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

VINICIUS MARQUES CARNEIRO

**“Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU em
meningiomas e suas correlações com a progressão tumoral”**

**Ribeirão Preto
2019**

VINICIUS MARQUES CARNEIRO

“Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU em meningiomas e suas correlações com a progressão tumoral”.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.

RIBEIRÃO PRETO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Vinicius Marques

Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU em meningiomas e suas correlações com a progressão tumoral.

56p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, 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. Perfil de expressão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Marques Carneiro

Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU em meningiomas e suas correlações com a progressão tumoral.

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Doutor 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: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A busca pelo conhecimento é um caminho perpétuo e muitas vezes solitário. Somente com amparo sólido, fraterno e constante esta jornada pode ser percorrida. O alicerce desta construção está constante no meu coração, minha esposa Chistiana (Kitty) tem meu extremo reconhecimento no alcance deste objetivo. Minha filha Helena, agora com 2 anos, sempre me proporciona a alegria necessária para continuar a percorrer o caminho do aprendizado. Meus pais, minha fonte inspiradora e fortaleza perene nesta jornada contínua que é a vida, gratidão enorme por participarem comigo neste momento tão especial.

A inspiração e exemplo aprendemos no dia a dia, o convívio com grandes pessoas é um prazer e eterno aprendizado. Assim, reconheço os professores Carlotti e Daniela como fundamentais nesta formação acadêmica e humana.

São em momentos difíceis, onde o tempo está cada vez mais escasso, oportunidades de encontrar e conviver com pessoas brilhantes nos tornam melhores. Davi e Fermio foram fundamentais nesta jornada e espero que a amizade continue.

Toda equipe do Laboratório, sempre corteses e eficientes, foram de extrema valia neste trabalho.

“Eu quase nada não sei, mas desconfio de muita coisa” (João Guimarães Rosa).

RESUMO

CARNEIRO, VM. Expressão dos microRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU em meningiomas e suas correlações com a progressão tumoral. (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: Os meningiomas são neoplasias intracranianas de crescimento lento e que se originam das células meningoteliais da aracnóide, representam mais de 33% dos tumores primários do sistema nervoso central. Constituem um grande desafio no seu manejo. O tratamento mais eficaz e preconizado é a máxima ressecção cirúrgica, sem comprometer a função neurológica do paciente. Uma neoplasia extremamente freqüente, escassas opções de tratamento adjuvante e pouco compreendida em âmbito molecular culmina em um ambiente desafiador e de suma importância médica para que novas terapias surjam e possam propiciar o melhor tratamento para os pacientes. 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 miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU. **Pacientes e métodos:** Os miRNAs miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU 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 a expressão destes miRNAs (tecido tumoral e plasma) e do gene HNRNPU, por meio da técnica de PCR em tempo real, em meningiomas grau I, II e III, respectivamente com 14, 14 e 6 pacientes. **Resultados:** A idade média foi de 55 anos, sendo 76,5%(26) dos casos mulheres e 23,5% (8) homens. Houve um aumento progressivo da proporção do sexo masculino à medida que o grau tumoral se eleva (grau 1 – 7,1%, grau 2 - 28,6% e grau 3 - 50%). A proporção de meningiomas de convexidade acompanha o aumento tumoral (grau 1 – 28,5%, grau 2 – 57,1% e grau 3 – 83,3%). E nos tumores de base, a maioria foi de meningiomas grau 1 (71,4%). Uma expressão elevada do gene HNRNPU (média em cada grupo - 11.735,94, 2.822,48 e 27.431,56 folds); apenas a diferença das médias entre os graus 2 e 3 apresentaram “significância” (modelo simples: -24.542,6; modelo múltiplo: -25.884,41). Foi realizada um curva ROC (gene *HNRNPU*) entre os meningiomas graus 2 e 3, com uma sensibilidade e especificidade de 80%, foi identificado o valor 5679,36 folds. **Conclusões:** O gene HNRNPU apresenta uma potencial ferramenta molecular no auxílio da distinção diagnóstica entre meningiomas grau 2 e 3.

Palavras-chave: Meningiomas, microRNAs, Progressão tumoral, Perfil de expressão.

ABSTRACT

CARNEIRO, VM. Expression of miR-27a, miR-216a and HNRNPU gene microRNAs in meningiomas and their correlations with tumor progression. (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Meningiomas are slow-growing intracranial neoplasms that originate from arachnoid meningotheelial cells and represent more than 33% of primary tumors of the central nervous system. They are a great challenge in their management. The most effective and recommended treatment is maximum surgical resection, without compromising the neurological function of the patient. Extremely frequent neoplasia, scarce adjunctive treatment options, and poorly understood at the molecular level culminate in a challenging environment of paramount medical importance for new therapies to emerge and provide the best treatment for patients. In this context, the role of microRNAs, which are non-coding RNAs (ncRNAs) consisting of 19 to 25 nucleotides, whose function is the silencing of mRNA at the post-transcriptional level, has been highlighted. Therefore, the aim of our study was to evaluate tissue and plasma expression of miR-27a, miR-216a and HNRNPU gene. **Patients and methods:** The miRNAs miR-27a, miR-216a, and HNRNPU gene were selected from our group's previous study by the large-scale microarray analysis technique, where grade I meningiomas were compared with control arachnoid samples. In this work, the expression of these miRNAs (tumor tissue and plasma) and the HNRNPU gene were evaluated by real-time PCR in grade I, II and III meningiomas, respectively with 14, 14 and 6 patients. **Results:** The mean age was 55 years, 76.5% (26) of women and 23.5% (8) men. There was a progressive increase in the proportion of males as the tumor grade rises (grade 1 - 7.1%, grade 2 - 28.6%, and grade 3 - 50%). The proportion of convexity meningiomas accompanies tumor enlargement (grade 1 - 28.5%, grade 2 - 57.1% and grade 3 - 83.3%). And in the base tumors, most were grade 1 meningiomas (71.4%). There were a high expression of the HNRNPU gene (mean in each group - 11,735.94, 2,822.48 and 27,431.56 folds); only the difference in the means between grades 2 and 3 showed statistical significance (simple model: - 24,542.6; multiple model: -25,884.41). A ROC curve (HNRNPU gene) was performed between grade 2 and 3 meningiomas, with a sensitivity and specificity of 80%, and a value of 5679.36 folds was identified. **Conclusions:** The HNRNPU gene presents a potential molecular tool to aid in the diagnostic distinction between grade 2 and 3 meningiomas.

Keywords: Meningiomas, microRNAs, tumor progression, expression profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese do miRNA.	19
Figura 2. Heat map com clusterização não supervisionada de estudo prévio mencionado.....	22
Figura 3. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-27a no tecido tumoral entre os grupos estudados.....	31
Figura 4. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-27a no plasma entre os grupos estudados.	34
Figura 5. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-216a no tecido tumoral entre os grupos estudados.....	37
Figura 6. Representação da média dos valores da expressão do gene HNRNPU no tecido tumoral entre os grupos estudados.....	40
Figura 7. Representa a curva de sobrevida entre os 3 grupos de meningiomas.....	43
Figura 8. Curva ROC do gene HNRNPU para discriminar os grupos 2 e 3; valor utilizado de 5679,36.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para os meningiomas com baixo grau de agressividade e recorrência.....	13
Tabela 2. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para meningiomas atípico e anaplásico (maligno).....	14
Tabela 3. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para os meningiomas com alto grau de agressividade e recorrência.	15
Tabela 4. Representação geral das amostras, sendo divididas em 3 grupos distintos, respectivamente por meningiomas grau 1, 2 e 3.	28
Tabela 5. Demonstra os casos de recidivas em cada grupo de meningiomas, em 10 anos de seguimento.	28
Tabela 6. A Classificação de Simpson foi dividida em 2 grupos; 1-2 consideradas ressecção total e 3-4 subtotal.....	29
Tabela 7. A localização dos meningiomas em cada grupo, dividida entre tumores na convexidade cerebral ou na base do crânio.	29
Tabela 8. Avaliação global dos dados em relação aos 3 grupos de meningiomas; referentes às médias dos valores do PCR em tempo real dos miRs e gene.	30
Tabela 9. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR27a no tecido entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.	32
Tabela 10. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.	33
Tabela 11. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR27a no Plasma entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.....	35
Tabela 12. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.	36
Tabela 13. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR216a entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.....	38

Tabela 14. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.	39
Tabela 15. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do gene HNRNPU entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson. Apenas a diferença entre as médias (negrito) dos grupos II e III mostraram “significância” estatística.	41
Tabela 16. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.	42
Tabela 17. Representa os valores de corte do gene HNRNPU no PCR em tempo real e suas respectivas sensibilidade e especificidade para a formação de uma curva ROC.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Epidemiologia e Patologia dos Meningiomas	12
2.2 Biologia Molecular dos Meningiomas	15
2.3 Os microRNAs.....	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 PACIENTES E MÉTODOS	22
4.1 Pacientes.....	22
4.2 Métodos.....	23
4.2.1 Extração de RNA das amostras de tecido tumoral.....	23
4.2.2 Extração do RNA do plasma	24
4.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)	25
4.2.4 RQ do gene HNRNPU e dos microRNAs: miR-27a e miR-216a	25
4.2.5 Análise estatística	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Descritivos gerais	28
5.2 microRNA-27a no tecido tumoral	31
5.3 microRNA-27a no plasma	34
5.4 microRNA-216a no tecido tumoral	37
5.5 microRNA-216a no plasma	40
5.6 gene HNRNPU no tecido tumoral.....	40
5.7 Sobrevida	43
5.8 Curva ROC (<i>receiver operating characteristic</i>).....	43
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Os meningiomas são neoplasias intracranianas de crescimento lento e que se originam das células meningoteliais da aracnóide, representam mais de 33% dos tumores primários do sistema nervoso central (Ostrom et al., 2013). Em séries de autopsias, lesões assintomáticas (quiescentes) podem ser identificadas em até 2% dos pacientes (Nakasu et al., 1987).

Constituem um grande desafio no seu manejo. O tratamento mais eficaz e preconizado é a máxima ressecção cirúrgica, sem comprometer a função neurológica do paciente (Bi et al., 2016). Quando localizado em áreas eloqüentes; próximo ao tronco cerebral, nervos cranianos, área da fala, da visão por exemplo; nem sempre é viável a completa ressecção. Nos casos onde há lesão residual ou recidiva tumoral, cuja re-operação não seja possível, não há um tratamento adjuvante eficiente (Masalha et al., 2019).

Apesar do grau histológico servir como uma poderosa ferramenta no prognóstico da história natural, prediz de forma inconsistente o comportamento biológico. Pois existem meningiomas com características histológicas benignas com recorrência elevada, mesmo com ressecção agressiva. Enquanto que outros com características de alto grau apresentam resposta variável ao tratamento adjuvante, como a radioterapia (Bi et al., 2016). Assim, uma melhor compreensão da biogênese tumoral faz-se necessário.

Desta forma; uma neoplasia extremamente freqüente na rotina neurocirúrgica, com poucas opções de tratamento adjuvante e pouco compreendida em âmbito molecular culmina em um ambiente desafiador e de suma importância médica para que novas terapias surjam e possam propiciar o melhor tratamento para os pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia e Patologia dos Meningiomas

Meningiomas são os tumores primários do sistema nervoso central mais comuns, representam 36,8% (Ostrom et al., 2017) e em torno de 20% dentre todos os tumores cerebrais (Claus et.al., 2005); com uma incidência de 8,14 casos por 100.000 habitantes, sendo 11,26 em mulheres e 5,15 entre os homens (Ostrom et al., 2017).

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). Os principais parâmetros histológicos usados para graduação em benigno, atípico e anaplásico são: o índice mitótico, considerado o fator mais importante para determinar o meningioma como atípico e/ou anaplásico; 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, é utilizado como suporte adicional na graduação tumoral. Assim, altos índices de MIB-1 têm sido associados à agressividade, mau prognóstico e/ou crescimento do tumor residual (Telugu et al.; 2016).

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). Há uma taxa de recidivas entre 7 a 20% (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
Secretor	I
Linfoplasmocítico	I
Metaplástico	I

Os meningiomas atípicos, WHO grau II, constituem 15 a 20 % dos meningiomas. Após a última revisão dos critérios da OMS houve um aumento deste subtipo, devido a inclusão de invasão do sistema nervoso central como um novo item; algumas séries relatam 20 a 35% de tumores atípicos (Coppola et al., 2017). A taxa de recorrência é de aproximadamente 43% em cinco anos, após ressecção cirúrgica completa (Zaher et al., 2013). É caracterizado pela presença de pelo menos três das seguintes características: alta celularidade, tendência de crescimento das células tumorais, nucléolo proeminente, mitose, necrose, invasão cerebral e um índice mitótico de $\geq 4/10$ HPF (*High Power Factor*) (Louis et al., 2016). No grau II são reconhecidos três padrões arquiteturais; os atípicos, células claras e os 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 (Louis et al., 2007).

Tabela 2. Classificação proposta pela OMS (LOUIS et al. 2007) para meningiomas 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:
Hipercelularidade
Células pequenas com elevada razão citoplasma:núcleo
Nucléolos proeminentes
Perda do padrão de redemoinhos e/ou fascículos
Necrose geográfica
Invasão cerebral
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. Apresentam características similares a outras neoplasias malignas, como por exemplo, infiltração nos tecidos adjacentes, padrão de crescimento agressivo e baixa sobrevida em 5 anos (Masalha et al., 2019). Atinge adultos dos 2 sexos especialmente entre 50 e 65 anos (Orton et al., 2018). 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 baixa em 5 anos (14,2 – 44%) (Durant et al., 2009; Orton et al., 2018). Os principais aspectos que indicam malignidade são o 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). São subclassificados no padrão arquitetural em anaplásicos, papilares e rabdóides.

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 da OMS ainda é baseada em parâmetros morfológicos principalmente. Nos últimos anos alguns itens de biologia molecular foram incluídos, principalmente para gliomas e meduloblastomas (Louis et al., 2016). Porém, em relação aos meningiomas não houve mudança na sua classificação. Com o advento de novas ferramentas moleculares, a melhor compreensão da carcinogênese e progressão tumoral em nível molecular dos meningiomas propiciará classificações mais fidedignas e que norteiem melhor o manejo terapêutico.

2.2 Biologia Molecular dos Meningiomas

Os meningiomas constituem um dos primeiros tumores sólidos a serem correlacionados com uma alteração genética (Ruttledge et al., 1994), a deleção do braço longo (q) do cromossomo 22. Esta é a mais frequente, sendo encontrada em 40-70% dos meningiomas esporádicos (Choy et al., 2011; Mawrin et al., 2010). O gene supressor de tumor NF2, cuja localização é no cromossomo 22q12.2, é inativado quando ocorre esse evento citogenético (deleção 22q). Esta mutação ocorre em igual frequência em todos os graus histológicos, o que evidencia a participação na iniciação tumoral e não na progressão (Perry et al., 1999). A proteína Merlin é o produto do gene NF2, pertencente à família de proteínas estruturais 4.1, constitui uma proteína de membrana que se conecta com o cito-esqueleto e é responsável pelo contato celular, motilidade e inibe a PAK-1 (*p21 activated kinase*) (Kissil et al., 2003). Estudos experimentais em camundongos, onde a inativação do gene NF2 culminou no surgimento de meningioma, demonstra o papel fundamental deste evento na tumorigênese (Kalamirides et al., 2002 e 2011). O gene TIMP3

(*tissue inhibitors metalloproteins 3*), localizado no cromossomo 22q.12, tem sua função inativada através de mecanismos epigenéticos em meningiomas (He et al., 2013). Sua proteína regula a matrix de metaloproteinase e assim controle a proliferação celular, apoptose e angiogênese. A inativação epigenética do gene TIMP3 está associado à fenótipos mais agressivos de meningiomas (grau 2 e 3) (Barski et al., 2010).

Através de novas técnicas de seqüenciamento de DNA foram identificadas mutações em 4 genes que coletivamente estão presentes em 40% dos meningiomas, usualmente sem a deleção NF2 ou do cromossomo 22 (Clark et AL., 2013). Os genes são: TRAF 7 (*tumor necrosis factor [TNF] receptor associated factor 7*), KLF4 (*Kruppel-like factor 4*), AKT1 (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) e SMO (*smoothened*). A mutação no gene TRAF 7, localizado no cromossomo 16p13, acontece em 12-25% dos meningiomas e ocorre simultaneamente com a mutação no gene KLF 4 ou AKT1 e raramente com SMO (Reuss et AL., 2013). Está envolvido na indução da apoptose (Zotti et al., 2012). Aproximadamente 15% dos meningiomas grau 1 possuem a mutação no gene KLF 4, cuja alteração propicia a reprogramação de células somáticas diferenciadas à estágios de células pluripotentes (Takahashi et AL., 2007). Em 6,8% dos meningiomas há a mutação do gene AKT 1, localizado no cromossomo 14q32, que desencadeia um efeito inibidor sobre a via oncogênica PI3K / AKT / mTOR. Inibidores seletivos AKT são promissores no tratamento de vários tipos de cânceres (mama, pulmão e colon) e estão em fases 1 e 2 de testes clínicos (Bleeker et al., 2008). E por último, a mutação no gene SMO está presente em 5,5% dos meningiomas grau 1 e determina inibição da via Hedgehog, bem caracterizada em cânceres e desregulada em tumores como meduloblastoma e carcinoma basocelular. Visto que 90% dos carcinomas basocelulares apresentam essa mutação, foi aprovada em 2012 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) americano o uso do inibidor competitivo do receptor SMO (vismodegib), com efeitos promissores no controle local e metastática desta doença (Sekulic et al., 2012). Desta forma, os meningiomas que não apresentam alteração NF2 ou no cromossomo 22, tenham como iniciação tumoral alguma das 4 mutações citadas acima.

A deleção do braço curto (p) do cromossomo 1 é a segunda mais comum alteração cromossômica em meningiomas (Choy et al., 2011); tipicamente associada com tumores mais agressivos, sendo encontrada em 13-26% em meningiomas grau

1, 40-76% em grau 2 e 70-100% em grau 3 (Weber et al., 1997). Além desta associação com a progressão tumoral, correlaciona-se com uma maior recorrência (Ruiz et al., 2010). As principais regiões envolvidas são 1p33-34 e 1p36, com vários genes candidatos: TP73, CDKN2C, GADD45A e ALPL (Choy et al., 2011; Domingues et al., 2015). Os resultados não evidenciaram alterações estruturais consistentes nestes genes alvos. A inativação via metilação do gene TP73 é reportada em meningiomas (Bello et al., 2004), apesar da mutação não ser identificada. Similarmente, o gene ALPL, cujo produto é uma enzima fosfatase alcalina, tem um papel potencial como supressor de tumor, visto que a atividade fosfatase alcalina está diminuída em meningiomas com deleção 1p (Zang et al., 2010) e também pode ser um preditor de recorrência (Bouvier et al., 2005). Porém, alterações mutacionais neste gene ainda não foram relatadas na literatura (Domingues et al., 2015).

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. E propõem a complexidade cariótica como um preditor de comportamento dos meningiomas.

Outra deleção encontrada em meningiomas é a do braço curto (p) do cromossomo 9; ocorre em 5-17% em grau 1, 18-52% em grau 2 e 38-74% em grau 3 (Weber et al., 1997). E correlaciona-se com a progressão tumoral e é melhor compreendida, pois engloba 3 genes supressores de tumor : CDKN2A/p14^{ARF}, CDKN2A/p16^{INKA} e CDKN2B/p15^{ARF}. As proteínas codificadas apresentam papel importante na regulação do ciclo celular e apoptose; e o bloqueio desta via constitui um papel importante na malignização dos meningiomas (Bostrom et al., 2001).

A predominância maior destas neoplasias no sexo feminino, o aumento do crescimento na gestação e na fase lútea do ciclo menstrual e associação com câncer de mama sugerem uma participação dos hormônios sexuais na gênese dos meningiomas. 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, mostraram resultados insatisfatórios (Grunberg et al, 2001). Há um 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 status do receptor hormonal poderia ser incluído numa eventual futura classificação do grau tumoral (Pravdenkova et al, 2006).

Outro fator de risco, e bem estabelecido, para o surgimento de meningiomas é a radiação ionizante; crianças tratadas para tumores cerebrais ou *tinea capitis* com altas doses de radioterapia apresentaram maior incidência de meningiomas. No Japão, após exposição à explosões atômicas de Hiroshima e Nagasaki notou-se um aumento significativo de meningiomas na população exposta (Umansky F et al., 2008). A latência na formação de meningiomas depende da dose de irradiação e a idade do paciente. Usualmente os paciente foram submetidos à elevadas doses de irradiação na infância (Sadetzki S et al., 2005).

2.3 Os microRNAs

Os microRNAs (miRs) são RNAs não codificantes, constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, cuja função é o silenciamento do RNA mensageiro (RNAm) em nível pós-transcricional, através do seu acoplamento no RNAm complementar. Dois estudos independentes em 1993 identificaram o gene *lin-4*, em *Caenorhabditis elegans*, como um pequeno RNA não codificante (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), descrito como microRNA. Estão envolvidos na modulação de mais de 60% dos genes codificadores de proteínas no genoma humano (Friedman et al., 2009); participam de vários processos fisiológicos, como diferenciação, proliferação, apoptose e desenvolvimento celular. 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).

Sua biogênese ocorre através de um processo seqüencial, com uma fase nuclear e outra citoplasmática. 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 dupla fita de mi-RNA e a incorpora no complexo RISC (RNA-induced silencing complex), formando o mi-RNA funcional (Moller et al., 2013).

Figura 1. Biogênese do miRNA. O processamento do miRNA inicia com a transcrição do pri-miRNA pela RNA polimerase II ou III, seguido pela clivagem desta transcrição primária em um pré-miRNA por um complexo formado por Drosha e DGCR8 que permite a exportação nuclear do pré-miRNA. No citoplasma, a RNase Dicer e a proteína TRBP de ligação de RNA de cadeia dupla clivam o pré-miRNA, criando um duplex imperfeito de cerca de 22 nucleotídeos de comprimento com dois nucleotídeos 3' salientes. O Argonouta 2 (Ago2), selecionará a cadeia apropriada, levando à indução da formação do do complexo silenciador (RISC) e regulação de RNA mensageiros específicos. Adaptado de: (Tetreault and De Guire 2013).

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 (Iorio et al., 2012). O perfil da expressão de miRNAs em tumores tem levado à identificação de características correlacionadas ao diagnóstico, estágio, progressão, prognóstico e resposta ao tratamento. Desta forma, novas estratégias terapêuticas envolvendo miRNA silenciadores ou miRNA miméticos poderiam ser propostas, baseadas nas funções destes pequenos RNAs não-codificantes como oncogenes e genes supressores de tumor em neoplasias cerebrais.

Com a consolidação da importância dos microRNAs na formação e progressão tumoral, inúmeros são os trabalhos destinados a avaliar a expressão dos miRs em tumores do sistema nervoso central e tentar identificar um perfil de assinatura; o miR-21 foi encontrado elevado em glioblastomas (GBM) e associado à pior prognóstico (Teplyuk et al., 2012; Barbano et al., 2014), a baixa expressão do miR-185 foi identificada em gliomas de alto grau e avaliado como sinal de mau prognóstico (Tang et al., 2015), a baixa expressão do miR-491 em GBM em comparação com tecido cerebral normal adjacente foi correlacionada com a malignidade tumoral (Li et al., 2015).

Dentre os meningiomas existem alguns estudos que avaliaram a expressão de microRNAs. Saydam et al. encontraram baixos níveis do miR200a em meningiomas, associado com elevados índices de beta-catenina e ciclina D1, envolvidos na progressão celular e tendo como alvo direto o RNAm da beta-catenina. Assim, o miR200a atua como miR supressor de tumor multifuncional ao bloquear a via wnt/beta-catenina tão comum em cânceres. Katar et al. avaliou 50 amostras de meningiomas, através da técnica de PCR em tempo real, e os resultados mostraram aumento significativo da expressão do miR-21 com o aumento do grau histopatológico e uma redução significativa da expressão miR-107. Em outra análise, o miR224 apresentou expressão elevada em relação ao tecido cerebral normal e positivamente correlacionado com o aumento do grau tumoral em meningiomas (Wang et al., 2015). E os seus baixos índices correlacionaram com uma sobrevida prolongada e menor recorrência. Ludwig et al. analisou 55 amostras de meningiomas, com todos os graus histopatológicos, através de técnicas de microarranjos e validação com PCR em tempo real; identificou um perfil de expressão diferencial entre tumores benignos e anaplásicos. Os 4 miRs (-222, -34a, -136 e -497) mostraram-se promissores biomarcadores diferencialmente expressos entre os tumores benignos e anaplásicos, O miR-145 foi identificado reduzido em meningiomas de alto grau e sua elevada expressão em linhagens celulares de meningiomas culmina em uma baixa proliferação ou crescimento celular (Kliese et al., 2013).

O extensivo conhecimento sobre o funcionamento e comportamento dos microRNAs em meningiomas pode ser usado não somente para prever uma recorrência ou prognóstico, mas também no desenvolvimento de estratégias efetivas no tratamento destas neoplasias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Em trabalho prévio do nosso grupo pela técnica de *microarrays* foi analisado o perfil de expressão global de microRNAs e genes em meningiomas. Foram selecionados os miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U*) como candidatos moleculares diferencialmente expressos. Portanto, o objetivo deste estudo foi validar a expressão dos miR-27a, miR-216a e gene HNRNPU, assim como analisar o seu possível papel como biomarcadores e a sua correlação com a progressão tumoral dos meningiomas.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão dos microRNAs miR-27a, miR216a e gene HNRNPU em amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de meningiomas de meningiomas grau I, II e III;
- Quantificar a expressão dos microRNAs miR-27a, miR216a e gene HNRNPU em amostras de plasma de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I, II e III;

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram utilizadas amostras de tecido tumoral e de plasma coletadas de 34 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. Cada grupo contendo 14, 14 e 6 amostras respectivamente.

Em um estudo prévio desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa da Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, foi realizada uma análise global da expressão de miRNAs com a plataforma comercial *Human Microarray Kit V3* (Agilent, G4470C). A análise da expressão diferencial foi realizada em R utilizando os pacotes *limma* e *AgiMicroRna*. A normalização foi realizada utilizando a função “*rma MicroRna*” (Lopez-Romero, 2017).

Neste estudo o conjunto de 38 microRNAs e 64 genes foram identificados diferentemente expressos, aqueles com $\log_2$ da variação maior que 1, o valor de $p < 0.05$ e o valor de p ajustado pelo FDR (do inglês *False Discovery Ratio*) menor que 0.05 nos meningiomas (comparado à Aracnoide) (Figura 2).

Figura 2. Heat map com clusterização não supervisionada de estudo prévio mencionado.

Os miRNAs e seu gene selecionados foram analisados pela ferramenta *MirPath* V.3, disponível online no Diana Tools (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Esta ferramenta identifica as vias de sinalização da base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) que potencialmente são reguladas pela expressão dos miRs. Consideramos as vias significantes para os valores de p ajustado pelo FDR menor que 0.05. Assim, foram identificados na análise 2 microRNAs: miR-27a; miR-216a que apresentavam como alvos o gene HNRPU. Os alvos foram confirmados baseado no banco de dados do miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/download.php>).

A técnica de PCR em tempo real foi empregada para validação dos 2 miRs e gene identificados pelo *microarray*.

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.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de RNA das amostras de tecido tumoral

Às amostras de meningiomas congeladas de todos os grupos foram adicionados 250 µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750 µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). Os fragmentos de tecido foram homogeneizados com a utilização de um aparelho chamado Politron® e posteriormente transferidos para um tubo *ependorf* de 1,5 mL. 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 70% 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 2 μL . 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 1,71 a 1,99.

4.2.2 Extração do RNA do plasma

A extração do RNA das amostras de plasma foram realizadas 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, foi adicionado 4mL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) a 400 μL de plasma. Em seguida, o material foi deixado em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente e adicionou-se 800 μL de clorofórmio (proporção 1:5 com a quantidade de TRizol inicial), sendo misturado vigorosamente por 30 segundos.

Após deixar o material em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000g a 4°C . Ao final da centrifugação havia um sistema de 3 fases: incolor=RNA, branco=DNA, vermelho=proteína. A fase incolor foi transferida para outro falcon de 15 ml, adicionou-se 1,5 vezes o volume conseguido da fase incolor de etanol 100%, agitando-se vigorosamente a amostra. Em seguida, foi adicionado 700 μL dessa solução na coluna RNeasy MinElute Spin®, centrifugando as amostras por 15 segundos a 8000g. O líquido resultante foi descartado, sendo repetido o passo anterior com o resto da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. Posteriormente, foi adicionado 700 μL de Tampão RWT (Buffer RWT do Kit) em cada coluna, centrifugando novamente a amostra por 15 segundos a 8000g, sempre descartando o líquido

resultante. Na sequência, foram adicionados 500µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a >8000g por ao menos 15 segundos, descartando o líquido resultante. Adicionou-se 500µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também a > 8000g, desta vez por 2 minutos, descartando o líquido resultante. Centrifugou-se com o máximo da centrífuga por 1 minuto, descartando o líquido resultante. Trocou-se o coletor da coluna e adicionou-se 30µl de água RNA-free. Centrifugou-se a > 8000g por 1 minuto e transferiu-se para um Eppendorf o líquido resultante, congelando-o a -80°C imediatamente. A qualidade do RNA plasmático foi avaliada do mesmo modo do RNA tecidual.

4.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do mRNA e do miRNA foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para a síntese do cDNA do mRNA, a cada 0,5µg de RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, 0,6 µl de RNase out, completando com água DEPC o volume final de 20µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 120 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:10 em um volume final de reação de 10µL.

Já na síntese do cDNA do miRNA para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

4.2.4 RQ do gene HNRNPU e dos microRNAs: miR-27a e miR-216a

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial do gene HNRNPU e dos microRNAs miR-27^a e miR-216 a. A partir do cDNA obtido das amostras, foi 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, foram 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 gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o HPRT e TBP para o mRNA e o U6 para o miRNA) 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 de outra amostra de referência ($\Delta\Delta CT$), reflete a diferença existente entre as amostras. 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 do gene HNRPU e dos microRNAs miR-27a e miR-216a 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 ΔCT . O *software* GraphPad Prism 8.0 (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*”.

4.2.5 Análise estatística

Para se compararem as categorias das variáveis de interesse, com relação às médias dos miRNAs e do gene, foram ajustados modelos de regressões lineares, simples e múltiplos, sob uma abordagem Bayesiana, com o uso do pacote JAGS do software R 3.5.1. Foram estimadas as diferenças entre as médias e seus respectivos intervalos de credibilidade 95%. Os modelos múltiplos, quando comparadas as médias entre os graus dos tumores, consideraram sexo, idade e localização como covariáveis. No caso da comparação entre a presença de recidiva, as covariáveis consideradas foram sexo, idade, localização e Simpson. Os intervalos de credibilidade que não contém o zero indicam uma diferença “significativa” entre médias (Y. S. Su and M. Yajima. R2jags : Using R to Run “JAGS”, 2015. URL [HTTPS://CRAN.R-project.org/package=R2jags](https://CRAN.R-project.org/package=R2jags). R package version 0.5-7.).

Para a comparação das curvas de sobrevida, entre os graus do tumor, foram ajustados modelos de riscos proporcionais de Cox, simples e múltiplos. O modelo múltiplo, considerou sexo, idade, localização, simpson, recidiva e as expressões dos miRNA e genética como covariáveis. Foram estimados hazard ratios e seus intervalos de confiança 95%. O software utilizado foi o SAS 9.4.

5 RESULTADOS

5.1 Descritivos gerais

Foram avaliados 34 amostras de meningiomas, em 34 pacientes diferentes, sendo subdivididos de acordo com o grau tumoral segundo a OMS; grau 1, 2 e 3, respectivamente com 14, 14 e 6 pacientes em cada grupo (Tabela 4). A idade média foi de 55 anos nos tumores grau 1, 60,9 anos nos de grau 2 e 65,1 anos naqueles com grau 3. Em relação ao gênero houve maior prevalência no sexo feminino, principalmente nos grau 1, onde 13 foram do sexo feminino.

Tabela 4. Representação geral das amostras, sendo divididas em 3 grupos distintos, respectivamente por meningiomas grau 1, 2 e 3.

Grau	n	Masculino	Feminino	Idade
1	14	1 (7,1%)	13 (92,9%)	55 (11,2)
2	14	4 (28,6%)	10 (71,4%)	60,9 (12,1)
3	6	3 (50,0%)	3 (50,0%)	65,1 (11,2)
Total	34	8 (23,5%)	26 (76,5%)	-

Ao avaliarmos os casos em relação à recidiva, em um período de 10 anos; os tumores grau 1 apresentaram 28,57% de recidivas (4 pacientes), 69,23% nos tumores grau 2 (9 pacientes) e 66,66% naqueles com grau 3 (4 pacientes) (Tabela 5).

Tabela 5. Demonstra os casos de recidivas em cada grupo de meningiomas, em 10 anos de seguimento.

Grau	n	Recidiva	
		Sim	Não
1	14	4 (28,57%)	10 (71,43%)
2	13	9 (69,23%)	4 (30,76%)
3	6	4 (66,66%)	2 (33,33%)
Total	33	17	16

Em relação ao grau de ressecção cirúrgica de Simpson; foi dividido em 2 grupos, sendo Simpson 1 e 2 como exérese total e outro com Simpson 3 e 4 como

ressecção subtotal (Tabela 6). Nos tumores grau 1 a ressecção foi total em 57,14% dos casos; nos grau 2 houve uma exérese Simpson 1 e 2 em 64,28% dos pacientes e no grau 3 em apenas 33,33% dos casos.

Tabela 6. A Classificação de Simpson foi dividida em 2 grupos; 1-2 consideradas ressecção total e 3-4 subtotal.

Grau	n	Simpson	
		1 e 2	3 e 4
1	14	8 (57,14%)	6 (42,85%)
2	14	9 (64,28%)	5 (35,71%)
3	6	2 (33,33%)	4 (66,66%)
Total	34	19	15

A localização tumoral foi avaliada como de convexidade cerebral ou na base do crânio (Tabela 7). Dentre os tumores grau 1 houve um predileção de base do crânio, representando 71,42%; à medida que há aumento do grau tumoral, uma elevação da proporção de tumores na convexidade, sendo 57,16% nos grau 2 e 83,33% nas neoplasias grau 3.

Tabela 7. A localização dos meningiomas em cada grupo, dividida entre tumores na convexidade cerebral ou na base do crânio.

Grau	n	Localização	
		Convexidade	Base
1	14	4 (28,57%)	10 (71,42%)
2	14	8 (57,16%)	6 (42,85%)
3	6	5 (83,33%)	1 (16,66%)
Total	34	17	17

A Tabela 8 representa a avaliação global dos dados em relação aos 3 grupos de meningiomas; com os valores do PCR em tempo real dos microRNAs no tecido e plasma, e o gene HNRNPU no tecido. O gene apresentou valores elevados em comparação com os miRs; sendo 11.735,94 nos tumores grau 1, 2822,48 nos grau 2 e 27.431,56 em tumores grau 3. E os miRs 216aT e mir27aP apresentaram valores muito baixos de expressão.

Tabela 8. Avaliação global dos dados em relação aos 3 grupos de meningiomas; referentes às médias dos valores do PCR em tempo real dos miRs e gene.

Grau	Variável	n	Média	DP	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
1	miR27aT	14	1552,93	1554,7	83,71	185,1	1008,22	2790,16	4808,68
	miR27aP	14	0,01	0,01	0	0	0	0,01	0,02
	miR216aT	12	0,01	0,01	0	0	0	0,01	0,03
	HNRNPUT	14	11735,94	15057,26	893,18	1706,04	3137,83	12940,45	43975,19
2	miR27aT	14	1732,08	5697,81	34,82	115,5	211,96	304,55	21523,45
	miR27aP	14	0,04	0,09	0	0	0,01	0,03	0,33
	miR216aT	13	0,13	0,47	0	0	0	0	1,69
	HNRNPUT	14	2822,48	2629,87	233,27	1035,11	2047,14	3504,24	8662,14
3	miR27aT	6	1152,65	883,11	273,5	467,67	840,17	2083,61	2410,81
	miR27aP	6	0,04	0,08	0	0	0,01	0,01	0,2
	miR216aT	6	0,02	0,03	0	0	0,01	0,03	0,08
	HNRNPUT	6	27431,56	48194,62	2190,47	5679,36	7845,2	15633,8	125395,31

5.2 microRNA-27a no tecido tumoral

A média dos valores da expressão do miR27a no tecido tumoral foi avaliada em cada grupo; sendo 1552,93, 1732,08 e 1152,65 folds nos grau 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 3).

Não foram encontradas diferenças entre as médias do miR27a. Os valores absolutos do miR27a no tecido tumoral de cada amostra, obtidos pelo PCR em tempo real, estão expostos na tabela 10.

Figura 3. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-27a no tecido tumoral entre os grupos estudados.

Tabela 9. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR27a no tecido entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.

miR27aT							
Variável independente	Comparações	Modelo simples			Modelo múltiplo		
		Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%	Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%
Grau do tumor	I - II	-235,3	-3284,7	2650,1	50,6	-3142	3324
	I - III	359,4	-3499,8	4051,2	98,94	-3339	5265
	II - III	594,7	-3262,9	4417,3	93,88	-2971	4810
Recidiva	N - S	-446	-3209,05	2362	-99,5	-443,62	259,36
Sexo	M - F	-2080	-5016	773	*	*	*
Localização	B - C	-746,4	-3380	1866	*	*	*
Simpson	3/4 - 1/2	1645	-1002,31	4268	*	*	*

Tabela 10. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.

Grupo	Amostra	Registro	miR27a - T
grau I	SNC 339	0725876I	83,70770246
	SNC 354	0829898G	300,0096406
	SNC 370	0789276J	2973,725574
	SNC 374	0835645C	1486,679985
	SNC 379	0818935B	185,0993953
	SNC 383	0840013B	792,2713207
	SNC 384	0737882E	1224,163196
	SNC 387	0783151K	149,977455
	SNC 409	0821689B	2790,158055
	SNC 412	0841359K	4808,684708
	SNC 413	0793720B	2220,06151
	SNC 433	0856668J	3952,254149
	SNC 449	0859704B	604,1453152
	SNC 466	0205370E	170,1145376
grau II	SNC 332	0824255E	521,1411055
	SNC 348	0830279I	263,5037647
	SNC 372	0023765J	21523,45149
	SNC 403	0845219G	123,6276075
	SNC 562	0897696G	341,631083
	SNC 613	0912711J	201,7414706
	SNC 622	0915171A	222,1807213
	SNC 644	0917606I	115,5018933
	SNC 668	0009998E	282,5103365
	SNC 670	0008418J	74,10659909
	SNC 714	0743922K	34,81782248
	SNC 829	0966924A	84,67013702
	SNC 838	1020067J	155,6336766
	SNC 850	1026814J	304,5506248
grau III	SNC 362	0794095J	918,8007881
	SNC 522	0812935J	2083,609705
	SNC 707	0905676D	467,669048
	SNC 715	0008418J	2410,811784
	SNC 767	0957657B	273,495005
	SNC 1227	1217988A	761,530046

5.3 microRNA-27a no plasma

A média dos valores da expressão do miR27a no tecido tumoral foi avaliada em cada grupo; sendo 0,04, 0,04 e 0,01 fold nos grau 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 4).

Não foram encontradas diferenças entres as médias do miR27a no plasma (Tabela 11). Os valores absolutos do PCR em tempo real de cada amostra no plasma estão na Tabela 12.

Figura 4. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-27a no plasma entre os grupos estudados.

Tabela 11. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR27a no Plasma entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.

miR27aP							
Variável independente	Comparações	Modelo simples			Modelo múltiplo		
		Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%	Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%
Grau do tumor	I - II	-0,039	-0,091	0,0135	-0,0292	-0,08507	0,03111
	I - III	-0,03	-0,098	0,037	-0,01296	-0,09165	0,07246
	II - III	0,0087	-0,058	0,075	0,01624	-0,00592	0,08639
Recidiva	N - S	-0,003091	-0,05386	0,04606	0,02407	-0,0353	0,08554
Sexo	M - F	-0,009064	-0,06641	0,04967	*	*	*
Localização	B - C	0,03824	-0,0087	0,008233	*	*	*
Simpson	3/4 - 1/2	-0,02457	-0,07184	0,02199	*	*	*

Tabela 12. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.

Grupo	Amostra	Registro	miR27a - P
grau I	SNC 339	0725876I	0,000671218
	SNC 354	0829898G	0,000394645
	SNC 370	0789276J	0,006167665
	SNC 374	0835645C	0,000534773
	SNC 379	0818935B	0,002035092
	SNC 383	0840013B	0,001167971
	SNC 384	0737882E	0,018827791
	SNC 387	0783151K	0,009482641
	SNC 409	0821689B	0,000418016
	SNC 412	0841359K	2,6508E-06
	SNC 413	0793720B	0,009220515
	SNC 433	0856668J	0,013741141
	SNC 449	0859704B	0,018091875
	SNC 466	0205370E	0,00117929
grau II	SNC 332	0824255E	0,001287989
	SNC 348	0830279I	0,000150711
	SNC 372	0023765J	0,004080731
	SNC 403	0845219G	0,003590023
	SNC 562	0897696G	0,025098571
	SNC 613	0912711J	0,012545321
	SNC 622	0915171A	0,325595779
	SNC 644	0917606I	0,040669029
	SNC 668	0009998E	0,002325254
	SNC 670	0008418J	0,166039037
	SNC 714	0743922K	0,015588766
	SNC 829	0966924A	0,021531134
	SNC 838	1020067J	0,001150109
	SNC 850	1026814J	0,006884878
grau III	SNC 362	0794095J	8,1175E-05
	SNC 522	0812935J	0,009284608
	SNC 707	0905676D	0,010202253
	SNC 715	0008418J	0,002408129
	SNC 767	0957657B	0,000437005
	SNC 1227	1217988A	0,198542341

5.4 microRNA-216a no tecido tumoral

A média dos valores da expressão do miR216a no tecido tumoral foi avaliada em cada grupo; sendo 0,01, 0,13 e 0,02 fold nos grau 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 5).

Não foram encontradas diferenças significativas entre as medias do miR216a no tecido tumoral (Tabela 13). Os valores absolutos do PCR em tempo real de cada amostra no plasma estão na Tabela 14.

Figura 5. Representação da média dos valores da expressão do microRNA-216a no tecido tumoral entre os grupos estudados.

Tabela 13. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do miR216a entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson.

miR216aT							
Variável independente	Comparações	Modelo simples			Modelo múltiplo		
		Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%	Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%
Grau do tumor	I - II	-0,11	-0,32	0,11	-0,09596	-0,3211	0,1462
	I - III	-0,01	-0,27	0,25	0,0027	-0,2903	0,29
	II - III	0,1	-0,17	0,38	0,09866	-0,1863	0,387
Recidiva	N - S	-0,1001	-0,3101	0,1188	-0,1254	-0,359	0,1392
Sexo	M - F	-0,1767	-0,4108	0,4803	*	*	*
Localização	B - C	-0,09403	-0,2979	0,103	*	*	*
Simpson	3/4 - 1/2	0,07968	-0,1256	0,2895	*	*	*

Tabela 14. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.

Grupo	Amostra	Registro	miR216 - T
grau I	SNC 339	0725876I	9,85792E-05
	SNC 354	0829898G	0,001341024
	SNC 370	0789276J	0,008006215
	SNC 374	0835645C	0,015200492
	SNC 379	0818935B	0,001558118
	SNC 383	0840013B	
	SNC 384	0737882E	0,000338517
	SNC 387	0783151K	0,000290986
	SNC 409	0821689B	0,003522639
	SNC 412	0841359K	0,028705509
	SNC 413	0793720B	
	SNC 433	0856668J	0,008853533
	SNC 449	0859704B	0,000296895
	SNC 466	0205370E	0,000250896
grau II	SNC 332	0824255E	0,003095862
	SNC 348	0830279I	0,000878432
	SNC 372	0023765J	1,686463554
	SNC 403	0845219G	0,000106837
	SNC 562	0897696G	0,000448503
	SNC 613	0912711J	2,08219E-05
	SNC 622	0915171A	0,000731767
	SNC 644	0917606I	0,001064213
	SNC 668	0009998E	
	SNC 670	0008418J	8,91734E-05
	SNC 714	0743922K	0,000370438
	SNC 829	0966924A	3,29121E-05
	SNC 838	1020067J	0,00026221
	SNC 850	1026814J	0,00111781
grau III	SNC 362	0794095J	0,001846717
	SNC 522	0812935J	0,014560997
	SNC 707	0905676D	0,034333297
	SNC 715	0008418J	0,081916202
	SNC 767	0957657B	0,003176049
	SNC 1227	1217988A	0,012119122

5.5 microRNA-216a no plasma

Não houve amplificação nas amostras para a avaliação do miR216a no plasma.

5.6 gene HNRNPU no tecido tumoral

A média dos valores da expressão do gene HNRNPU foi avaliada em cada grupo; sendo 11.735,94, 2.822,48 e 27.431,56 folds nos graus 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 6).

Os resultados do ajuste dos modelos de regressões lineares e múltiplos no gene HNRNPU estão representados na Tabela 15. Apenas a diferença das médias entre os graus 2 e 3 apresentaram “significância”, pois os intervalos de credibilidade (ICr95%) não continham o zero, tanto no modelo simples (-24.542,6) quanto no múltiplo (-25.884,41). Os valores absolutos do PCR em tempo real de cada amostra não estão na Tabela 16.

Figura 6. Representação da média dos valores da expressão do gene HNRNPU no tecido tumoral entre os grupos estudados.

Tabela 15. Estão os resultados do ajuste do modelo de regressão que compara as médias da expressão do gene HNRNPU entre os graus tumorais, da recidiva, sexo, localização e Simpson. Apenas a diferença entre as médias (negrito) dos grupos II e III mostraram “significância” estatística.

HNRNPU							
Variável independente	Comparações	Modelo simples			Modelo múltiplo		
		Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%	Diferença entre médias	LI ICr95%	LS ICr95%
Grau do tumor	I - II	8810,4	-7639,9	25446,1	8848,91	-9686,1	27499,3
	I - III	-15728,1	-35875,3	5427,03	-17035,55	-42301	8655,01
	II-III	-24542,6	-45476,3	-3028,99	-25884,41	-48490,9	-3385,36
Recidiva	N - S	-602,2	-17101,1	16120	-1690	-24900	20690
Sexo	M - F	7687,025	-10875,1	26300	*	*	*
Localização	B - C	9263,9	-6438,9	24090	*	*	*
Simpson	3/4 - 1/2	-2651,1	-18713,9	13417,9	*	*	*

Tabela 16. Representa os registros de todas as amostras tumorais, subdivididas pelo seu grau tumoral e com os valores absolutos obtidos pela técnica de PCR em tempo real.

Grupo	Amostra	Registro	HNRNPU - T
grau I	SNC 339	0725876I	893,1815965
	SNC 354	0829898G	1293,502073
	SNC 370	0789276J	11789,77469
	SNC 374	0835645C	2552,713266
	SNC 379	0818935B	1635,403878
	SNC 383	0840013B	12940,45082
	SNC 384	0737882E	3464,754202
	SNC 387	0783151K	1706,039029
	SNC 409	0821689B	2810,913511
	SNC 412	0841359K	36985,0591
	SNC 413	0793720B	43975,19141
	SNC 433	0856668J	34104,09224
	SNC 449	0859704B	8105,732814
	SNC 466	0205370E	2046,331441
grau II	SNC 332	0824255E	2557,3292
	SNC 348	0830279I	3504,238316
	SNC 372	0023765J	274,8275188
	SNC 403	0845219G	1972,562286
	SNC 562	0897696G	233,2694083
	SNC 613	0912711J	4675,013742
	SNC 622	0915171A	746,7404944
	SNC 644	0917606I	2802,188357
	SNC 668	0009998E	7931,000312
	SNC 670	0008418J	1906,452816
	SNC 714	0743922K	1035,110258
	SNC 829	0966924A	1092,091021
	SNC 838	1020067J	2121,721625
	SNC 850	1026814J	8662,142748
grau III	SNC 362	0794095J	5679,360577
	SNC 522	0812935J	15633,79794
	SNC 707	0905676D	2190,473164
	SNC 715	0008418J	125395,3086
	SNC 767	0957657B	7882,069885
	SNC 1227	1217988A	7808,336351

5.7 Sobrevida

Por meio do ajuste de um modelo de risco proporcionais de Cox (Figura 7) foi comparada a sobrevida dos pacientes de acordo com o grau tumoral. Aqueles com grau I obtiveram maior sobrevida; enquanto que os graus 2 [*hazard ratio* = 7,49 (IC 95%: 1,62; 33,96)] e 3 [*hazard ratio* = 4,83 (IC 95%: 0,80; 29,19)] tiveram menos tempo de sobrevivência em média.

Figura 7. Representa a curva de sobrevida entre os 3 grupos de meningiomas.

5.8 Curva ROC (*receiver operating characteristic*)

Na tentativa de encontrar um ponto de corte entre os valores do gene HNRNPU que pudesse discriminar os grupos 2 e 3, com boa sensibilidade e especificidade, foi construída uma curva ROC. Na Figura 8 está a representação desta curva e na Tabela 17 os valores da especificidade e sensibilidade utilizados com seus respectivos valores do gene no PCR. Em negrito está o valor sugerido com adequadas sensibilidade e especificidade do teste.

Figura 8. Curva ROC do gene HNRNPUT para discriminar os grupos 2 e 3; valor utilizado de 5679,36.

Tabela 17. Representa os valores de corte do gene HNRNPUT no PCR em tempo real e suas respectivas sensibilidade e especificidade para a formação de uma curva ROC.

HNRNPUT	especificidade	sensibilidade
233,27	0,00	1,00
274,83	0,07	1,00
746,74	0,13	1,00
1035,11	0,20	1,00
1092,09	0,27	1,00
1906,45	0,33	1,00
1972,56	0,40	1,00
2121,72	0,47	1,00
2190,47	0,53	1,00
2557,33	0,53	0,80
2802,19	0,60	0,80
3504,24	0,67	0,80
4675,01	0,73	0,80
5679,36	0,80	0,80
7808,34	0,80	0,60
7882,07	0,87	0,60
7931,00	0,87	0,40
8662,14	0,93	0,40
15633,80	1,00	0,40
125395,31	1,00	0,20

6 DISCUSSÃO

Os meningiomas apresentam maior prevalência em mulheres (Ostrom et al., 2017); na nossa casuística 76,5% dos casos foram do sexo feminino. Ao analisar o gênero em relação ao grau tumoral; temos que 92,9% dos casos são mulheres nos grau 1 e há um aumento progressivo da proporção do sexo masculino à medida que o grau tumoral se eleva, sendo 28,6% em grau 2 e 50% em grau 3. Na literatura há consenso que tumores malignos (grau 2 e 3) mostram uma predominância maior entre homens (Jaaskelainen et al., 1986; Matsuno et al., 1996; Perry et al., 1999). Outro fator importante em relação ao grau tumoral é a sua localização, que pode estar associado a um perfil molecular (Bi et al., 2016). Mutações SMO ou AKT 1 / TRAF 7 são mais frequentemente observadas em tumores da base craniana (Clark et al., 2013). Neoplasias da convexidade, especificamente da linha média cerebral (parassagital), são mais agressivas e com maior proporção de casos atípicos e anaplásicos (Maier et al., 1992; Perry et al., 2004). Achado semelhante foi encontrado no nosso estudo, visto que a proporção de meningiomas de convexidade se eleva à medida que o grau tumoral aumenta (grau 1 – 28,5%, grau 2 – 57,1% e grau 3 – 83,3%). E nos tumores de base, a maioria foi de meningiomas grau 1 (71,4%). Porém, tais achados são apenas observações, devido o tamanho amostral pequeno.

Com o advento de novos conhecimentos moleculares houve uma melhor compreensão da formação e progressão em meningiomas. Porém, os 2 parâmetros mais importantes para mensurar recidiva e sobrevida nestes pacientes ainda são o grau histopatológico e o Simpson (Masalha et al., 2019). Entre os casos estudados, a recidiva foi encontrada em maior proporção nos meningiomas de alto grau (grau 1 – 28,5%, grau 2 - 69,2% e grau 3 – 66,6%), compatível com o encontrado na literatura (Masalha et al., 2019; Bi et al., 2016). A exérese total (Simpson 1-2) foi alcançada em apenas 33,3% dos pacientes grau 3, contribuindo para elevar o índice de recidiva neste grupo de pacientes. Dentre os meningiomas grau 2, mesmo com uma exérese melhor (Simpson 1 e 2 – 64,2%; Tabela 6), houve um índice de recidiva mais elevado (69,2%). Estes achados fortalecem o ideal de melhor associação histopatológica e molecular destas neoplasia, com o intuito de caracterizá-las melhor e propiciar o melhor tratamento.

A sobrevida dos pacientes de acordo com o grau tumoral, meningiomas com grau I obtiveram maior sobrevida; enquanto que os graus 2 [*hazard ratio* = 7,49 (IC 95%: 1,62; 33,96)] e 3 [*hazard ratio* = 4,83 (IC 95%: 0,80; 29,19)] tiveram menos tempo de sobrevivência em média. Os tumores intermediários (grau 2) tiveram piores resultados que os grau 3, mas devido a pequena amostra de casos anaplásicos, nenhuma conclusão pode ser efetuada.

O miR27a está localizado no cromossomo 19 e tem sido correlacionado com uma variedade de cânceres (glioma, mama, cervical, próstata e gástrico) (Liu et al., 2009). Yang et al. avaliaram o perfil de expressão do miR27a em gliomas com o objetivo de delinear uma assinatura molecular e definir vias de atuação. Encontrou uma elevada expressão deste miR nas células de gliomas, *in vivo* e *in vitro*. Por meio de ferramentas de bio-informática identificou 33 possíveis genes alvos e um papel importante na formação e progressão dos gliomas ao regular as vias de apoptose, p53, TGF-beta e outras. Li et al. investigaram o papel do miR27a na invasão e proliferação celular em linhagens de glioblastomas *in vitro*, além de estudar a relação de expressão deste microRNA e o gene BTG2 com modelos de xenoenxerto em ratos. A expressão elevada do miR27a determinou maior crescimento e migração das células de glioblastoma e regula negativamente o gene BTG-2. Em câncer de mama, sua expressão foi encontrada elevada, participa da migração celular ao controlar a expressão do gene FBXW 7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*) e assim tem um papel importante no controle de metástases (Jiang et al., 2018). O miR27a atua principalmente na modulação do sinal apoptótico e TGF-beta, como um oncomiR e promovendo o crescimento tumoral (Yang et al., 2012). Nas amostras estudadas em nosso trabalho, as médias dos valores do miR27a no tecido foram 1552,93, 1732,08 e 1152,65 folds nos graus 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 3). Os valores no plasma foram muito baixos: 0,04, 0,04 e 0,01 fold (Figura 4). Após análise estatística não foi encontrada diferença “significativa” entre as amostras. Porém, níveis elevados de expressão foram encontrados nos 3 grupos, podendo estar correlacionado com a tumorigênese dos meningiomas e estimular futuros estudos com uma abordagem amostral maior.

O miR216a atua como um supressor de tumor e sua expressão está alterada em inúmeros tipos neoplásicos, como câncer de mama, pulmão, gliomas e pâncreas (Zhang et al, 2017; Xie et al., 2019; Sun et al., 2018). Zhang et al. identificou uma redução na expressão do miR216a em amostra tecidual e linhagem celular de

gliomas. Após a transfecção do miR216a em linhagem celular de gliomas, a expressão elevada deste miR inibiu a proliferação, migração e invasão das células. Para investigar o mecanismo de regulação deste microRNA, ferramentas de bioinformática foram utilizadas e determinaram que o potencial gene alvo seria o LGR5 (*leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*), um oncogene que é um importante regulador da via Wnt/beta-catenina. As células de glioma com elevada expressão do miR216a mostraram baixo nível do RNAm e proteína do gene LGR5, o que sugere este gene como possível alvo do miR216a. Xie et al. avaliaram amostras teciduais de câncer de mama e identificaram perfil de expressão reduzido do miR216a em comparação com tecido mamário normal. E, em culturas de células tumorais de mama (MCF 7), a elevada expressão do miR216a reduz a migração e a proliferação celular. Houve um aumento atividade caspase 3/8 e indução da apoptose. Observou-se que esta expressão aumentada do miR216a promove a supressão da proteína Wnt e beta-catenina. Assim, os resultados deste estudo indicaram que o miR216a reduz o crescimento do câncer de mama por meio da regulação da via Wnt/beta-catenina. Sun et al. mostraram um baixo perfil de expressão do miR216a em câncer de pulmão de pequenas células. E em experimentos *in vivo* e *in vitro* evidenciaram que a expressão aumentada deste miR determina menor crescimento e invasão celular. Por meio de análise de bioinformática e arranjo de luciferase, o gene anti-apoptótico Bcl-2 foi determinado como possível alvo do miR216a. No presente estudo, a média dos valores de expressão do miR216a no tecido tumoral foi de 0,01, 0,13 e 0,02 fold nos grau 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 5). No plasma não houve amplificação nas amostras. Com estes valores não conseguimos determinar se há algum papel do miR216a na formação ou progressão dos meningiomas.

O gene HNRNPU, localizado no braço longo (q) do cromossomo 1, codifica uma proteína nuclear ribonucleica com papel fundamental no metabolismo dos ácidos nucléicos ao se ligar no pré-RNAm e participar no transporte e acoplamento desta molécula (Carvill et al., 2013; Geuens et al., 2016). A microdeleção deste gene foi identificada como responsável por epilepsia de difícil controle e atraso grave no desenvolvimento, como demonstraram Bramswig et al. na série de casos relatada. Por apresentar um papel crucial no metabolismo do RNAm, existe enorme interesse na investigação de possível papel na formação de tumores. Porém, poucos são os relatos de uma associação do gene HNRNPU e câncer. Sutaria et al. avaliaram 47 amostras de

tecido tumoral de adenocarcinoma ductal de pâncreas e tecido adjacente normal, por meio de micro-arranjos, e identificaram 126 genes com expressão elevada e 260 reduzida. O gene HNRNPU apresentou uma das mais desreguladas alterações (4 vezes aumentado) e foi associado a um pior prognóstico nestes pacientes. Em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático (Patu-T e PL45) realizaram o bloqueio da expressão deste gene e uma menor proliferação e invasão celular foi identificada; evidenciado a importância deste gene como oncogene nos tumores de pâncreas. Em outra análise por micro-arranjos em adenocarcinoma de pâncreas, Shen et al. identificaram o gene HNRNPU com um papel importante na progressão tumoral e como possível biomarcador no diagnóstico precoce desta neoplasia. No nosso estudo foi encontrada uma expressão elevada deste gene, a média dos valores da expressão em cada grupo foi de 11.735,94, 2.822,48 e 27.431,56 folds nos graus 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 6). Após avaliação estatística apenas a diferença das médias entre os graus 2 e 3 apresentaram “significância” (modelo simples: -24.542,6; modelo múltiplo: -25.884,41). Na tentativa de caracterizar um ponto de corte confiável para distinguir os meningiomas graus 2 e 3 através da análise de expressão do gene HNRNPU, foi realizada uma curva ROC. Com uma sensibilidade e especificidade de 80% foi possível alcançar o valor 5679,36 folds. Assim, uma ferramenta molecular para diferenciação dos meningiomas graus 2 e 3 pode ser elaborada e utilizar estes dados como referência.

7 CONCLUSÕES

- O tamanho amostral foi restrito e não houve ‘significância’ estatística entre os valores de expressão dos microRNAs.
- O gene HNRNPU apresentou-se hiperexpressos nos meningiomas grau I, II e III. Houve “significância’ estatística entre a diferença das médias nos grau 2 e 3.
- Uma curva *ROC* foi construída e um valor de referência (5679,36) identificado para diferenciar meningiomas grau 2 e 3.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acunzo M, Romano G, Wernicke D. MicroRNA and cancer. *Adv Biol Regul.* 2015 Jan;57C:1-9

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.

Bramswig NC, Lüdecke HJ, Hamdan FF, Altmüller J, Beleggia F, Elcioglu NH, Freyer C, Gerkes EH, Demirkol YK, Knupp KG, Kuechler A, Li Y, Lowenstein DH, Michaud JL, Park K, Stegmann APA, Veenstra-Knol HE, Wieland T, Wollnik B, Engels H, Strom TM, Kleefstra T, Wiczorek D. Heterozygous HNRNPU variants cause early onset epilepsy and severe intellectual disability. *Hum Genet.* 2017 Jul;136(7):821-834.

Barski D, Wolter M, Reifenberger G and Riemenschneider. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* 2010; 20:623-631.

Barbano R, O. Palumbo, B. Pasculli, M. Galasso, S. Volinia, V. D'Angelo, N. Icolaro, M. Coco, L. Dimitri, P. Graziano, M. Copetti, V.M. Valori, E. Maiello, M. Carella, V.M. Fazio, P. Parrella, A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas, *PLoS One* 9 (2014) e108950.

Bello MJ, Aminosos C, Lopez-Marin I, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, Lomas J, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Sarasa JL and Rey JA. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol.* 2004; 108:413-421.

Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008;27(42): 5648–50.

Bi WL, Mei Y, Agarwalla PK, Beroukhi R, Dunn IF. Genomic and Epigenomic Landscape in Meningioma. *Neurosurg Clin N AM.* 2016 Apr; 27(2): 167-79. doi : 10.1016/j.nec.2015.11.009

Bi WL, Zhang M, Wu WW, Mei Y, Dunn IF. Meningioma Genomics: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Surg.* 2016 Jul 6;3:40.

Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP and Reifenberger G. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol.* 2001; 159:661-669.

Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P and Figarella-Branger D. Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124:252-258.

Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, Khan A, Dorschner MO, Weaver M, Calvert S, Malone S, Wallace G, Stanley T, Bye AM, Bleasel A, Howell KB, Kivity S, Mackay MT, Rodriguez-Casero V, Webster R, Korczyn A, Afawi Z, Zelnick N, Lerman-Sagie T, Lev D, Møller RS, Gill D, Andrade DM, Freeman JL, Sadleir LG, Shendure J, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):825-30.

Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci*. 17, 1712.

Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 2013; 339(6123):1077–80.

Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M, Black PM. Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery* 2005;57(6):1088–1095, discussion 1088–1095

Choy W, Kim W, Nagasawa D, Stramotas S, Yew A, Gopen Q, Parsa AT and Yang I. The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg Focus*. 2011; 30:E6.

Coppola F, Campbell JI, Herrero JM, Volpe E, Cersosimo T. Análisis comparativo de meningiomas cerebrales grado I vs grado II en una serie retrospectiva de 63 pacientes operados. *Surg Neurol Int*. 2017;8:S37-S42 [in Spanish].

Domingues P, González-Tablas M, Otero A, Pascual D, Ruiz L, Miranda D, Sousa P, Gonçalves JM, Lopes MC, Orfao A and Tabernero MD. Genetic/molecular alterations of meningiomas and the signaling pathways targeted. *Oncotarget*, 2015; Vol. 6, No. 13

Durand A, Labrousse F, Jouvett A, et al. WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J Neurooncol*. 2009;95:367-375.

Friedman, R.C.; Farh, K.K.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009, 19, 92–105

Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*. 2016 Aug;135(8):851-67.

Grunberg SM; Rankin C; Townsend J; Ahmadi J; Feun L; Fredericks R; Russel C; Kabbinavar 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 and Mack WJ. A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus*. 2013; 35:E5.

Iorio, M.V.; Croce, C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med*. 2012, 4, 143–159

Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A (1986). Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 25: 233-242.

Jiang G, Shi W, Fang H, Zhang X. miR-27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7-dependent manner. *Mol Med Rep*. 2018 Dec;18(6):5417-5426.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5), 843. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y

Li, X., Liu, Y., Granberg, K.J., Wang, Q., Moore, L.M., Ji, P., Gumin, J., Sulman, E.P., Calin, G.A., Haapasalo, H., et al., 2015. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene* 34 (13), 1619–1628.

Li WQ, Yu HY, Zhong NZ, Hou LJ, Li YM, He J, Liu HM, Xia CY, Lu YC. miR-27^a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2. *Int J Oncol*. 2015 Apr;46(4):1601-8.

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 DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20.

Liu T, Tang H, Lang Y, Liu M and Li X: MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett* 273: 233-242, 2009.

Ludwig N, Kim YJ, Mueller SC, Backes C, Werner TV, Galata V, Sartorius E, Bohle RM, Keller A, Meese E. Posttranscriptional deregulation of signaling pathways in meningioma subtypes by differentialexpression of miRNAs. *Neuro Oncol*. 2015 Sep;17(9):1250-60.

Kalamarides M, Niwa-Kawakita M, Leblois H, et al. Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is ratelimiting for meningioma development in the mouse. *Genes Dev* 2002;16(9):1060–5.

Kalamarides M, Stemmer-Rachamimov AO, Niwa-Kawakita M, et al. Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* 2011;30(20):2333–44.

Katar S, Baran O, Evran S, Cevik S, Akkaya E, Baran G, Antar V, Hanimoglu H, Kaynar MY. Expression of miRNA-21, miRNA-107, miRNA-137 and miRNA-29b in meningioma. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017 May;156:66-70.

Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, Andrae N, Wilisch-Neumann A, Kirches E, Riek-Burchardt M, Angenstein F, Reifenberger G, Riemenschneider MJ, Meese E, Panayotova-Dimitrova D, Gutmann DH, Mawrin C. MiRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells, *Oncogene* 32 (39) (2013) 4712–4720.

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.

Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H (1992). Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 77:616-623.

Masalha W, Heiland DH, Delev D, Fennell JT, Franco P, Scheiwe C, Mercas BI, Mader I, Schnell O, Grauvogel J. Survival and Prognostic Predictors of Anaplastic Meningiomas. *World Neurosurg* 2019 jul 26.

Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T, Nagashima T, Ide T, Asai A, Matsuura R, Utsunomiya H, Kirino T (1996). Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. *Acta Neuropathol* 91: 504-510.

Mawrin C and Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*. 2010;99:379-391.

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

Nakasu S, Hirana A, Shimura T, et al. Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg Neurol*. 1987;27:319-322

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report : primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States im 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013; 15 (suppl 2): ii1-ii56.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS.

CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol*. 2017 Nov 6;19 (suppl_5):v1-v88.

Orton A, Frandsen J, Jensen R, Shrieve D, Suneja G. Anaplastic meningioma: an analysis of the national cancer database from 2004 to 2012. *J Neurosurg*. 2018;128:1684-1689.

Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, et al. Malignancy” in meningiomas: a clinicopathologic studyof 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999;85(9):2046–56.

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.

Reuss D E, Piro RM, Jones DT, et al. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol* 2013; 125(3):351–8.

Ruiz J, Martinez A, Hernandez S, Zimman H, Ferrer M, Fernandez C, Saez M, Lopez-Asenjo J A and Sanz-Ortega J. Clinicopathological variables, immunophenotype, chromosome 1p36 loss and tumour recurrence of 247 meningiomas grade I and II. *Histol Histopathol*. 2010; 25:341-349.

Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the maior-itv of sporadic meningiomas. *Nat Genet* (1994) 6(2) : 180-4.

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.

Saydam O, Shen Y, Würdinger T, et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2009;29(21):5923–5940.

Shen Q, Yu M, Jia JK, Li WX, Tian YW, Xue HZ. Possible Molecular Markers for the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Med Sci Monit*. 2018 Apr 19;24:2368-2376.

Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012;366(23):2171–9.

Sutaria DS, Jiang J, Azevedo-Pouly ACP, Lee EJ, Lerner MR, Brackett DJ, Vandesompele J, Mestdagh P, Schmittgen TD. Expression Profiling Identifies the Noncoding Processed Transcript of HNRNPU with Proliferative Properties in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Noncoding RNA*. 2017 Aug 25;3(3). pii: E24.

Sun Y, Hu B, Wang Y, Li Z, Wu J, Yang Y, Wei Y, Peng X, Chen H, Chen R, Jiang P, Fang S, Yu Z, Guo L. miR216a-5p inhibits malignant progression in small cell lung cancer : involvement of the Bcl-2 family proteins. *Câncer Manag Res*. 2018 Oct 18; 10:4735-4745

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5): 861–72.

Tang H, Liu Q, Liu X, Ye F, Xie X, Wu M. Plasma miR-185 as a predictive biomarker for prognosis of malignant glioma, *J. Cancer Res. Ther.* 11 (2015) 630–634.

Telugu RB, Chowhan AK, Rukmangadha N, Patnayak R, Phaneendra BV, Prasad BC, Reddy MK. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of Meningiomas with Reference to Proliferative Markers p53 and Ki-67. *J Clin Diagn Res*. 2016 Jan;10(1):EC15-9.

Teplyuk NM, B. Mollenhauer, G. Gabriely, A. Giese, E. Kim, M. Smolsky, R.Y. Kim, M.G. Saria, S. Pastorino, S. Kesari, A.M. Krichevsky, MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity, *Neuro Oncol*. 14 (2012) 689–700.

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

Wang M, Deng X, Ying Q, Jin T, Li M, Liang C. MicroRNA-224 targets ERG2 and contributes to malignant progressions of meningioma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May 1;460(2):354-61.

Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G and Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:14719-14724.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5), 855–862. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4

Xie Q, Wang S, Zhao Y, Zhang Z, Qin C, Yang X. MicroRNA216a suppresses the proliferation and migration of human breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Rep*. 2019 May;41(5):2647-2656.

Yang S, Wang K, Qian C, et al: A predicted miR-27a-mediated network identifies a signature of glioma. *Oncol Rep* 28: 1249-1256, 2012.

Zaher A, Mattar MA, Zayed DH, Ellatif RA, Ashamallah SA. Atypical meningioma: a study of prognostic factors. *World Neurosurg*. 2013;80:549-553.

Zang KD. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet*. 2001; 93:207-220.

Zhang D, Zhao L, Shen Q, et al. Down-regulation of KIAA1199/CEMIP by miR-216a suppresses tumor invasion and metastasis in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017;140(10):2298–2309.

Zotti T, Vito P, Stilo R. The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol*. 2012;227(3):1280–1284.