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

IRINEU RENZI JUNIOR

**“Expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b e
dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL, BTC em
meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q”**

**Ribeirão Preto
2015**

IRINEU RENZI JUNIOR

**“Expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b e
dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL, BTC em
meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q”.**

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

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Renzi Junior, Irineu

Expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b e dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL, BTC em meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q.

50 p. : 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. Cromossomo 22q 3. microRNAs 4. Expressão gênica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Irineu Renzi Junior

Expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b e dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL, BTC em meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q.

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: _____

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original"

Albert Einstein

Agradecimentos

À minha esposa Leise, pelo amor, paciência, companheirismo e incentivo.

Aos meus pais, por terem aberto as portas que me trouxeram até aqui.

À minha irmã Adriana, pelo aconselhamento técnico e apoio logístico.

Aos técnicos, pós-graduandos, professores e toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da FMRP-USP, pela cooperação e amizade.

RESUMO

RENZI JR, I. Expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b e dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL, BTC em meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q. 2015. 50f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introdução: Dentre os tumores primários do SNC, o meningioma é o tipo mais frequentemente diagnosticado, sendo responsável por 35,5% dos casos, considerando-se todas as faixas etárias. A gênese dos meningiomas é um processo complexo que envolve o acúmulo de alterações genéticas, sendo o evento mais conhecido a deleção no braço longo do cromossomo 22. O entendimento da iniciação e do crescimento dos meningiomas em nível molecular pode ajudar a definir novos alvos de terapia e, neste contexto, tem se destacado na última década o estudo dos microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificadores que regulam a expressão gênica e têm um papel crucial no desenvolvimento de vários tipos de câncer. O reconhecimento do papel destes RNAs na fisiopatologia dos tumores do SNC vem ganhando destaque. O objetivo deste estudo é compreender o envolvimento da deleção do cromossomo 22q no perfil de expressão de genes e de miRNAs nos meningiomas grau I e, com isso, possibilitar uma melhor compreensão da sua natureza que permita propor alvos potenciais para novas formas de terapia molecular no futuro. **Pacientes e métodos:** Em um estudo prévio de nosso grupo foi feita uma análise global da expressão gênica pela metodologia de microarrays. Inicialmente para determinação dos grupos foi feita uma análise pela técnica de FISH para identificar quais amostras tinham a deleção do cromossomo 22q e por análise dos microarrays foram selecionados microRNAs e genes para validação PCR em tempo real. Em nosso estudo atual foram utilizadas 15 amostras em cada grupo: um grupo de meningiomas com deleção do cromossomo 22q, um segundo grupo de meningiomas sem deleção do cromossomo 22q e um grupo controle de 15 amostras de aracnoide normal. Os genes selecionados foram o ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL e BTC e os miRNAs foram o miR-1 e miR-133b. **Resultados e Conclusões:** Os genes e microRNAs selecionados pela análise de microarray e validados por PCR em tempo real mostraram-se diferentemente expressos entre meningiomas com deleção do cromossomo 22q e meningiomas sem deleção do cromossomo 22q. Os genes ACVR1C, CCL18 e VGLL3 foram hipoexpressos em ambos os grupos de meningiomas, com deleção do cromossomo 22q e sem deleção do cromossomo 22q. O gene ASPN também foi hipoexpresso em meningiomas sem deleção do 22q quando comparado ao grupo controle. O gene OGDHL foi hiperexpresso em meningiomas sem a deleção do 22q quando comparado ao grupo controle. O gene BTC foi diferentemente expresso entre meningiomas com e sem deleção do 22q. Os microRNAs miR-1e miR-133b foram hipoexpressos em meningiomas com deleção do 22q e em meningiomas sem deleção do 22q.

Palavras-chave: Meningioma, Cromossomo 22q, microRNAs, Expressão gênica.

ABSTRACT

Introduction: Among the primary tumors of the Nervous System, the meningioma is the most frequently diagnosed type, accounting for 35.5% of cases, considering all age groups. The genesis of meningiomas is a complex process that involves accumulation of genetic alterations, the most important event being the deletion in the long arm of chromosome 22. Understanding the initiation and growth of meningiomas at the molecular level can help developing new targets for therapy and, in this context, has been highlighted in the last decade the study of microRNAs (miRNAs). MiRNAs are a class of small non-coding RNAs which regulates gene expression and plays a crucial role in the development of many types of cancer. The recognition of their role in the pathophysiology of brain tumors has been coming into prominence. The aim of this study is to understand the involvement of chromosome 22q deletion in the expression profile of genes and miRNAs in meningiomas grade I and, with that, allow for a better understanding of its nature which may propose potential targets for new modalities of molecular therapy in the future. **Patients and methods:** In a previous study of our group, a global analysis by microarray methodology of genes and microRNAs was performed. Firstly, for group determination, a FISH technique analysis was done to identify which samples had the deletion of chromosome 22q and which had not and, by microarray analysis, were selected microRNAs and genes for validation by real-time PCR. In our present study 15 samples in each group were used: one group of meningiomas with deletion of chromosome 22q, a second one of meningiomas without deletion on chromosome 22q and a control group with 15 samples of normal arachnoid. The genes selected were ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL and BTC and the miRNAs were miR-1 and miR-133b. **Results and Conclusions:** The genes and microRNAs selected by microarray analysis and validated by real-time PCR were differently expressed between meningiomas with deletion of chromosome 22q and meningiomas without deletion of chromosome 22q. The genes ACVR1C, CCL18 and VGLL3 were downregulated in both groups of meningiomas, either with deletion of chromosome 22q and without chromosome 22q deletion. The ASPN gene was downregulated in meningiomas without deletion of 22q when compared to the control group. The OGDHL gene was upregulated in meningiomas without deletion of 22q when compared to the control group. BTC was differentially expressed between meningiomas with and without deletion of 22q. The microRNAs miR-1 and miR-133b were downregulated in meningiomas with deletion of 22q and in meningiomas without deletion of 22q.

Keywords: Meningioma, Chromosome 22q, microRNAs, Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise de mircoarrays	26
----------	------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene ACVR1C entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção	31
Gráfico 2	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene CCL18 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção	32
Gráfico 3	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene VGLL3 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção	33
Gráfico 4	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene ASPN entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo meningioma sem deleção	34
Gráfico 5	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene OGDHL entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo meningioma sem deleção	35
Gráfico 6	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene BTC entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo meningioma sem deleção em relação ao grupo meningioma com deleção.....	36
Gráfico 7	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-1 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção	37
Gráfico 8	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do miR-133b entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Meningiomas	13
2.2 Biologia molecular dos meningiomas	16
2.3 MicroRNAs	18
3 OBJETIVOS.....	23
4 PACIENTES E MÉTODOS	24
4.1 Pacientes.....	24
4.2 Métodos.....	27
4.2.1 Extração de RNA.....	27
4.2.2.1 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos genes.....	28
4.2.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos microRNAs.....	28
4.2.3 PCR em tempo real dos genes e dos microRNAs	29
4.2.4 Análise estatística	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Genes.....	31
5.2 microRNAs	37
6 DISCUSSÃO	39
6.1 Genes.....	39
6.2 MicroRNAs	42
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) compreendem uma gama heterogênea de neoplasias, que abrangem lesões benignas e malignas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu, em sua última revisão de 2007, a classificação dos tumores do SNC em Tumores Neuroepiteliais, Tumores das Meninges, Tumores de Nervos Cranianos e Nervos Espinhais, Linfomas e Neoplasias Hematopoiéticas, Tumores de Células Germinativas, Tumores da Região Selar e, por fim, Metástases (LOUIS et al., 2007).

Dentre os tumores primários do SNC, o meningioma é o tipo mais frequentemente diagnosticado, sendo responsável por 35,5% dos casos, considerando-se todas as faixas etárias. Os meningiomas são mais comuns em adultos e sua incidência aumenta com o aumento da idade. As taxas de incidência dos meningiomas crescem dramaticamente após os 65 anos de idade e continuam altas mesmo na população com mais de 85 anos. São mais comuns em mulheres (mais que o dobro dos pacientes são do sexo feminino) e sua incidência é mais alta em negros que em brancos (DOLECEK; PROPP; KRUCHKO, 2012). Histologicamente estes tumores apresentam uma vasta gama de subtipos, e podem ser classificados em Meningiomas Grau I (benigno), Grau II (atípico) e Grau III (maligno) de acordo com a OMS (RIEMENSCHIEDER et al., 2006). A sobrevida média em 5 anos é de 92% para os meningiomas grau I, 78% para os grau II e 47% para os grau III (van ALKEMANDE et al., 2012). São neoplasias associadas a complicações e sequelas neurológicas, com deterioração da qualidade de vida, especialmente em casos recorrentes. Melhores e novos tratamentos são necessários para lidar com esses tumores (VRANIC; PEYRE; KALAMARIDES, 2012).

A gênese dos meningiomas é um processo complexo que envolve o acúmulo de alterações genéticas, sendo o evento mais conhecido a deleção no braço longo do cromossomo 22 (22q), região codificadora do gene merlin, um supressor tumoral (CHOY et al., 2011). O entendimento da iniciação e do crescimento dos meningiomas em nível molecular pode ajudar a definir novos alvos de terapia (HIROKAWA et al., 2004) e, neste contexto, tem se destacado na última década o estudo dos microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificadores que regulam a expressão gênica e têm um papel crucial no desenvolvimento de vários tipos de câncer. O reconhecimento do papel destes RNAs na fisiopatologia dos tumores do SNC vem ganhando destaque (TURNER et al., 2010).

O objetivo deste estudo é compreender o envolvimento da deleção do cromossomo 22q no perfil de expressão de genes e de miRNAs nos meningiomas grau I e, com isso, possibilitar uma melhor compreensão da sua natureza que permita propor alvos potenciais para novas formas de terapia molecular no futuro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Meningiomas

Os meningiomas representam a mais comum neoplasia primária do sistema nervoso central (SNC), correspondendo a mais de 35% de todos os casos (DOLECEK; PROPP; KRUCHKO, 2012). Sua incidência aumenta com a idade e apresentam uma nítida predominância em mulheres, particularmente da terceira à sexta décadas de vida (relação de mulheres:homens de 2:1) (WIEMELS; WRENSCH; CLAUS, 2010).

Os meningiomas são tumores que se originam das células meningoteliais da aracnóide, sendo que 98% são intracranianos e o restante intrarraquídeos. Em até 60% dos casos são localizados nas regiões parassagitais, na convexidade do crânio, no tubérculo da sela e na asa do esfenóide. Localizações menos comuns compreendem a goteira olfatória, a foice, os ventrículos laterais, a tenda do cerebelo, a fossa média e a órbita (GREENBERG, 2006).

Dentre os vários sinais e sintomas associados ao desenvolvimento de um meningioma estão os déficits neurológicos focais, as alterações de nervos cranianos específicos, alterações cognitivas, crises convulsivas e síndrome de hipertensão intracraniana (com cefaleia, náuseas e vômitos, alterações do nível de consciência e edema de papila) (GREENBERG, 2006).

O tratamento dos meningiomas é eminentemente cirúrgico. Contudo, a ressecção total não consegue ser obtida em cerca de 50% dos meningiomas recém-diagnosticados. Portanto, remoção parcial seguida por observação, radioterapia (e principalmente radiocirurgia), ou, em casos raros, quimioterapia sistêmica, devem ser discutidos numa abordagem multidisciplinar (FATHI; ROELCKE, 2013).

A introdução do microscópio cirúrgico na neurocirurgia foi um passo fundamental no aumento da segurança da ressecção tumoral (AL-MEFTY et al., 1985). Progressos tecnológicos adicionais incluem ferramentas como o uso de ultrassom cerebral, neuronavegação, monitorização eletrofisiológica e ressonância magnética intraoperatória (SOLEMAN et al., 2012; BLACK; MOROKOFF; ZAUBERMAN, 2008).

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) os meningiomas são categorizados em 3 graus. Os critérios incluem tipo celular, atividade mitótica, necrose e invasão cerebral. Os meningiomas benignos (Grau I da OMS) representam aproximadamente 90% de todos meningiomas e apresentam muitas variantes histológicas: meningotelial, fibroblástica, transicional (mixa), psamomatosa, angiomatosa, microcística, secretória, e metaplásica. Os meningiomas atípicos (Grau II da OMS) representam de 5-7% de todos meningiomas e compreendem os subtipos de célula-clara e cordóide. Eles têm um índice mitótico de $\geq 4/10$ HPF (High-Power Fields), celularidade aumentada, uma alta taxa núcleo/citoplasma (“células pequenas”), crescimento em camadas e focos de necrose espontânea que não são induzidos por embolização ou radioterapia. Mesmo na ausência de critérios celulares de um Grau II, também a invasão cerebral qualifica um meningioma neste grau, devido às taxas de recorrência e mortalidade serem semelhantes às dos meningiomas atípicos. Os meningiomas anaplásicos (Grau III da OMS) são tumores malignos que representam 3% de todos meningiomas. Incluem as variantes papilar e rabdóide e demonstram um índice mitótico ≥ 20 mitoses por 10 HPF e zonas de necrose espontânea maiores. Na microscopia eles podem lembrar um carcinoma, sarcoma ou melanoma (ARTLICH; SCHMIDT, 1990).

Até onde se sabe, o único fator de risco ambiental associado com a gênese dos meningiomas é a exposição à radiação ionizante, principalmente à radioterapia para tumores intracranianos primários durante a infância. Um estudo recente demonstrou que exposições repetidas a exames de raios-X dentários também foram estatisticamente associadas com risco aumentado para o desenvolvimento de meningiomas intracranianos (CLAUS et al., 2012). Em outros aspectos, pacientes portadores de um meningioma são mais propensos a relatar a existência de um parente de primeiro grau com história de meningioma, história de câncer tireoidiano ou leucemia (CLAUS et al., 2011).

Várias evidências, incluindo a predominância nas mulheres e a existência de receptores de estrogênio e progesterona em células de meningiomas, apoiam o papel dos hormônios no desenvolvimento destes tumores (VRANIC; PEYRE; KALAMARIDES, 2012).

A classificação OMS ainda é primariamente baseada em parâmetros morfológicos. Entretanto tem ocorrido um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares que visam elucidar a gênese tumoral e a progressão dos meningiomas. Análise das regiões cromossômicas e o estudo de novos genes devem futuramente auxiliar no diagnóstico e prognóstico como possíveis marcadores moleculares e 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, contribuíram e aceleraram o processo no desenvolvimento de novas terapias (CHOY et al., 2011).

2.2 Biologia molecular dos meningiomas

A formação de tumores do SNC é um processo complexo que envolve um acúmulo de alterações genéticas. Alterações específicas em cada tipo de tumor têm sido reveladas, e assim, o conceito de que diferentes vias genéticas conduzem a diferentes tipos de tumor ganhou a aceitação geral. Isso significa que informações genéticas, obtidas sobre tumores após ressecção cirúrgica, têm um importante valor diagnóstico, podendo vir a ser, portanto, um substituto de tradicionais métodos diagnósticos histopatológicos (Hashimoto et al., 2002).

Comparados com os gliomas, sabe-se relativamente menos sobre a origem celular dos meningiomas ou sobre as alterações críticas que desencadeiam sua gênese. O principal evento genético associado com a iniciação dos meningiomas é a inativação bialélica do gene NF2, que é encontrada em 80% dos meningiomas esporádicos e em todos pacientes com neurofibromatose tipo 2. Já as vias moleculares que resultam no comportamento cromossômico anormal durante a progressão dos meningiomas estão relacionadas a uma série de complexas interações que ainda precisam ser melhor caracterizadas. (GOUTAGNY et al., 2010). A perda do braço curto do cromossomo 1 é a segunda anormalidade cromossômica mais encontrada e está associada à gênese do meningioma atípico ou grau II (LOMAS et al., 2001).

Poucos genes têm sido estudados individualmente nos meningiomas, incluindo o DAL-1/4.1B (EPB41L3), p18, TP53, PTEN, KRAS, HRAS, CDKN2A, P14ARF, CDKN2B e CDKN2C (LOMAS et al., 2001; ROBB et al., 2003; LOMAS et al., 2004; LOPEZ-GINES et al., 2004; NUNES et al., 2005). Os principais oncogenes envolvidos na gênese dos meningiomas são o HRAS e CMOS (PHAM et al., 2011).

Sua função na iniciação do comportamento neoplásico dos meningiomas é ainda menos compreendida que a do NF2 (RAGEL; JENSEN, 2008; DIEDRICH; ECKERMANN, SCHMIDTKE, 1998).

Dados sugerem que 40% dos meningiomas não possuem alteração genética detectável (HARADA et al., 1997). Um estudo descobriu que 77% dos meningiomas tinham pelo menos 1 gene metilado e 25% das amostras em uma outra análise tinham 3 ou mais genes metilados (BELLO et al., 2004). A metilação aberrante de DNA é considerada como um mecanismo silenciador de genes, que reduzem sua expressão, bloqueando o acesso do DNA ao maquinário transcricional (JONES; BAYLIN, 2007).

Além do NF2, o gene SMARCB1 foi proposto como gene candidato para gênese de schwannomas e meningiomas. Uma mutação missense foi recentemente identificada no exon 2 do gene SMARCB1 como mutação germinativa causativa predisponente em 5 membros afetados de uma única família (HADFIELD et al., 2010)

O entendimento da iniciação e do crescimento dos meningiomas a nível molecular pode ajudar a definir novos alvos de terapia. Um deles é a função da proteína merlin, o produto do gene NF2. Merlin é uma proteína inibidora da PAK-1 (p21 activated kinase) e algumas moléculas inibidoras de PAK-1 vem sendo estudadas e testadas em laboratórios. Futuramente poderão ser utilizados clinicamente inibidores de PAK em tumores com mutações no gene NF2 (HIROKAWA et al, 2004). É interessante notar que, uma vez que a frequência da mutação no NF2 é semelhante nos meningiomas de graus I,II e III, sugere-se que o gene NF2 estaria envolvido na iniciação dos meningiomas, mas não na sua progressão (FATHI; ROELCKE, 2013).

Uma outra via de interesse é a sinalização dos receptores hormonais. O crescimento dos meningiomas pode ser significativamente inibido antagonizando os hormônios da via de crescimento, como, por exemplo, IGF-I, em estudos realizados *in vitro* e em modelo animal (McCUTCHEON et al, 2001). Receptores de progesterona e estrogênio são frequentemente expressos em meningiomas e, por este motivo, estes hormônios podem ser foco de interesse em estudos com terapia anti-endócrina. Entretanto, experimentos realizados utilizando antagonista de receptor de progesterona, bem como anti-estrogênio, têm mostrado resultados insatisfatórios (Grunberg et al, 2001).

Se a iniciação dos meningiomas começa a ser elucidada, as vias moleculares que levam à sua progressão são ainda muito pouco conhecidas. Análises moleculares em larga escala destes tumores (avalição global da expressão gênica) podem ajudar na descoberta de novos genes candidatos para a gênese dos meningiomas, assim como a análise do perfil de expressão dos microRNAs (miRNAs). A expressão alterada dos miRNAs os coloca como reguladores chave da gênese do câncer. Embora as investigações ainda estejam no início, há forte evidência que os miRNAs estão integralmente envolvidos no desenvolvimento e progressão dos tumores do sistema nervoso central (TURNER et al., 2010).

2.3 MicroRNAs

A regulação da expressão gênica é um processo complexo que requer a interação coordenada de proteínas e ácidos nucleicos, e a expressão gênica desregulada é uma das características chave do câncer (MIRNEZAMI et al., 2009). Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes, com

19-25 nucleotídeos, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo (KIM, 2005). Desta maneira, os miRNAs afetam vários processos celulares fundamentais como diferenciação celular, proliferação e apoptose, abrindo novas perspectivas na pesquisa do câncer (BARTEL; CHEN, 2004).

Os miRNAs foram descobertos em 1993 através de um trabalho inovador com o nematóideo *C. elegans*. Victor Ambros e Gary Ruvkun descobriram que o gene *lin-4*, conhecido por ser crucial na regulação do desenvolvimento em *C.elegans*, não codificava uma proteína, mas sim uma pequena molécula de RNA com 22 nucleotídeos. Demonstrou-se que esse pequeno RNA alterava a expressão gênica através da repressão da tradução do RNA mensageiro do gene *lin-4* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993).

Os miRNAs são expressos em diferentes níveis e de maneira específica em diferentes tecidos. As ferramentas da bioinformática predizem milhares de RNAs mensageiros (mRNA) alvos para cada miRNA, sugerindo que muitos genes estão sujeitos à regulação mediada pelos miRNAs. Estes são precisamente regulados no tempo e espaço em diversos organismos e, padrões específicos da expressão de miRNAs podem ser reconhecidos, por exemplo, durante o desenvolvimento encefálico bem como na diferenciação neuronal e no desenvolvimento e maturação sináptica (MISKA et al., 2004; KSIMALI et al., 2007; BARBATO et al., 2008).

A primeira evidência associando os miRNAs ao câncer ocorreu a partir de achados em leucemia linfocítica crônica (LLC) (DÖHNER et al., 2000). Deleções no cromossomo 13q14 são as deleções mais comuns em LLC, presente em pouco mais da metade dos casos. Dois miRNAs (miR-15 e miR-16-1) foram encontrados nessa região e, subsequentemente, descobriu-se que estavam deletados ou hipoexpressos

na maioria dos casos de LLC (CALIN et al., 2002). Expressão aberrante de miRNAs tem sido demonstrada em essencialmente todo tipo de câncer estudado, incluindo, entre outros, os de mama, ovário, pâncreas, pulmão, colorretal e SNC (MIRNEZAMI et al., 2009).

A visão clássica do câncer como uma doença genética envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor, conhecidos por codificar proteínas, é agora expandida para incluir também os miRNAs. Os genes de miRNAs estão frequentemente localizados em sítios frágeis, em pequenas regiões de perda de heterozigose, pequenas regiões de amplificação e regiões comuns de quebra. Descobriu-se que muitos miRNAs agem como genes supressores de tumor ou como oncogenes, de acordo com o mRNA alvo, acelerando o processo de desenvolvimento do câncer (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006).

A expressão gênica aberrante é o principal mecanismo da disfunção dos miRNAs no câncer, com níveis anormais na expressão de miRNA maduro e/ou precursor em amostras de tumor quando relacionada ao tecido normal. Se presente nas células somáticas, as alterações no miRNA podem ser responsáveis pela iniciação de um tumor, enquanto se presente na linhagem das células germinativas, eles poderiam constituir um evento que predisponha ao câncer. O perfil da expressão dos miRNAs de tumores em humanos tem levado à identificação de características correlacionadas ao diagnóstico do tumor, estágio, progressão, prognóstico e resposta ao tratamento. Portanto, a impressão digital dos miRNAs pode ser utilizada pelos oncologistas como uma ferramenta no diagnóstico e prognóstico. Além disso, novas estratégias terapêuticas envolvendo miRNA-silenciadores ou miRNA-mímicos poderiam ser propostas, baseadas nas funções

destes pequenos RNAs não-codificantes (como oncogenes e genes supressores de tumor) no sistema nervoso (NICOLOSO; CALIN, 2008).

Diversas formas para a avaliação do perfil dos miRNAs foram desenvolvidas incluindo os microarrays (microarranjos) de oligonucleotídeos de miRNAs (LIU et al., 2004), PCR em tempo real para precursores de miRNA ou miRNA ativo, análise seriada da expressão gênica adaptada para pequenos RNAs (miRAGE - SAGE) ou a análise dos miRNAs do genoma total com a análise seriada da expressão gênica (CHEN et al., 2005).

O conhecimento da biologia dos meningiomas tem progredido recentemente nos últimos anos. Evidências substanciais sugerem que o estudo da tumorigênese induzida pela radiação, desregulação do ciclo celular, dinâmica telomérica e instabilidade genética podem identificar genes relevantes no estudo dos meningiomas. Algumas evidências indicam que ao analisar genes e mecanismos envolvidos em metástases e invasão do câncer em geral, poderemos obter informações importantes e relevantes para o entendimento da propagação dos meningiomas e, conseqüentemente, para o tratamento dos mesmos. Um trabalho recente encontrou uma diminuição na expressão do miR-200a em meningiomas grau I. Os autores constataram, por estudo funcional em cultura de células e em modelo animal de camundongo que, o aumento da expressão do miR-200a inibe o crescimento de células tumorais nos meningiomas (SAYDAM, 2009).

Embora a investigação dos miRNAs em tumores cerebrais ainda esteja no início, há forte e crescente evidência de que eles estejam integralmente envolvidos em seu desenvolvimento e progressão. Se por um lado o papel dos miRNAs acrescentou uma camada extra de complexidade na compreensão dos tumores cerebrais, por outro lado revelou novos alvos de tratamento (TURNER et al., 2010).

Já há estudos demonstrando expressão anormal de miRNAs em glioblastomas, meduloblastomas e adenomas hipofisários (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005; PIERSON et al., 2008; LI et al., 2014). Porém, em meningiomas, o perfil de expressão global dos miRNAs não foi relatado até o presente momento. Dessa forma, torna-se justificável o seu estudo como forma de fornecer os conhecimentos iniciais e elucidar o comportamento de alguns miRNAs em meningiomas. A utilização das técnicas de biologia molecular, como forma de avaliar a formação e progressão deste tipo de tumor, pode melhorar nossa compreensão da gênese dos meningiomas e, com isso, permitir-nos propor alvos potenciais para novas formas de terapia molecular no futuro.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Validar genes e microRNAs selecionados a partir de resultados obtidos por análise de microarrays em estudo prévio de meningiomas grau I com e sem deleção do cromossomo 22q.

Objetivos específicos:

Analisar a expressão dos genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL e BTC por PCR em tempo real entre os meningiomas grau I com e sem a deleção no cromossomo 22q.

Analisar a expressão dos microRNAs miR-1 e miR-133b por PCR em tempo real entre os meningiomas grau I com e sem a deleção no cromossomo 22q.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram utilizadas 30 amostras de meningiomas humanos, obtidas a partir de pacientes submetidos à cirurgia na Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. O protocolo para esta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMRP/SP. De acordo com o processo HCRP nº 2320/2008.

Após o procedimento cirúrgico uma parte das amostras do tumor foi imediatamente estocada em nitrogênio líquido (-196°C) e a outra parte encaminhada ao Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo HC-FMRP/USP, para a confirmação do laudo através do exame anátomo-patológico.

Os casos foram selecionados com base em diagnósticos clínicos e histopatológicos de meningiomas grau I, segundo os critérios da OMS. Para as amostras de controle foram utilizados fragmentos de aracnóide obtidos a partir de pacientes submetidos à cirurgia para clipagem de aneurisma, sem diagnóstico de tumor cerebral.

Em estudo prévio do nosso grupo foi realizado experimento de análise global em larga escala pela metodologia de microarrays, onde inicialmente, para a determinação dos grupos, foi utilizada a técnica de FISH para identificar quais amostras apresentavam a deleção no cromossomo 22q. Pela análise por microarrays foram selecionados um conjunto de microRNAs e mRNAs identificados como diferencialmente expressos entre as amostras de meningioma com deleção do

cromossomo 22q, amostras de meningioma sem deleção do cromossomo 22q e amostras de tecidos controle de aracnóide. Estes grupos foram utilizados com o objetivo de identificar microRNAs e seus potenciais transcritos-alvo, envolvidos na patogênese dos meningiomas. Para isso, o conjunto de microRNAs expressos em níveis significativamente ($p < 0.05$, FDR) mais altos nos meningiomas, 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 transcritos de mRNA expressos em níveis significativamente mais baixos ($p < 0.05$, FDR) nos meningiomas. A partir disto, selecionamos os microRNAs miR-1 e miR-133b e os genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL e BTC (Figura 1). Em nosso estudo, para validação por RQ-PCR, foram utilizadas 15 amostras por grupo, sendo um grupo com deleção no cromossomo 22q, um grupo sem a deleção no cromossomo 22q e um grupo controle com 15 amostras de aracnoide.

É importante salientar que todos os investigadores envolvidos neste projeto, bem como os doentes, incluindo os controles, foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram um acordo formal, antes da coleta.

Figura 1. Análise de micrarrays obtida pelo software Gene Cluster 3.0 (Average Linkage, Spearman Rank). Imagem gerada pelo software Java TreeView.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de RNA

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 o 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.

4.2.2.1 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos genes

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µg RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC o volume final de 20µl. Em seguida o material foi levado ao termociclador nas condições padrão, onde o cDNA é sintetizado a partir do RNA das amostras.

4.2.2.2 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 0,75µl de RT Buffer, seguido de 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de *primers* específicos (miRNAs e controles endógenos), e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, 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.

4.2.3 PCR em tempo real dos genes e dos microRNAs

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, TBP e HPRT para os genes e o U6 para os microRNAs) 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 genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL e BTC e dos microRNAs miR-1 e miR-133b 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 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl 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*”.

4.2.4 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* foi 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.

5 RESULTADOS

5.1 Genes

Gráfico 1. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene ACVR1C entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção ($p = 0,0016$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 2. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene CCL18 entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção ($p < 0,0001$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 3. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene VGLL3 entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção ($p < 0,0001$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 4. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene ASPN entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo meningioma sem deleção ($p < 0,0271$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 5. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene OGDHL entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo meningioma sem deleção ($p < 0,0205$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 6. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene BTC entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo meningioma sem deleção em relação ao grupo meningioma com deleção ($p < 0,0200$, Kruskal Wallis test).

5.2 microRNAs

Gráfico 7. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-1 entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção ($p = 0.0075$, Kruskal Wallis test).

Gráfico 8. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-133b entre os grupos estudados. * Houve diferença significativa para o grupo controle em relação aos grupos meningioma sem deleção e meningioma com deleção ($p < 0,0001$, Kruskal Wallis test).

6 DISCUSSÃO

A partir de trabalho realizado previamente por nosso grupo foram selecionados pela metodologia de análise em larga escala de microarrays os microRNAs miR-1 e miR-133b, assim como os genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN, OGDHL e BTC para validação pela metodologia PCR em tempo real em três grupos: controle, meningiomas com deleção do cromossomo 22q e meningiomas sem deleção do cromossomo 22q. A deleção do cromossomo 22q foi determinada pela metodologia de FISH. A proposta visou esclarecer se esta alteração, que ocorre em mais de 50% dos meningiomas grau I, estabelece vias moleculares distintas entre os meningiomas com deleção do cromossomo 22q e meningiomas sem deleção do cromossomo 22q.

6.1 Genes

Nossos achados demonstraram uma hiperexpressão do gene BTC (Betacellulin) exclusivamente nos meningiomas sem deleção no cromossomo 22q. A hiperexpressão deste gene também foi encontrada em adenocarcinoma de endométrio (SRINIVASAN et al., 1999), carcinoma hepatocelular (MOON et al., 2006) e câncer de pâncreas (YOKOYAMA et al., 1995). Em câncer de pulmão, o BTC aumentou a proliferação, diferenciação e movimento das células cancerígenas e aumentou também a resistência contra a apoptose (SHI et al., 2014). Um estudo mostrou que o BTC pode ser um forte fator angiogênico porque ele induz sobrevivência celular, síntese de DNA, migração e formação de túbulos em células endoteliais (KIM et al., 2002). O BTC foi o único gene do nosso estudo com

diferença de expressão exclusivamente entre meningiomas com e sem deleção do 22q. O gene BTC é um ligante do receptor EGF (Epidermal Growth Factor) e promove a proliferação celular em células tronco, assim como estimula a neurogênese (GÓMEZ-GAVIRO et al., 2012; PAZ et al., 2011). Não há relatos prévios do papel do BTC em meningiomas e portanto, novos estudos são necessários para esclarecer o envolvimento deste gene na proliferação e angiogênese dos meningiomas, assim como a sua associação à deleção do cromossomo 22q.

Nossos resultados demonstraram uma hipoexpressão dos gene ACVR1C em meningiomas. Em câncer de vesícula biliar, o ACVR1C age como supressor tumoral, sendo um importante marcador de metástase e invasão (LI et al., 2014). Também foi demonstrado ser um gene indutor de apoptose em hepatomas (KIM et al., 2004). Em câncer de mama a diminuição da expressão do ACVR1C leva à progressão desse tipo de câncer (ZENG et al., 2012). Em nosso trabalho observamos diferença do grupo controle quando comparado aos grupos de meningiomas com e sem deleção do 22q. Não observamos diferença na expressão deste gene quando comparamos meningiomas com e sem deleção do 22q. A partir destes resultados podemos sugerir que, assim como em tumores de mama e de vesícula biliar, o gene ACVR1C possa atuar como um supressor tumoral.

O gene CCL18 também apresentou-se hipoexpresso nos meningiomas, tanto no grupo com deleção do cromossomo 22q quanto no grupo sem deleção do 22q. Entretanto, não constatamos diferença entre meningiomas grau I com e sem deleção do cromossomo 22q. Esse é um gene relacionado com vários tipos de câncer, podendo agir como oncogene ou gene supressor tumoral, dependendo de cada caso. Em câncer colorretal e câncer gástrico atua como supressor tumoral, sendo

que sua expressão nesses tecidos é um marcador de melhor prognóstico (YUAN et al., 2013; LEUNG et al., 2004). Já em câncer de mama, sua expressão foi correlacionada à invasão tecidual e metástases (CHEN et al., 2011), ação semelhante à descrita em adenocarcinoma ductal pancreático (MENG et al., 2014) e em câncer de próstata, onde está hiperexpresso (CHEN et al., 2014), agindo, portanto, como oncogene. Nossos dados sugerem que em meningiomas o gene CCL18, assim como o gene ACVR1C, tem uma ação de supressão tumoral, algo não antes relatado.

Outro gene que se apresentou hipoexpresso em meningiomas, com e sem deleção no cromossomo 22q, foi o VGLL3. Este gene também aparece hipoexpresso em câncer de ovário, sugerindo que tenha uma atividade supressora tumoral (GAMBARO et al., 2013). Assim como em relação aos genes ACVR1C e CCL18, observamos diferença quando comparamos o grupo controle aos grupos com e sem deleção do 22q, mas não constatamos diferença entre meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q. Portanto, o papel de supressor tumoral em meningiomas pode ser sugerido em relação aos três genes anteriormente descritos (ACVR1C, CCL18 e VGLL3). Entretanto, estudos funcionais em linhagens de meningiomas serão necessários para comprovar esta função.

Em meningiomas com deleção do 22q, houve expressão diminuída do gene ASPN com diferença significativa. Já nos meningiomas sem a deleção no cromossomo 22 a expressão do gene ASPN não apresentou diferença quando comparado ao grupo controle. Em câncer de mama, o perfil de expressão de genes foi pesquisado com microarray de genes e ficou demonstrado, após validação dos dados por PCR em tempo real assim como teste imunohistoquímico, que o gene ASPN está hiperexpresso (CASTELLANA et al., 2012). Quando observamos os

grupos de meningiomas com e sem deleção, constatamos que o gene ASPN está ainda menos expresso no grupo com deleção, apesar de não apresentar diferença estatística.

Inversamente, o gene OGDHL está hiperexpresso em nossas amostras de meningiomas sem deleção no cromossomo 22q e, apesar de não encontrarmos diferença estatística, o aumento da expressão deste gene também foi observado no grupo de meningiomas com deleção do cromossomo 22q. Tal achado diverge daqueles encontrados em câncer de colo de útero, onde o OGDHL exerce atividade de supressor tumoral, regulando negativamente a proliferação celular por indução da apoptose (SEN et al., 2012). Em câncer de mama, o gene OGDHL encontra-se metilado, resultando em inativação epigenética, compatível com função de supressor tumoral neste tipo de câncer (GUERRERO-PRESTON et al., 2014). Ao contrário, a partir dos nossos resultados, podemos inferir uma função de oncogene ao OGDHL em meningiomas grau I.

6.2 MicroRNAs

O miR-1 está hipoexpresso em vários tipos de câncer. Através de sua ação sobre vários genes-alvo, o miR-1 foi caracterizado com um supressor tumoral que inibe a proliferação do câncer e de metástases e promove a apoptose (HAN et al., 2014), dados que coincidem com nossos achados em meningiomas com e sem deleção no cromossomo 22q. O miR-1 está diminuído em câncer de pulmão, tireóide, bexiga, colorretal, carcinoma hepatocelular e de células renais e em carcinoma de células escamosas em seio maxilar, hipofaringe e esôfago (NOHATA et al., 2012). Em nosso trabalho o miR-1 apresentou-se hipoexpresso nos

meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q quando comparado ao grupo controle. Wang et al (2014), em estudo in vitro em neuroesferas de glioblastoma, demonstrou que o miR-1 diminuiu a migração na população de neuroesferas dos GBM em 30-50%, assim como diminuição da expressão de EGFR. Os autores sugerem que o miR-1 tem um elevado potencial no desenvolvimento de terapias para tratamento dos glioblastomas.

O mir-133b, também com função de supressor tumoral, aparece hipoexpresso em câncer de pulmão e bexiga, câncer gástrico e colorretal, além dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, língua e esofágico (NOHATA et al., 2012). Em câncer de próstata, a hipoexpressão em conjunto do miR-1 e miR-133b foi encontrada em tumores recorrentes em comparação aos não-recorrentes, servindo como novos biomarcadores para predizer a progressão deste tipo de tumor (KARATAS et al., 2014). Em nosso trabalho o miR-133b apresentou-se hipoexpresso nos meningiomas com e sem deleção do cromossomo 22q quando comparado ao grupo controle.

7 CONCLUSÕES

- O BTC foi único gene do nosso estudo que apresentou-se diferencialmente expresso entre o grupo de meningiomas com deleção e o grupo de meningiomas sem deleção do 22q.

- Os genes ACVR1C, CCL18, VGLL3, ASPN e OGDHL não se apresentaram diferencialmente expressos entre os grupos de meningiomas com e sem deleção do 22q, sugerindo que não seja possível determinar dois grupos distintos pela deleção do 22q e que ocorra uma semelhança no padrão de expressão dos meningiomas com e sem deleção do 22q. Os genes ACVR1C, CCL18 e VGLL3 apresentaram-se hipoexpressos no grupo de meningiomas tanto com deleção do cromossomo 22q quanto no grupo sem deleção do cromossomo 22q. O gene ASPN também apresentou-se hipoexpresso nos meningiomas sem deleção do 22q quando comparado ao grupo controle. O gene OGDHL apresentou-se hiperexpresso nos meningiomas sem deleção do 22q quando comparado ao grupo controle.

- Os microRNAs miR-1 e miR-133b apresentaram-se diferencialmente expressos entre os meningiomas e o grupo controle. Entretanto, não apresentaram diferença no grupo de meningiomas com deleção do cromossomo 22q e os meningiomas sem deleção do cromossomo 22q.

8 REFERÊNCIAS

Al-Mefty O, Holoubi A, Rifai A, Fox JL. Microsurgical removal of suprasellar meningiomas. *Neurosurgery*. 1985 Mar;16(3):364-72.

Artlich A, Schmidt D. Immunohistochemical profile of meningiomas and their histological subtypes. *Hum Pathol*. 1990;21(8): 843-9.

Barbato C; et al. Thinking about RNA? MicroRNAs in the brain. *Mamm Genome*. 2008; 19:541-551.

Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004 May;5(5):396-400.

Bello MJ, et al: DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol* 108:413–421, 2004

Black PM, Morokoff AP, Zauberman J. Surgery for extra-axial tumors of the cerebral convexity and midline. *Neurosurgery*. 2008 Jun;62(6 Suppl 3):1115-21; discussion 1121-3.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15524–9.

Castellana B, Escuin D, Peiró G, et al. ASPN and GJB2 Are Implicated in the Mechanisms of Invasion of Ductal Breast Carcinomas. *Journal of Cancer* 2012;3:175-183. doi:10.7150/jca.4120.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029-33.

Chen C; et al. Real-time quantification of micrnas by stem-loop rt-pcr. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:e179.

Chen G, Liang Y, Zhu J, et al. CC Chemokine Ligand 18 Correlates with Malignant Progression of Prostate Cancer. *BioMed Research International* 2014;2014:230183.

Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Chen J, Liu B, Deng H, Wang F, Lin L, Yao H, Su F, Anderson KS, Liu Q, Ewen ME, Yao X, Song E. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. 2011 Apr 12;19(4):541-55.

Choy W, Kim W, Nagasawa D, et al. The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg Focus*. 2011 May;30(5):E6

Claus EB, Calvocoressi L, Bondy ML, et al. Family and personal medical history and risk of meningioma. *J Neurosurg* 2011; 115:1072–1077.

Claus EB, Calvocoressi L, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M. Dental X-rays and Risk of Meningioma. *Cancer* 2012;118(18):4530-4537.

De La Garza-Ramos R. et al. Current standing and frontiers of gene therapy for meningiomas. *Neurosurg Focus*. 2013 Dec;35(6):E4.

Diedrich U, Eckermann O, Schmidtke J: Rare Ha-ras and cmos alleles in patients with intracranial tumors. *Neurology* 38:587–589, 1988

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343: 1910–6.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncology* 2012;14(Suppl 5):v1-v49.

Esquela-Kerscher A; Slack FJ. Oncomirs – miRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:259-269.

Fathi A-R, Roelcke U. Meningioma, *Curr Neurol Neurosci Rep* (2013) 13:337

Gambaro K, Quinn MC, Wojnarowicz PM, et al. VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol*. 2013 Jun;7(3):513-30.

Gómez-Gaviro MV; et al. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1317-22

Goutagny S, Yang HW, Zucman-Rossi J, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4155–4164.

Greenberg M. *Handbook of Neurosurgery*. 6th ed. New York; Thieme; 2006.

Guerrero-Preston R.; Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep*. 2014 Aug;32(2):505-12.

Hadfield KD, Smith MJ, Trump D, et al. SMARCB1 mutations are not a common cause of multiple meningiomas. *J Med Genet* 2010; 47:567–568.

Han C, Yu Z, Duan Z, Kan Q. Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials. *BioMed Research International* 2014;2014:428371.

Harada T, et al. Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84:847–851, 1996

Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683–692, 2007.

Karatas OF, Guzel E, Suer I, et al. miR-1 and miR-133b Are Differentially Expressed in Patients with Recurrent Prostate Cancer. Guan X-Y, ed. *PLoS ONE* 2014;9(6):e98675.

Kim BC1, van Gelder H, Kim TA, Lee HJ, Baik KG, Chun HH, Lee DA, Choi KS, Kim SJ. Activin receptor-like kinase-7 induces apoptosis through activation of MAPKs in a Smad3-dependent mechanism in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28458-65.

Kim HS, Shin HS, Kwak HJ, Cho CH, Lee CO, Koh GY. Betacellulin induces angiogenesis through activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3V-kinase in endothelial cell. *FASEB J* 2003;17:318 - 20.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):376-85.

Ksimali M; Kloosterman WP; De Bruijn E; et al. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol*. 2007; 8:R173.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.

Leung SY, Yuen ST, Chu KM, et al. Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterology* 2004;127:457.

Li J, Yang Z, Zou Q, Yuan Y, Li J, Liang L, Zeng G, Chen S. PKM2 and ACVR 1C are prognostic markers for poor prognosis of gallbladder cancer. *Clin Transl Oncol*. 2014 Feb;16(2):200-7

Li XH; et al. MicroRNAs in Human Pituitary Adenomas. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:435171.

Liu CG; et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:9740-9744.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 2007;114(2):97-109.

Meng F, Li W, Li C, Gao Z, Guo K, Song S. CCL18 promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of pancreatic cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Dec 10.

Mirnezami AH, Pickard K, Zhang L, et al. MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Apr;35(4):339-47.

Miska EA; Alvarez-Saavedra E; Townsend M; et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*. 2004; 5:R68.

Moon WS, Park HS, Yu KH, et al. Expression of betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis. *Hum Pathol* 2006;37:1324–32.

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

Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* 2012;3(1):9-21.

Paz AH; et al. Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells Dev.* 2011 Feb;20(2):223-32

Pham MH, et al: Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus* 30(5):E7, 2011

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

Saydam O; et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology.* 2009; 29: 5923-5940.

Sen T, Sen N, Noordhuis MG, et al. OGDHL is a modifier of AKT-dependent signaling and NF- κ B function. *PLoS One.* 2012;7(11):e48770.

Shi L; et al. Regulatory mechanisms of betacellulin in CXCL8 production from lung cancer cells. *J Transl Med.* 2014 Mar 16;12:70.

Soleman J, Fathi AR, Marbacher S, Fandino J. The role of intraoperative magnetic resonance imaging in complex meningioma surgery. *Magn Reson Imaging.* 2013 Jul;31(6):923-9.

Srinivasan R, Benton E, McCormick F, et al. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:2877–83.

Turner JD, Williamson R, Almefty KK, Nakaji P, Porter R, Tse V, Kalani MY (2010) The many roles of microRNAs in brain tumor biology. *Neurosurg Focus* 28(1):E3.

van Alkemade H, de Leau M, Dieleman EM, et al. Impaired survival and longterm neurological problems in benign meningioma. *Neuro Oncol* 2012; 14:658-666.

Vranic A, Peyre M, Kalamarides M. New insights into meningioma: from genetics to trials *Curr Opin Oncol.* 2012 Nov;24(6):660-5.

Wang J, Li Y, Jiang C. MiR-133b Contributes to Arsenic-Induced Apoptosis in U251 Glioma Cells by Targeting the hERG Channel. *J Mol Neurosci.* 2014 Oct 30.

Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. *Journal of Neuro-Oncology* 2010;99(3):307-314.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediate temporal pattern formation in *C elegans*. *Cell* 1993;75:855-62.

Yokoyama M, Funatomi H, Kobrin M, Ebert M, Friess H, Buchler M, et al. Betacellulin, a member of the epidermal growth-factor family, is overexpressed in human pancreatic-cancer. *Int J Oncol* 1995;7:825–9.

Yuan R.; et al. CCL18 as an independent favorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *J Surg Res*. 2013 Jul;183(1):163-9.

Zeng F, Xu G, Zhou T, Yang C, Wang X, Peng C, Zhou H. Reduced expression of activin receptor-like kinase 7 in breast cancer is associated with tumor progression. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(4):2519-26.