcinoma ou melanoma)

Os meningiomas anaplásicos (malignos) WHO grau III representam de 1 a 3 % dos casos meningiomas. Estes tumores possuem características muito similares a outras neoplasias malignas, como por exemplo, infiltração nos tecidos adjacentes (Riemenschneider et al, 2006). Atinge adultos dos 2 sexos especialmente entre 50 e 60 anos. Apresentam um aumento na perda do ciclo celular e na diferenciação, além de excessivo índice mitótico (20/10 HPF). São associados à uma taxa de recorrência de mais de 50-80% após a ressecção cirúrgica e sobrevida menor que 2 anos. Os principais aspectos que indicam malignidade são a progressão rápida dos sintomas iniciais, recidiva do tumor, edema peritumoral, aumento da celularidade, atipias nucleares, figuras de mitoses frequentes, focos de necrose, invasão extensa do tecido nervoso e presença de metástases (Perry, Gutmann e Reifenberger, 2004; Whittle et al.,

2004). São subclassificados no padrão arquitetural em anaplásicos, papilares e rabdóides. Meningiomas grau III apresentam um comportamento biológico mais agressivo e estão clinicamente associados com alto risco de recorrência local além de um prognóstico menos favorável (Perry, Gutmann e Reifenberger, 2004).

Tabela 3. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para os meningiomas com alto grau de agressividade e recorrência.

Subtipo histológico	Grau OMS
Atípico	II
Células claras intracraniano	II
Cordóide	II
Rabdóide	III
Papilar	III
Anaplásico ou maligno	III

A classificação WHO ainda é baseada em parâmetros morfológicos. Entretanto, tem ocorrido um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares que elucidam a tumorigênese e a progressão dos meningiomas. A análise das regiões cromossômicas e os estudos de novos genes devem futuramente auxiliar no diagnóstico e prognóstico, assim como possíveis marcadores moleculares podem eventualmente facilitar a combinação histológica e molecular na classificação dos meningiomas. O uso de análise global do genoma, como por exemplo, a técnica de microarrays e a

análise da expressão gênica, contribuirão e acelerarão no processo de desenvolvimento de novas terapias (Matthias et al.; 2007).

2.2. Biologia Molecular dos Meningiomas

Um dos primeiros tumores sólidos a terem alterações genéticas identificadas foram os meningiomas (Zang et al., 2003). Inúmeros são os avanços tecnológicos disponíveis para a melhor compreensão das vias moleculares correlacionadas com a tumorigênese e progressão tumoral . Porém, pouco se sabe sobre as principais vias correlacionadas com estas neoplasias (Jagannathan et al.; 2008).

A principal alteração cromossômica encontrada nos meningiomas são as correlacionadas com o cromossomo 22, geralmente na forma de perda (LOH - *Loss Of Heterozygosity*) ou deleção parcial do 22q. Esta é a alteração mais comum encontrada, entre 40 e 70% dos meningiomas esporádicos (Mathias et al, 2007 e Perry et AL, 2004) e é a melhor caracterizada. Anormalidades no cromossomo 22 são identificadas em igual proporção entre os tumores grau I, II e III (Riemenschneider et al, 2006 e In Bok Chang et al, 2010). Assim, constitui um importante passo da iniciação tumoral e tem pouca importância na progressão. O gene supressor de tumor NF2 é o principal localizado no braço longo (q) do cromossomo 22 e seu produto é a proteína Merlin. Esta pertence à família 4.1 de proteínas estruturais, uma proteína de membrana responsável pelo contato celular e motilidade e é uma inibidora da PAK-1 (p21 activated kinase) (Kissil et al., 2003).

Outro fator que também tem um papel na formação de meningiomas é a irradiação. Meningiomas foram notados em crianças tratadas para tumores

cerebrais ou *tinea capitis* e após exposição às explosões atômicas de Hiroshima e Nagasaki (Umansky F et al., 2008). A latência na formação de meningiomas depende da dose de irradiação e a idade do paciente. Usualmente os pacientes foram submetidos às elevadas doses de irradiação na infância (Sadetzki S et al., 2005).

A perda do braço curto (p) do cromossomo 1 é a segunda mais comum anormalidade cromossômica encontrada. A frequência desta alteração aumenta conforme o grau tumoral se eleva. Matthias et al. (1995) evidenciou 11% nos graus I, 40% nos graus II e 70% nos graus III. Estes achados suportam a teoria que anomalias no cromossomo 1p estejam correlacionadas com a progressão tumoral dos meningiomas. Nos gliomas está bem documentada a relação entre a transformação maligna versus tumores malignos *De Novo*, mas nos meningiomas não. A progressão tumoral reflete o surgimento sequencial de alterações genéticas num subgrupo de células com novas características. O modelo da evolução clonal; proposto por Nowell em 1976, onde uma célula carrega a mutação que proporciona a ela um crescimento seletivo avançado e a medida que o tumor progride, acumula mutações; é amplamente aceito. Al-Mefty et al (2004) avaliaram 175 casos de meningiomas recorrentes, destes 11 progrediram (8 benignos e 3 atípicos); 10 apresentavam complexidade cariótica previamente, que ele definiu como sendo as deleções 22q, 1p e 14q simultaneamente. Assim, sugere-se a possibilidade que estes tumores eram intrinsecamente malignos e que estejam destinados a progredir, ao invés do escalonamento citogenético como proposto na maioria das teorias de progressão, visto na figura 1. E se propõem a complexidade cariótica como um preditor de comportamento dos meningiomas. Inúmeros

genes estão envolvidos no cromossomo 1p : TP73, CDKN2C, RAD54L e APL (Riemenschneider et al, 2006); mas não evidenciam nenhuma alteração estrutural consistente, sendo que uma possível explicação a metilação desses genes (Lomas et al, 2004) ou outro mecanismo gênico de inativação possa contribuir para o silenciamento da expressão dos mesmos. Outros eventos adicionais incluem a deleção nos cromossomos 10 e 14, que estão associados à meningiomas de alto grau (krayenbuhl et al, 2007).

Figura 1. Modelo molecular associado à tumorigênese e à progressão maligna nos meningiomas. Linhas pontilhadas – patogênese mais comum; -nº - perdas de braços dos cromossomos; 4.1B – isoforma cerebral da proteína 4.1R; 4.1R – proteína (do citoesqueleto) 4.1; + nº – ganhos de braços de cromossomos; Crom. dic./em anel – cromossomos dicêntricos ou em anel; Telomerase (+) – atividade aumentada da telomerase; VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial; RP – receptor de progesterona. Wolfsberger et al., 2004; Perry et al., 2004.

A correlação entre esteróides sexuais no crescimento de meningiomas deve-se à observação de uma predominância maior destas neoplasias no sexo feminino, aumento do crescimento na gestação e na fase lútea do ciclo menstrual e associação com câncer de mama. As taxas de

ocorrência de receptores de progesterona (PR) e estrógeno (ER) em meningiomas são de 44-88% e 5-33% respectivamente (Pravdenkova et al, 2006). Entretanto, experimentos realizados utilizando antagonista de receptor de progesterona, bem como anti-estrógeno, têm demonstrado resultados insatisfatórios (Grunberg et al, 2001). Há uma relação inversa entre a expressão de PR e o grau tumoral, ou seja, a expressão positiva de PR em meningiomas é um sinal favorável de comportamento clínico e biológico. Já a expressão positiva para ER tem um potencial maior para a agressividade. Desta forma, o estatus do receptor hormonal poderia ser incluído numa eventual futura classificação do grau tumoral (Pravdenkova et al, 2006).

2.3. Os microRNAs

Os microRNAs foram descobertos em 1993 por dois estudos independentes, que identificaram o gene *lin-4*, em *Caenorhabditis elegans*, como um pequeno RNA não codificante (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Já foram identificados 2588 miRNAs em humanos, com base no banco de dados de microRNAs de junho de 2014 (Acunzo et al., 2014).

Os miRNAs são RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, cuja função é o silenciamento do RNAm em nível pós-transcricional, através do seu acoplamento no RNAm complementar. Sua biogênese inicia-se com a transcrição do miRNA gene pela RNA polimerase II/III, gerando um transcrito primário (pri-miRNA). Este é clivado pelo complexo enzimático Drosha em pré-miRNA e em seguida transportado do núcleo para o citoplasma pela enzima Exportina 5. No citoplasma a enzima Dicer cliva a

dubla fita de mi-RNA e a incorpora no complexo RISC (RNA-induced silencing complex), formando o mi-RNA funcional (Moller et al., 2013).

Figura 2. Biogênese dos microRNAs (Kimura e Ricarte Filho, 2006).

Muitos miRNAs são conservados entre organismos relacionados remotamente, o que sugere que estas moléculas são essenciais na regulação de diversos processos celulares tais como na diferenciação, proliferação, apoptose e no metabolismo. Dessa forma, a perda na regulação da expressão de miRNA pode conduzir a uma série de desordens (Kulshreshtha et al., 2007).

Os microRNAs são expressos em diferentes níveis e de maneira específica nos diferentes tecidos. As ferramentas da bioinformática predizem milhares de mRNA alvos para cada miRNA, sugerindo que muitos genes estão sujeitos à regulação mediada pelos miRNAs (Acunzo et al., 2015)

A expressão gênica desregulada é o principal mecanismo da disfunção dos miRNAs no câncer, com níveis anormais na expressão de miRNA em amostras de tumor quando relacionada ao tecido normal. O perfil da expressão do miRNA dos tumores humanos tem levado à identificação de características correlacionadas ao diagnóstico do tumor, estágio, progressão, prognóstico e resposta ao tratamento. Portanto, a impressão digital do miRNA pode ser utilizada pelos oncologistas como uma ferramenta no diagnóstico e prognóstico. Além disso, novas estratégias terapêuticas envolvendo miRNA silenciadores ou miRNA mimicos poderiam ser propostas, baseadas nas funções destes pequenos RNAs não-codificantes como oncogenes e genes supressores de tumor em tumores cerebrais (Nicoloso e Calin, 2008).

Os dois primeiros trabalhos que avaliaram o perfil da expressão de miRNAs em GBM foram publicados em 2005 (Ciafre et al., 2005; Chan et al., 2005). Ciafre et al. observaram a expressão global de 245 miRNAs em glioblastomas multiformes (GBM), utilizando a técnica de microarranjos, que permitiu identificar a expressão alterada . Muitos miRNAs, incluindo o miR-21, foram altamente expresso nestes tumores. Chan et al. (2005) foram os primeiros à investigarem as propriedades funcionais de um miRNA. Encontraram que a inibição do miRNA-21 resultava no aumento significativo da apoptose. Assim, concluíram que o miR-21 poderia funcionar como um micro-oncogene. Desde então, inúmeros outros microRNAs foram descritos como

alterados em GBM, podendo agir com função de supressores tumorais ou oncogenes. As propriedades funcionais distintas nos tumores cerebrais precisam de melhor compreensão e investigação, afim de propiciarem futuras terapias moleculares.

Poucos são os trabalhos que avaliam o perfil da expressão de mi-RNAs em meningiomas. Zhi et al. (2013) identificaram 14 miRNAs com diferentes perfis de expressão em meningiomas, entre eles, a alta expressão do miR190a e baixa dos mi-R29c-3p e miR219-5p correlacionou-se com elevadas taxas de recorrência. Estes resultados sugerem que o uso destes perfis tem um potencial efetivo no diagnóstico e prognóstico dos meningiomas. Saydam et al. (2009) demonstraram que baixos níveis de miR-200a contribui na tumorigênese dos meningiomas, através do aumento da expressão de 3 RNAm diferentes. Estes processos mediados pelo miR-200a podem estar em outros tumores e fornecem potenciais alvos para intervenção terapêutica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Em trabalho prévio do nosso grupo pela técnica de microarrays foi analisado o perfil de expressão global de microRNAs em meningiomas. Foram selecionados os miR-130a, miR-181c e miR181d como candidatos moleculares diferencialmente expressos. Portanto, o objetivo deste estudo foi validar a expressão dos miR-130a, miR-181c e miR181d, assim como analisar o seu possível papel como biomarcadores e a sua correlação com a progressão tumoral dos meningiomas.

Objetivos específicos:

- Quantificar a expressão dos microRNAs miR-130a, miR181c e 181d em amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de meningiomas de meningiomas grau I, II e III;
- Quantificar a expressão dos microRNAs miR-130a, miR181c e 181d em amostras de plasma de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I, II e III;

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram utilizadas amostras de tecido tumoral e de plasma coletadas de 40 pacientes com diagnóstico histológico confirmado de meningioma segundo os critérios da OMS. A coleta foi realizada durante cirurgia realizada pela Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Foram definidos três grupos constituídos por amostras de meningiomas grau I, grau II e grau III.

Os miRNAs miR-181d, miR-181c e miR130a foram selecionados a partir de estudo prévio do nosso grupo pela metodologia de microarrays. Figura 3. Neste trabalho o conjunto de microRNAs e mRNAs identificados como diferencialmente expressos entre as amostras de meningioma e as amostras de tecidos controle da aracnoide foram utilizados com o objetivo de identificar microRNAs e seus potenciais transcritos-alvo, envolvidos na patogênese dos meningiomas. Para isso, o conjunto de 22 microRNAs expressos em níveis significativamente ($p < 0.05$, FDR) mais altos nos Meningiomas (comparado à Aracnoide), tiveram seus alvos preditos identificados, utilizando o conjunto de predições baseadas em sítios conservados evolutivamente e com altos scores (Hg19_predictions_S_C_aug2010, www.microRNA.org). Em seguida, este conjunto de alvos preditos foi comparado com os 761 transcritos de mRNA expressos em níveis significativamente mais baixos ($p < 0.05$, FDR) nos meningiomas (comparado à Aracnoide).

Figura 3. Visualização dos microRNAs com níveis de expressão nos Meningiomas. O programa Expander 6 foi utilizado para o teste e para a obtenção da figura.

Todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram abordados no pré-operatório para a obtenção de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. É importante salientar que todos os investigadores envolvidos neste projeto, bem como os doentes foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram um acordo formal, antes da coleta. As amostras já existentes pertencem a um banco de tumores aprovado na comissão de ética HCFMRP/USP.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de RNA das amostras de tecido tumoral

Às amostras foram adicionados 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se, então, 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também utilizamos um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 considera-se que o material esteja

degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. A faixa ideal a ser obtida é de 1,7 a 1,9, porém consideramos uma amostra boa na faixa de 1,61 a 1,99.

3.2.2. Extração do RNA do plasma

A extração do RNA foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN), com protocolo adaptado a partir das orientações do fabricante. Em um tubo falcon estéril e livre de RNase de 15mL, adiciona-se 4mL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) a 400µL de plasma, homogeneiza e deixe o material de repouso por 5 min em temperatura ambiente. Adiciona-se 800ul de clorofórmio (proporção 1:5 com a quantidade de Trizol® inicial), misturando vigorosamente por 30 segundos. Deixe o material em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifuga-se por 15 minutos a 12.000g a 4°C. Ao final da centrifugação haverá um sistema de 3 fases: incolor=RNA, branco=DNA, vermelho=proteína. A fase incolor será transferida para outro falcon de 15 ml, adiciona-se 1,5 vezes o volume conseguido da fase incolor de etanol 100% e agite vigorosamente a amostra. Em seguida, adiciona-se 700µl dessa solução na coluna RNeasy MinElute Spin®, centrifugando a > 8000g por ao menos 15 seg. O líquido resultante será descartado e repetido o passo anterior com o resto da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. Posteriormente, será adicionado 700µl de Tampão RWT (Buffer RWT do Kit) em cada coluna, centrifugando também a > 8000g por ao menos 15 seg, sempre descartando o líquido resultante. Será adicionado 500µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit)

em cada coluna, centrifugando também a $> 8000g$ por ao menos 15 seg, e descartando o líquido resultante. Será adicionado 500 μ l de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a $> 8000g$, desta vez por 2 minutos, descartando, o líquido resultante. Será centrifugado com o máximo da centrífuga por 1 minuto, descartando líquido resultante. Será trocado o coletor da coluna e será adicionado 30 μ l de água RNA-free. Será centrifugado a $> 8000g$ por 1 minuto e será transferido para um Eppendorf o líquido resultante, congelando-o a -80°C imediatamente. Para a verificação da integridade do RNA obtido, as amostras serão analisadas em Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com RNA 6000 Pico chip. Também utilizaremos um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2 μ l. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280). A faixa ideal a ser obtida para essa razão é de 1,70 a 2,00.

3.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA) dos microRNAs

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA, a transcrição reversa foi feita utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados 0,75 μ l de RT Buffer, seguido de 0,075 μ l de dNTP's, 1,5 μ l de *primers* específicos (miRNAs e controles endógenos), e 0,5 μ l da enzima MultiScribeTM, 0,094 μ l de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5 μ l, e sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a 16°C , 30 min a 42°C , 5 min a 85°C e, em seguida, a 4°C . Para o PCR

em tempo real, foram utilizados 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

3.2.4. RQ microRNAs: miR-130a, miR-181c e miR- 181d

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial de microRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase, tradução literal de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), quantitativa em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão de microRNAs, são utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado microRNA) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso, a média do U6) na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador, neste caso, utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Realizamos a quantificação relativa dos microRNAs miR-130a, miR-181c e miR-181d, nas quais as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA. Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), juntamente com o *software* Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram, então, exportados para planilhas do *software* Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “*software package*”.

3.2.5. Análise estatística

Para a análise da expressão gênica pelo método quantitativo de PCR em tempo real foram calculados os coeficientes de regressão; uma transformação *log* será aplicada para os valores de expressão dos genes para estabilização da variância. Também foram calculados intervalos de confiança de 95% (IC). O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows e o teste Two-Way ANOVA foram usados para analisar as diferenças na expressão dos microRNAs estudados (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). O teste Oneway ANOVA foi usado para analisar as diferenças na expressão dos genes estudados. Os valores de *p* foram considerados significativos quando inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. microRNA-181d no tecido tumoral

Gráfico 1. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-181d entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0207$, Kruskal Wallis test).

4.2. microRNA-181d no plasma

Gráfico 2. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-181d entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0187$, Kruskal Wallis test).

4.3. microRNA-181c no tecido tumoral

Gráfico 3. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-181c entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,8236$ Kruskal Wallis test).

4.4. microRNA-181c no plasma

Gráfico 4. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-181c entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,5603$ Kruskal Wallis test).

4.5. microRNA-130a no tecido tumoral

Gráfico 5. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-130a entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,9179$, Kruskal Wallis test).

5. DISCUSSÃO

Estudos recentes tem demonstrado o papel dos microRNAs da família 181 nas vias de gliomagenese, assim como o envolvimento destes miRNAs na resistência dos gliomas aos tratamentos por radioterapia e quimioterapia (SHE et al., 2014; SLABY et al, 2010). Entretanto, não há relatos do papel dos miRNAs da família 181 em meningiomas. Em estudo prévio do nosso grupo em amostras de meningiomas grau I pela metodologia de microarrays, entre os miRNAs diferencialmente expressos, dois miRNAs da família 181 destacaram-se como promissores candidatos para validação por PCR em tempo, os miRNAs: miR-181d e miR-181c.

Zhang et al (2012) analisaram a expressão do miR-181d em 82 casos de glioblastomas e observaram que a expressão deste miRNA foi consistentemente associado com sobrevida maior. Foi constatada a regulação do gene MGMT pelo miR-181d após transfecção deste miRNA em linhagens de glioblastoma visto que a transfecção causou redução da expressão do gene MGMT assim como da proteína MGMT. Também foi observado que, inversamente, baixos níveis de expressão do miR-181d estão associados com aumento da expressão de MGMT.

Nossos resultados demonstraram o aumento da expressão do miR-181d nos meningiomas e ainda observamos que, o aumento da expressão do miR-181d fica ainda maior de acordo com a progressão do grau tumoral. Outro achado relevante foi que no plasma a expressão do miR-181d foi ainda mais evidente e também acompanhou a progressão do grau do tumor. A partir destes resultados podemos sugerir um possível papel do miR-181d na

progressão dos meningiomas, assim como uma importante função de biomarcador.

Nos últimos anos muitos estudos tem demonstrado o papel dos microRNAs como biomarcadores, devido a sua detecção e maior estabilidade quando comparados aos mRNAs, sendo menos susceptíveis à modificação química e degradação. Outra característica importante é a regulação de uma grande variedade de alvos pelos miRNAs, podendo ser explorados no diagnóstico, prognóstico e novos alvos terapêuticos (SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010). Entretanto, em meningiomas pouco se sabe sobre os miRNAs como biomarcador e apesar dos nossos resultados demonstrarem o miR-181d como um candidato promissor, mais estudos funcionais deste miRNA em meningiomas são necessários.

Lakomy et al (2011) analisaram, por PCR em tempo real, 38 amostras de pacientes com diagnóstico de glioblastomas que apresentaram 32% de metilação de MGMT. Também foi observada uma alta expressão de miR-21 e miR-181c e que esta alta expressão está associada à progressão precoce. A associação do aumento da expressão destes dois miRNAs predizem uma maior eficácia a progressão. Os autores sugerem que a combinação dos níveis de expressão miR-181c e miR-21 tem alta sensibilidade e especificidade como indicador de progressão precoce. Slaby et al., 2010, demonstraram uma reduzida expressão dos miRNA-181 b e 181c em amostras de pacientes que responderam ao tratamento combinado de radioterapia e quimioterapia (SLABY et al., 2010).

Nossos resultados não demonstraram diferença na expressão do miR-181c entre os grupos estudados, tanto nas amostras de tecido tumoral

quanto nas amostras de plasma. Uma possibilidade é que não exista um envolvimento da família dos miRNAs 181 assim como nos gliomas, mas uma especificidade apenas do miR-181d em meningiomas.

Além dos miR-181d e miR-18c, o miR-130a também foi selecionado nas análises iniciais por microarrays. O miR-130a também destaca-se na literatura associado a vários tipos de tumores.

Ouyang et al (2014) analisaram 15 casos de câncer de mama pela técnica de microarrays e utilizaram como grupo controle o tecido de mama normal adjacente. Foram estudados 1513 miRNAs e destes 18 miRNAs apresentaram níveis de expressão elevados (miR-155-5p, miR-21-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p e miR-183-5p) e 23 miRNAs apresentaram níveis de reduzidos (miR10b-5p, miR451a, miR125b-5p, miR31-5p, miR195-5p e miR130a-3p). Os autores também selecionaram 11 genes com base em análises de bioinformática (plataforma starBase) e revisão da literatura. Os genes alvos foram validados por PCR em tempo real, sendo que as principais vias foram PTEN/akt, MAPK, MDR1, RhoA, FOXO3 e PDCD4. No mesmo estudo em experimentos *in vitro*, o miRNA-130a demonstrou um importante papel oncomiR, visto que um dos seus alvos é a proteína MAPK (quinase mitogenica-ativada) que pode promover proliferação celular e angiogênese. Nestes experimentos a expressão elevada do miR130-a ou miR-451a alteraram significativamente a sensibilidade para a doxorubicina. Assim, os autores concluíram que a expressão anormal destes miRNAs está relacionada principalmente com a quimioresistência.

Em nosso estudo o miR-130a não apresentou diferença nos grupos de meningiomas grau I, grau II e grau III.

He et al (2014), em estudo com linhagem de câncer cervical in vitro demonstrou que miR-130a regula diretamente o mRNA da enzima Dicer e aumenta a migração e invasão das células. Alta expressão de miR-130a está significativamente associada à pior sobrevida. Assim, a expressão Dicer regulada pelo miR130a é um importante potencial fator prognóstico em câncer cervical. Pela técnica de imunohistoquímica foi avaliado a expressão proteica da Dicer com 51% de positividade, sugerindo mecanismo de controle pos-transcricional. A expressão de mRNA e proteína Dicer estão associados metástases à distância e recorrência.

Expressão do miR-130a em hepatocarcinoma celular foi avaliada por Li et al (2014) que correlacionaram a expressão deste miRNA com aspectos clínicos e prognósticos. Foram utilizadas 102 amostras de hepatocarcinoma celular e comparadas com tecido normal adjacente pela técnica de RT-PCR. O miR-130a foi significativamente reduzido no tumor (em 78 das 102 amostras). Pacientes com baixa expressão miR130-a tiveram pior sobrevida, concluindo-se que este miRNA tem um fator prognóstico independente de sobrevida. Os autores concluem que poderia servir como um potencial biomarcador de prognóstico.

Qiu et al (2014) analisaram a expressão de miRNAs e genes em 480 amostras de glioblastomas, sendo 318 casos com recorrência e 162 casos sem progressão/recorrência e compararam com 10 amostras de tecido cerebral normal. Foram observados 534 miRNAs com alteração nos níveis de expressão e 20 miRNAs apresentam correlação com dados clínicos, sendo que destes, 6 miRNAs foram selecionados para validação por RT-PCR: miR-326 e miR-130a hiperexpressos e miR-323, miR-329, miR-155 e miR210

hipoexpressos com significante associação a uma maior sobrevida. Níveis altos dos miR-323 e miR-130a e níveis baixos dos miR-155 e miR-210 foram relacionados com um maior tempo livre de progressão. Os autores concluíram que os miRNAs: miR326, miR130a, miR155 e miR210 e suas interações podem servir como fator prognóstico e marcador de sobrevida em GBM.

Diante dos nossos resultados e de acordo com as informações da literatura podemos constatar um importante papel do miRNAs associados aos tumores cerebrais e principalmente do miR-181d em meningiomas.

6. CONCLUSÕES

- O miR-181d apresentou-se hiperexpressos nos meningiomas grau I, II e III tanto no tecido tumoral quanto no plasma. O aumento de expressão do miR-181d foi associado a progressão tumoral.
- O miR-181c não apresentou-se diferencialmente expresso nos meningiomas grau I, II e III tanto no tecido tumoral quanto no plasma.
- O miR-130a não apresentou-se diferencialmente expresso nos meningiomas grau I, II e III nas amostras de tecido tumoral

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acunzo M, Romano G, Wernicke D. MicroRNA and cancer. *Adv Biol Regul.* 2015 Jan;57C:1-9
- Al-Mefty O. Preface. In : Al-Mefty O, ed. *Meningiomas*. New York : Raven Press; 1991:vii
- Al-Mefty O, Kadri P O, Pravdenkova S, Sawyer J, Stangeby C, Husain M. Malignant progression in meningioma : documentation of a series and analysis of cytogenetic findings, *J Neurosurg* 101 : 210-218, 2004.
- Cotran Ramzi S.; Kumar Vinay; Collins Tucker. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 6ªed. 2000.
- Couldwell WT, Cole CD, Al-Mefty O. Patterns of skull base meningioma progression after failed radiosurgery. *J Neurosurg.* 2007 Jan;106(1):30-5.
- Cushing H, Eisenhardt L. *Meningiomas : Their Classification, Regional behavior, Life history, and Surgical End-Results*. Springfield, IL : Charles C Thomas; 1938
- Durante F. Contribution to endocranial surgery. *Lancet* 1887; 130:654-655
- Esquela-Kerscher A; Slack FJ. Oncomirs – miRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:259-269.
- Grunberg SM; Rankin C; Townsend J; Ahmadi J; Feun L; Fredericks R; Russel C; Kabbinnavar F; Barger GR; Stelzer KJ. Phase III double-blind randomized placebo controlled study of mifepristone (RU486) for treatment of unresectable meningioma. *ACSO Proc* 20:56a, 2001.

He S, Pham MH, Pease M, Zada G, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ. A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus*. 2013 Dec;35(6):E5

He L, Wang HY, Zhang L, Huang L, Li JD3, Xiong Y, Zhang MY, Jia WH, Yun JP, Luo RZ, Zheng M. Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell Death Dis*. 2014 May 1;5:e1205.

Horrax G, Some of Harvey's Cushing's contribution to neurological surgical. *J Neurosurg* 1981; 54(4):436-447

In Bok Chang, Byung Moon Cho, Seung Myung Moon, Se Hyuck Park, SAE Moon Oh, Seong Jin Cho. Loss of Heterozygosity at 1p, 7q, 17p, and 22q in Meningiomas. *J Korean Neurosurg Soc* 48 : 14-19, 2010

Jagannathan J, Oskouian RJ, Yeoh HK, Saulle D, Dumont AS. Molecular biology of unresectable meningiomas: implications for new treatments and review of the literature. Skull Base. 2008 May;18(3):173-87

Kissil JL, Wilker EW, Johnson KC, Eckman MS, Yaffe MB, Jacks T. Merlin, the product of the Nf2 tumor suppressor gene, is an inhibitor of the p21-activated kinase, Pak1. *Mol Cell*. 2003 Oct;12(4):841-9.

Krayenbuhl N, Pravdendkova S, Al-Mefty O. Denovo versus transformed atypical and anaplastic meningiomas : comparisons of clinical course, cytogenetics and outcome. *Neurosurgery* 61 : 495-504, 2007

Kulshreshtla R; Ferracin M; Negrini M; Calin GA; Davuluri RV; Ivan M. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle*. 2007; 6:1426-1431.

Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated

with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* 2011 Dec;102(12):2186-90.

Lomas J; Aminoso C; Gonzalez-Gomes P; Alonso M.E; Arjona D; Marin-Lopez I; Campos JM; Isla A; Vaquero J; Gutierrez M; Sarasa JL; Belo MJ; Rey JA. Methylation Status of TP73 in Meningiomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2004;148:148-151.

Louis DN, Ohgaki H, Weistler OD, Cavenee WK. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. 4th Ed. Lyon, France : IARC Press; 2007

Louis A. Sur les tumeurs fongueses de la dure-mere. *Mem Acad Roy Chirurg* 1774;5:1-59

Matthias S, Andreas D, Jeffrey L. Allelic Losses on chromosomes 14, 10 and 1 in Atypical and Malignant Meningiomas : A genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995; 55:4696-4701.

Matthias S; Boström JP; Hartmann C. Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery.* 2007; 5: 787-798.

Moller H, Rasmussen A, Andersen H, Johnsen K, Henriksen M, Duroux M. A Systemic review of MicroRNA in Glioblastoma Multiforme : Micro-modulators in the Mesenchymal Mode of Migration and Invasion. *Mol Neurobiol* (2013) 47 : 131-144

Netsky MG, Lapresle J. The first account of a meningioma. *Bull Hist Med* 1956; 30:465-468

Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain Pathology.* 2008; 18:122-129.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 1976; 194(4260):23-28

Perry A; Stafford SL; Scheithauer BW; Suman VJ; Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 1455-1465.

Perry A; Scheithauer BW; Stafford SL; Lohse CM; Wollan PC. Malignancy in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer.* 1999; 85: 2046-2056.

Perry A; Gutmann DH; Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *Jornal of Neuro-Oncology.* 2004; 70: 183-202.

Pravdenkova S, Al-Mefty O, Sawyer J. Progesterone and estrogen receptors : opposing prognostic indicators in meningiomas. *J Neurosurg* 105 : 163-173, 2006.

Ragel BT, Jensen RL. Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurg Focus.* 2005 Nov 15;19(5):E9.

Riemenschneider M; Perry A; Reifenderger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 1045-1054.

Sadetzki S, Flint-Richter P, Starinsky S, Novikov I, Lerman Y, Goldman B, et al. Genotyping of patients with sporadic and radiation-associated meningiomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:969–76.

SHE, X., et al. miR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells. *Med Oncol.*, v.31, p. 892, 2014.

SMAELE; E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. *Brain Research*, v. 1338, p. 100-111, 2010.

SLABY, O., et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma*, v. 53, p. 264-269, 2010.

Umansky F, Shoshan Y, Rosenthal G, Fraifeld S, Spektor S. Radiation-induced meningioma. *Neurosurg Focus* 2008;24:E7.

Zhi F1, Zhou G, Wang S, Shi Y, Peng Y, Shao N, Guan W, Qu H, Zhang Y, Wang Q, Yang C, Wang R, Wu S, Xia X, Yang Y. A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. *Int J Cancer*. 2013 Jan 1;132(1):128-36

Wang WT, Chen YQ. Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. *J Hematol Oncol*. 2014 Dec 5;7(1):86

Whittle I; Smith C; Navoo P; Collie D. Meningiomas. *Lancet*. 2004; 363: 1535-1543

Zang KD. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 207–20.