Stella Gonçalves Cavalcante

**Papel do complexo ATRX-DAXX na manutenção dos telômeros
durante a senescência do encéfalo**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue
Nagahashi Marie

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

**São Paulo
2021**

Stella Gonçalves Cavalcante

**Papel do complexo ATRX-DAXX na manutenção dos telômeros
durante a senescência do encéfalo**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue
Nagahashi Marie

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

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cavalcante, Stella Gonçalves

Papel do complexo ATRX-DAXX na manutenção dos
telômeros durante a senescência do encéfalo / Stella
Gonçalves Cavalcante. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Proteína humana ATRX 2.Proteína
humana DAXX 3.Histona H3.3 4.Telômero
5.Envelhecimento 6.Meningioma

USP/FM/DBD-167/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Ao Criador dos céus e da terra, que me
Garante renovação e reinvenção a todo
tempo.

Agradecimentos

Primeiro e sempre, à Deus, por Seu infinito amor e por me fortalecer e me guiar mesmo quando que não via mais nada.

À Prof.^a Dr.^a Suely Marie, por sua perseverança em fazer ciência de alta qualidade independente da situação, e também por me ensinar tanto sempre! À Dr.^a Sueli Oba, por todo apoio, compreensão e por manter sempre nossos pés no chão!

Às minhas companheiras diárias, que sempre me deram todo suporte para continuar indo em frente: Isabelle, com sua parceria; Adaliana, por sua amabilidade; Talita, por sua disposição sempre; Camila, por ser um exemplo de força; Paula, por mostrar que há um lado bom em tudo; Roseli, por compartilhar sua experiência conosco.

Aos amigos que continuam perto mesmo estando longe: Yollanda, por me ensinar que o trabalho edifica; Teruo, por ser esse companheiro mesmo sem saber de tudo a todo tempo; Erika e Thamily, por me mostrarem que a amizade ainda é tudo. Natália C., que com seu foco inabalável me ensinou muito. Fernanda, por tanto, mas principalmente por seu bom humor que melhora o dia de qualquer pessoa.

Aos amigos da fé, por me sustentarem e me confortarem: Bp. Eduardo, Pr. Jonathan, Pr. Adriano, Josiane, Talita, Daniela, Edna, Edna L., Cristiane, Thomas, Vilma, Ana Cristina, Tatiane, Alex, e tantos outros.

À minha família, que mesmo sem entender muito sempre me ajuda e me faz ter o foco necessário para avançar.

Aos funcionários do LIM15, sempre com disposição, carinho e apoio:
Luiz, Rosa, Nice, Eliene, Mônica, Darci e Camila.

Ao Serviço de Verificação de Óbito da Capital por contribuir com essa pesquisa científica.

À FAPESP, por garantir fomento a esta pesquisa, assim como a CAPES, por todo auxílio financeiro neste período, e a Fundação Faculdade de Medicina por todo apoio.

À Faculdade de Medicina e ao Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por contribuírem tão significativamente com esta pesquisa.

“Você pode abrir a boca e reclamar, ou abrir a mente e aprender. O dia será o mesmo, o resultado não.”

Autoria desconhecida

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. ATRX: o remodelador de cromatina ATP-dependente.....	3
2.2. DAXX: a chaperona de histonas	4
2.3. A variante de histona H3.3	5
2.4. Telômeros	7
2.5. O papel do complexo remodelador de cromatina na manutenção dos telômeros	9
2.6. Envelhecimento.....	10
2.7. Meningiomas	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Desenho experimental	13
4. JUSTIFICATIVA DOS GENES ALVOS	15
5. MÉTODOS	16
5.1. Caracterização das Amostras Biológicas	16
5.2. Congelamento do tecido biológico e extração de DNA/RNA tecidual	17
5.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	18
5.4. Análise da expressão gênica de ATRX-DAXX nos meningiomas....	20
5.5. Análise da expressão proteica de ATRX e DAXX.....	20
5.6. Imunofluorescência e análise de co-localização.....	22
5.7. Análise do tamanho dos telômeros.....	23
5.8. Análises Estatísticas	24
6. RESULTADOS.....	25
6.1 Análise do complexo ATRX-DAXX no processo de envelhecimento do tecido cerebral	25
a. Estratificação das amostras por grupo etário.....	25

b. Análise da expressão gênica e proteica de ATRX e DAXX diminuem com a idade	25
c. Co-localização de ATRX e DAXX	28
d. Comprimento dos telômeros e correlação com os níveis de expressão de <i>ATRX</i> e <i>DAXX</i>	29
6.2 Análise do complexo ATRX-DAXX no processo de tumorigênese dos meningiomas.....	30
a. Distribuição dos casos estudados	30
b. Expressões gênica e proteica do complexo ATRX-DAXX na progressão tumoral dos meningiomas.....	31
c. Análise do comprimento dos telômeros nos meningiomas	32
7. DISCUSSÃO	34
8. CONCLUSÕES	39
9. BIBLIOGRAFIA	40
APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas e Siglas

µl	Microlitro
ADD	Domínio ATRX-DNMT3-DNMT3L
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
AKT1	Proteína Serina/Treonina Quinase 1
ALT	Alongamento alternativo dos telômeros
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Quinase de serina/treonina ATM
ATR	Quinase de serina/treonina ATR
ATRX	Remodelador de cromatina ATRX
B-DNA	Forma B do DNA
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CC	Domínio <i>coiled-coil</i>
CDKs	Ciclins dependentes de quinase
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D/E	Zona de aminoácidos acidificados
DAB	Diaminobenzidina
DAXX	Proteína associada a domínio de morte 6
DDR	<i>DNA damage response</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA metiltransferase 1
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
F	Meningioma grau I subtipo fibroso
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
G4	G-quadruplexes do DNA
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
γ-H2AX	Variante de histona H2A.X fosforilada
GI	Meningiomas grau I
GII/GIII	Meningiomas grau II/ grau III
GUSB	Glucoronidase beta
H3F3A	Histona H3.3 A
H3F3B	Histona H3.3 B
H3K27ac	Histona H3 lisina 27 acetilada
H3K9me3	Histona H3 lisina 9 trimetilada
HBD	Domínio de ligação de histonas
HDAC	Histonas deacetilases
HIPK2	Proteína quinase de interação a homeodomínio 2
IBA1	Fator inflamatório do aloenxerto 1
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Quilodalton
KLF4	Fator Kruppel-like 4
M	Meningioma grau I subtipo meningotelial
MDM2	Proto-oncogene MDM2
MeCP2	Proteína de ligação à CpG metilada

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOC	Coeficiente de sobreposição de Manders
mRNA	RNA mensageiro
NF2	Gene supressor tumoral da neurofibromatose 2
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NOTCH2	Receptor Notch 2
NPC	Célula progenitora neural
OMS	Organização Mundial da Saúde
P21	Inibidora de ciclina dependente de quinase 1A
P53	Proteína de tumor p53
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PHD	<i>Plant homeodomain</i>
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa
POLR2A	RNA polimerase II subunidade A
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPLP0	Proteína ribossômica da subunidade de haste lateral P0
S/P/T	Serina/Prolina/Treonina
SMARCB1	Regulador da Cromatina Dependente de Actina Associado a Swi-Snf e Relacionado à Matriz, Subfamília B, Membro 1
SMO	Receptor <i>smoothened, frizzled class</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SUFU	Regulador negativo da sinalização <i>hedgehog</i> SUFU
SVOC-USP	Serviço de verificação de óbitos da capital da Universidade de São Paulo
SWI2/SNF	Remodeladores de cromatina não fermentadores de sucrose
T	Meningioma grau I subtipo transicional
TBP	Proteína de ligação ao TATA Box
TERC	Componente RNA da telomerase
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TRAF7	Fator 7 associado a receptor TNF
UI	Unidade internacional
USP7	Proteína peptidase 7 específica de ubiquitina

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Características dos <i>primers ATRX</i> e <i>DAXX</i> e dos genes de referência	19
------------------	---	----

Lista de Figuras

Figura 1	Funcionamento do complexo ATRX-DAXX em regiões de heterocromatina.	7
Figura 2	Distribuição etária das amostras de tecido cerebral	16
Figura 3	Expressão gênica do complexo ATRX-DAXX no tecido cerebral humano.	26
Figura 4	Expressões e localizações proteicas de ATRX e DAXX nas amostras de tecido cerebral de autópsia	27
Figura 5	Identificação dos diferentes compartimentos celulares cerebrais e manutenção da abundância proteica nos dois grupos etários	28
Figura 6	Co-localização das proteínas ATRX e DAXX nos núcleos celulares	28
Figura 7	Tamanho do telômero e correlação com o complexo ATRX-DAXX	29
Figura 8	Correlação do tamanho do telômero com as expressões de <i>ATRX</i> e <i>DAXX</i>	30
Figura 9	Expressões dos genes ATRX e DAXX em GII/GIII em comparação com meningiomas GI	31
Figura 10	Imunoistoquímica de ATRX e DAXX em diferentes graus de meningiomas	33
Figura 11	Tamanho do telômero em casos de meningiomas	32
Figura 12	Papel esquemático do complexo ATRX-DAXX na estrutura telomérica	38

Resumo

Cavalcante SG. *Papel do complexo ATRX-DAXX na manutenção dos telômeros durante a senescência do encéfalo* [dissertação]. São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021.

O complexo remodelador de cromatina ATRX-DAXX é um dos fatores epigenéticos principais no controle da manutenção da heterocromatina por seu papel na deposição de histona. ATRX está envolvido na configuração do nucleossomo e na manutenção da estrutura complexa da cromatina, e DAXX é uma chaperona específica para a deposição da variante de histona H3.3. As disfunções deste complexo têm sido associadas ao encurtamento do telômero com impacto na senescência celular. Entretanto, dados deste complexo relacionados ao envelhecimento cerebral e tumorigênese de meningiomas são escassos. Desta forma, no presente estudo, nós analisamos as expressões de ATRX e DAXX em 108 amostras de autópsia de cérebro humano normais estratificadas por idade e 91 amostras de meningiomas estratificadas por idade e grau de malignidade e correlacionamos com o comprimento do telômero. Observamos uma redução significativa das expressões gênicas e proteicas de ATRX e DAXX em tecidos cerebrais de idosos comparadas a de jovens normais, associada à diminuição do tamanho dos telômeros. Observou-se aumento da expressão gênica e proteica de ATRX em meningiomas de grau II/III em comparação aos meningiomas grau I. Uma baixa variabilidade no tamanho do telômero foi observada em meningiomas, independente à variação de idade e ao grau de malignidade, em contraste com o encurtamento do telômero em controles normais com o envelhecimento. Nossos resultados corroboram o envolvimento do complexo ATRX-DAXX na manutenção do comprimento do telômero no envelhecimento do tecido cerebral e na tumorigênese de meningiomas.

Descritores: Proteína humana ATRX; Proteína humana DAXX; Histona H3.3; Telômero; Envelhecimento; Meningioma.

Abstract

Cavalcante SG. *The role of ATRX-DAXX complex in telomere length maintenance in human brain aging* [dissertation]. São Paulo “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2021.

The chromatin-remodeling complex ATRX-DAXX is one of the major epigenetic factors that controls heterochromatin maintenance due to its role in histone deposition. ATRX is involved in nucleosome configuration and maintenance of higher order of chromatin structure, and DAXX is a specific histone chaperone for H3.3 deposition. Dysfunctions in this complex has been associated to telomere shortening impacting in cell senescence. However, data about this complex in brain tissue related to aging and meningioma tumorigenesis are still scarce. Thus, in the present study, we analyzed ATRX and DAXX expressions in 108 normal human autopsy brain tissues stratified by age and 91 meningioma specimens stratified by age and grade of malignancy and correlated to the telomere length. A significant decrease of both ATRX-DAXX gene and protein expressions were observed in the normal brain tissues from elderly compared to young, which were related to short telomere. ATRX upregulation at gene and protein levels were observed in grade II/III compared to grade I meningiomas. A low variability of telomere length was observed in meningiomas across different ages and malignant grades, in contrast to the shortening of telomere length with aging in normal controls. Our results corroborated the involvement of the ATRX-DAXX complex in the maintenance of telomere length in brain aging and tumorigenesis in meningioma.

Descriptors: ATRX human protein; DAXX human protein; Histone H3.3; Telomere; Aging; Meningioma.

1 INTRODUÇÃO

No começo da década de 1950, através de difrações de raios-x, foi proposto o primeiro modelo 3D da estrutura atômica do DNA, indicando que a molécula era composta por duas fitas poliméricas que se enrolavam em torno de si mesmas formando uma dupla hélice. Seguiram-se diversos estudos acerca da estrutura desta molécula, sendo identificada como uma estrutura com duas cadeias polinucleotídicas compostas por sequências de apenas quatro nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) e ligadas entre si por pontes de hidrogênio. Esta estrutura de dupla hélice foi nomeada como forma B do DNA (B-DNA). Estas cadeias polinucleotídicas contêm sequências específicas de nucleotídeos, os genes, que são transcritos em sequências de aminoácidos para gerarem proteínas^{1, 2}.

Os nucleotídeos são organizados na forma de nucleossomos. Os nucleossomos são estruturas com 147 pares de nucleotídeos envoltos em um centro de histonas, formando a cromatina. O centro do nucleossomo é composto por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, além de uma molécula de histona H1 controlando tanto o enrolamento da cromatina ao nucleossomo, como também a acessibilidade da cromatina presente no núcleo do nucleossomo. Cada histona presente no centro tem uma longa cauda N-terminal composta por aminoácidos, que se expande para fora do nucleossomo controlando a acessibilidade da cromatina através das diversas modificações nos aminoácidos presentes nessas caudas³⁻⁵. Assim, a cromatina pode ser organizada no núcleo como: **1)** cromatina descondensada, chamada eucromatina, presente preferencialmente no interior do núcleo e responsável pela alta expressão genômica; e **2)** cromatina condensada, conhecida como heterocromatina, presente na periferia do núcleo com baixa atividade genômica⁶.

As modificações na cauda de histonas geram o que chamamos de modificações epigenéticas, que são fatores que regulam a expressão gênica sem alterar as sequências de DNA. São fatores envolvidos nos mais diversos processos biológicos, tanto fisiológico como patológico, sendo essenciais para

o desenvolvimento e manutenção da identidade celular assim como para suas funções⁷. Este tipo de modificação pode ser herdado e tem padrões específicos para cada tipo de tecido. Com isso, a cromatina se torna uma estrutura altamente dinâmica, respondendo a diversos fatores, como por exemplo complexos remodeladores de cromatina e chaperonas de histonas, responsáveis por regular o acesso à cromatina⁸.

Em células eucarióticas, os complexos remodeladores de cromatina podem ser do tipo complexo dependentes de hidrólise de ATP para obter energia. Estes mudam temporariamente a estrutura dos nucleossomos por deixar o DNA menos envolto ao *core* de histonas. Consequentemente, a cromatina se desenrola e fica exposta à diversos fatores de transcrição, regulando processos celulares como a replicação, recombinação, transcrição e reparo do DNA^{9, 10}. Um importante remodelador de cromatina é a proteína ATRX, que forma complexo com a chaperona de histonas DAXX, atuando principalmente em regiões de repetição de heterocromatina como por exemplo, os telômeros¹¹⁻¹⁵.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ATRX: o remodelador de cromatina ATP-dependente

O gene *ATRX* (remodelador de cromatina ATRX) foi identificado em 1995 como agente causador da síndrome ATR-X, caracterizada clinicamente por retardo mental de grau médio à grave, α -talassemia, além de anormalidades na face, ossos e genitálias. Estudos subsequentes demonstraram que mutações no gene *ATRX* levam a disfunções na coesão das cromátides irmãs, nos telômeros e também alteram os padrões de metilação do DNA em regiões de repetição de heterocromatina, resultando em modificações da estrutura cromatínica^{12, 14, 16, 17}.

ATRX está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq21.1) e contém 38 exons¹⁸. É um membro da família de remodeladores de cromatina do tipo Switch 2 (“*sucrose non-fermenting 2*” – Não fermentadores de sucrose 2 – SWI2/SNF2). A família de remodeladores SWI/SNF agem alterando a posição dos nucleossomos ao longo da fita de DNA formando alças na sua superfície, deslocando o DNA ali presente e consequentemente deslocando nucleossomo ao longo da fita adjacente¹⁹. Esse mecanismo contribui para o controle da formação de nova heterocromatina e com isso a acessibilidade à cromatina^{12, 20-22}.

A proteína codificada por este gene é um remodelador de cromatina ATP-dependente. Tem peso molecular de 280kDa e conta com um domínio atípico em sua região N-terminal, denominado *plant homeodomain* (PHD), que é flanqueado por um domínio *coil-coil* chamado de domínio ADD (*ATRX-DNMT3-DNMT3L*)¹⁵. Na região C-terminal estão localizados sete subdomínios de helicases, responsáveis por conferir atividade ATPase, além de servirem como sítio de interação para diversos fatores, incluindo a proteína de ligação à CpG metilada 2 (MeCP2)^{23, 24}. Esta interação entre ATRX e MeCP2 tem se mostrado importante para o desenvolvimento cerebral. A importância de MeCP2 para o desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro foi demonstrada pelo impacto da mutação neste gene em mulheres heterozigóticas, causando a síndrome RETT, uma desordem do

desenvolvimento cerebral de espectro autista²⁵⁻²⁷. *ATRX* tem ao menos duas variantes transcricionais (mRNA), porém sem diferenças funcionais estabelecidas. A proteína é ubiquamente expressa sendo que, no cérebro, sua maior expressão é nos neurônios.

ATRX é normalmente encontrado em regiões de heterocromatina¹⁷, principalmente durante a fase S da mitose. Aumento de danos no DNA na região telomérica acontece geralmente quando há ausência de *ATRX*, visto que esta proteína se liga às estruturas G-quadruplexes do DNA (G4), encontradas nos telômeros e que podem ter um papel no metabolismo e proteção dos telômeros.

A relevante função do *ATRX* na manutenção da forma B do DNA, depende da sua interação com *DAXX*, uma proteína chaperona de histonas e da deposição das histonas em sítios específicos²⁸.

2.2. *DAXX*: a chaperona de histonas

A proteína de morte associada a proteína 6, mais conhecida como *DAXX*, foi inicialmente descrita por sua ligação citoplasmática com a proteína Fas, promovendo uma reação apoptótica induzida por esta proteína, através da via de morte celular JNK (*Jun N-terminal kinase*). É codificada pelo gene de mesmo nome – *DAXX*, formado por 8 exons e localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3)^{29, 30}. É composta por 740 aminoácidos e tem em seu N-terminal um domínio *alpha-helice* que se estende à porção C-terminal através de uma região altamente acidificada, rica em Glutamina/Asparagina (Glu/Asp) e o domínio de ligação de histonas (HBD), comumente encontrado em chaperonas de histonas. A região C-terminal é uma região rica em S/P/T (serina/prolina/treonina) e é conhecida por interagir com diversas proteínas, incluindo a proteína Fas (um receptor da superfamília TNF com domínios de morte celular). Próximo ao centro da proteína está localizada a zona de aminoácidos acidificados (D/E), responsável por mediar a interação com p53, além de outras proteínas. Adicionalmente, nesta região central, encontra-se o domínio *coiled-coil* (domínio CC), que promove as interações proteína-proteína.

DAXX localiza-se no citoplasma como um receptor de morte celular e no núcleo como uma chaperona de histonas, principalmente em regiões de repetição de heterocromatina³¹⁻³⁵.

DAXX desempenha importante função como um regulador ou repressor de transcrição, assim como nas modificações de cromatina, decorrente de sua interação com Histonas deacetilases (HDACs), DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e Proteína quinase de interação a homeodomínio 2 (HIPK2), uma serina/treonina quinase que interage com fatores de transcrição do tipo *homeodomain*, e outros fatores de transcrição como o p53³⁶. DAXX também interage com a proteína USP7 (ubiquitin specific peptidase 7), com papel fundamental na estabilização do proto-oncogene MDM2 responsável por degradar o p53 por ubiquitinação³⁷.

DAXX se associa fisicamente com o núcleo de histonas dos nucleossomos, principalmente com as histonas H3 e H4^{38, 39}. Através de seu domínio HBD é capaz de distinguir pequenas variações de aminoácidos entre as variantes de histona H3.1 e H3.3, sendo uma chaperona específica para a variante H3.3 e esta interação ocorre independente de outras proteínas³⁴.

2.3. A variante de histona H3.3

As histonas estão presentes no interior do nucleossomo e são alvos de modificações epigenéticas. Existem dois tipos de histonas, canônicas e não-canônicas. As histonas canônicas são altamente expressas durante a fase S do ciclo celular, e orquestram a produção de nova cromatina. Em contraste, histonas não canônicas possuem seu pico de expressão fora da fase S do ciclo celular e desempenham papel na substituição das histonas canônicas no nucleossomo⁴⁰.

Variantes de histona H3 são as histonas mais importantes, pois podem se depositar em regiões específicas da cromatina durante a replicação. Entre as variantes de H3, uma em particular é alvo de diversos estudos, a histona não canônica H3.3 que se difere por cinco aminoácidos da histona canônica H3. Essa variante tem sido descrita evolutivamente em organismos desde

T. thermophila, *D. melanogaster* a *Homo sapiense*. Nos sapos (*Xenopus laevis*), demonstrou-se que a H3.3 é importante na memória epigenética para ativação e agregação de genes durante o remodelamento da cromatina antes da primeira replicação zigótica. Em *C. elegans*, H3.3 foi associada com o silenciamento do cromossomo X, cuja deleção leva a modificações pós-traducionais⁴¹. Em humanos, a variante H3.3 é produzida por dois genes independentes: *H3F3A* e *H3F3B*. Os dois genes diferem na sequência de DNA de seus promotores, no entanto, as proteínas codificadas são idênticas, apresentando a mesma sequência de aminoácidos. Ainda em humanos adultos, *H3F3A* e *H3F3B* possuem expressões similares, agem conjuntamente mantendo o nível basal da H3.3. Porém a exata contribuição de cada variante não é conhecida. A H3.3 possui um papel importante no desenvolvimento, manutenção e replicação de regiões específicas da cromatina⁴²⁻⁴⁵.

A histona H3.3 foi associada a diferentes modificações da cromatina, como: marcador de ativação em regiões intergênicas regulatórias (*enhancers*), como H3K27ac e como marcador de repressão em regiões da heterocromatina, como a H3K9me3⁴⁶. No entanto, a H3.3 é enriquecida na eucromatina, e seu depósito é observado em regiões ricas em repetições como a região pericêntrica e a região de heterocromatina telomérica. A deposição de H3.3 é dependente do complexo tipo SWI/SNF, em que o remodelador de cromatina ATRX comanda sua localização nos telômeros com a ajuda da chaperona de histona, DAXX^{47, 48}. (Figura 1)

Figura 1. Funcionamento do complexo ATRX-DAXX em regiões de heterocromatina. ATRX liga-se à modificação H3K9me3 da histona presente no nucleossomo da região heterocromática. Essa interação recruta DAXX, que traz a histona H3.3. A H3.3 é incorporada no nucleossomo recém formado, mantendo os padrões epigenéticos anteriores a este ciclo de replicação. Nos telômeros, esse complexo pode ser o principal responsável por manter a estrutura da cromatina.

2.4. Telômeros

Localizados ao final dos cromossomos, os telômeros são estruturas nucleoproteicas especializadas que atuam tanto na estabilidade cromossômica como também na organização nuclear. São estruturas formadas por sequências de heterocromatina repetitivas não codificantes altamente

conservadas em organismos eucariotos. Os telômeros apresentam configuração de dupla fita, e por conta desta repetição de suas bases, a fita modelo é rica em guaninas (fita G) e a fita complementar é rica em citosinas (fita C). Em humanos são sequências do tipo T_2AG_3/C_3TA_2 que se repetem alguns milhares de pares de bases. Contudo, o extremo 3' da fita G se encontra em forma de fita simples. Essa configuração propicia a formação de estruturas mais complexas, como a *G-quartet*, onde as guaninas ligam-se umas às outras através de ligações de hidrogênio bastante estáveis. A junção de duas ou mais *G-quartets* formam os G-quadruplexes (G4), onde as fitas G se arranjam tridimensionalmente em quadrado, estabilizados por um centro composto por cátions monovalentes⁴⁹. Acredita-se que essa organização tridimensional tem grande importância no metabolismo e proteção dos telômeros, pois facilita a ligação de estruturas responsáveis por controlar o acesso de determinados substratos aos telômeros durante o processo de síntese e extensão destes^{25-27, 50, 51}.

As estruturas G4, por sua vez, parecem regular a ação de diversas enzimas atuantes na regulação do alongamento dos telômeros, incluindo a telomerase, principal enzima envolvida na síntese da sequência telomérica. A telomerase é um complexo ribonucleoproteico composto por dois componentes: a transcriptase reversa da telomerase (TERT), responsável pela ação enzimática; e o componente RNA da telomerase (TERC) que serve como molde para a extensão dos telômeros. A expressão de TERT e consequentemente a ação da telomerase é altamente regulada em células somáticas. Deleções em *TERT* foram amplamente associadas a encurtamento dos telômeros, instabilidade genômica, fusão telomérica, assim como senescência celular. Em contrapartida, a hiperexpressão de *TERT* causou importante aumento no tempo de vida útil de células murinas através da indução da expressão dos supressores de tumor *TP53* e *TP16*, que atuam no controle do ciclo celular⁵². Ainda, a configuração da extremidade 3' da fita molde impede a completa síntese durante a replicação cromossômica, causando uma diminuição gradual do tamanho da sequência telomérica a cada ciclo replicativo.

Assim sendo, adiciona-se às funções primordiais dos telômeros o controle da replicação celular, por todo seu papel no recrutamento da maquinaria de replicação e reparo celular.

2.5. O papel do complexo remodelador de cromatina na manutenção dos telômeros

O complexo remodelador ATRX-DAXX atua como um importante complexo para deposição de histona H3.3, e está envolvido na progressão da replicação assim como na renovação e estabilização da cromatina, principalmente em regiões de heterocromatina como os telômeros^{11, 53, 54}. Já é bem descrito a diminuição dos telômeros a cada ciclo replicativo e, quando esta diminuição atinge certo limiar, a células entram em processo de senescência⁵⁵⁻⁵⁷. Acredita-se que o complexo ATRX-DAXX-H3.3 atue na manutenção da estrutura telomérica por preservar a deposição de histonas na heterocromatina desta região. O recrutamento de DAXX à região se dá, provavelmente, pelo reconhecimento da modificação pós-traducional H3K9me3 por ATRX via domínio ADD. DAXX por sua vez carrega uma histona H3.3 para a região a fim de repor esta histona ao core dos nucleossomos após a fase S do ciclo celular. Este mecanismo tem papel central na manutenção da estrutura telomérica durante sua replicação^{49, 58-60}.

Os telômeros sofrem modificações em sua estrutura com o passar do tempo, podendo gerar sinais de dano no DNA à célula, ativando vias de reparo de DNA capazes de levar à recuperação ou a morte da célula⁵¹. Alterações nesta via já foram descritas em alguns tipos tumorais, principalmente nos tumores malignos (10 a 20% deles apresentam mutações em ATRX e/ou DAXX), como por exemplo os tumores pancreáticos e também os astrocitomas, tipo de tumor mais incidente e com pior prognóstico do Sistema Nervoso Central (SNC)⁶¹⁻⁶⁵. Nestes, mutações em ATRX e/ou DAXX levaram a danos na manutenção da estrutura telomérica e por conseguinte levaram a ativação de uma via de alongamento alternativo dos telômeros (ALT) capaz de manter indefinidamente o potencial replicativo celular⁶⁶⁻⁷³. Em outros tipos tumorais do

SNC que não apresentam mutações no complexo ATRX-DAXX, como os meningiomas, o papel do complexo ainda não está bem estabelecido.

2.6. Envelhecimento

O envelhecimento é o processo fisiológico caracterizado pela progressiva perda funcional do organismo como um todo, ao longo do tempo, podendo ocasionar patologias derivadas à progressão da idade. Pela complexidade deste processo, foram definidos marcos que contribuem conjuntamente para a evolução do envelhecimento. Um dos principais é a instabilidade genômica, caracterizada pelo acúmulo de danos ao material genético, uma vez que a integridade e estabilidade do DNA são continuamente agredidas por fatores exógenos físicos, químicos e agentes biológicos, além de fatores endógenos como os erros durante a replicação celular e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Diferentes tipos de lesões podem afetar o DNA, como mutações, translocações, perda e ganho cromossômicos, sobretudo o encurtamento dos telômeros⁷⁴.

Por sua vez, o encurtamento dos telômeros pode levar as células ao processo de senescência, uma das características primordiais do processo de envelhecimento. Estas células se encontram em estado permanente fora do ciclo de replicação celular em resposta aos diferentes estímulos de dano, ativando cronicamente complexas vias de reparo de dano ao DNA (DDR), que envolvem diversos fatores como inibidores das proteínas envolvidas no ciclo celular (CDKs). Ainda, a indução da produção de proteínas de reparo como as quinases de serina/treonina ATM e ATR são ativadas a fim de bloquear a progressão do ciclo celular por estabilizarem p53 (proteína de tumor p53) e ativar a transcrição da proteína inibidora de ciclina dependente de quinase 1A (p21)⁷⁵. Interessantemente, células senescentes apresentam aumento na deposição da variante de histona H2A.X fosforilada (γ -H2AX), fundamental na sinalização do local do dano e recrutamento da maquinaria de reparo^{76, 77}.

2.7. Meningiomas

Meningiomas são tumores benignos originados das células aracnoides, ou meningoteliais, constituintes da meninge aracnóide que envolve o encéfalo e a medula espinal. São os tumores de maior incidência do SNC (37,6% de todos os tumores primários cerebrais) que apresentam desenvolvimento lento e podem ter diversos sítios de origem, como a convexidade cerebral, região parasagital, foixe cerebral entre outros⁷⁸. Acometem principalmente pacientes entre 40 e 70 anos de idade, além de serem mais comuns no sexo feminino. Diversos são os fatores de risco associados aos meningiomas, entre eles traumas e radiação ionizante. O tratamento padrão é baseado na ressecção total do tumor para evitar o risco de recorrência. Contudo, quanto mais alto o grau de malignidade, maior o índice de recorrência, sendo este de 38 e 78% em cinco anos nos meningiomas grau II e grau III, respectivamente, enquanto que no grau I este índice é drasticamente menor, cerca de 3%^{79, 80, 81}.

Os meningiomas são classificados de acordo com o grau de malignidade e a capacidade de invasão do tecido cerebral⁸². A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou, em 2016, os meningiomas em 3 graus:

- **Grau I:** níveis baixos de mitose, sem invasão do tecido cerebral, compreendendo os nove tipos histológicos, incluindo meningotelial, transicional, fibroso, psamomatoso, angiomatoso, microcístico, secretório, linfoplasmocítico e metaplásico, sendo que os tipos meningotelial, transicional e fibroso são os mais comuns. Os meningiomas de grau I tem alta frequência, cerca de 80-85% de todos os casos.

- **Meningotelial:** são organizados em formato de lóbulos, de diferentes tamanhos, separados por finos septos colágenos. As células possuem formato poligonal ou epitelióides, núcleo uniforme e ovalado, com cromatina suave e ocasionalmente centros hipopigmentados;
- **Transicional:** possui características tanto do tipo meningotelial como fibroso, com formação de espirais

celulares e podem apresentar corpos de psammoma (calcificações microscópicas);

- **Fibroso:** caracterizado por células com formato fusiforme, núcleos alongados e se organizam paralelamente umas às outras. Apresentam matriz extracelular com grande produção de colágeno⁸³;

- **Grau II (atípico):** maior taxa de mitoses (4 ou mais) com presença de invasão do tecido cerebral. Como critério classificatório adicional, pode apresentar ao menos três dos cinco principais marcadores de malignidade – alta celularidade, necrose, ausência de padrão de crescimento, presença de nucléolos e células pequenas com núcleos grandes. A frequência dos meningiomas grau II é de 15-20%;

- **Grau III (anaplásico/ maligno):** alta índice mitótico, presença de muitos fatores de malignidade, com frequência de 1-2% dos casos.

Molecularmente, 50% dos meningiomas esporádicos apresentam mutação ou perda do gene supressor tumoral da neurofibromatose 2 (*NF2*) no cromossomo 22. Meningiomas que apresentam *NF2* selvagem têm sido estudados através de técnicas de sequenciamento de nova geração e observaram-se mutações em genes como *KLF4*, *TRAF7*, *AKT1*, *SMO*, *PIK3CA*, *POLR2A*, *SUFU*, *SMARCB1* e *TERT*. As mutações na região promotora do gene *TERT*, são mais frequentes nos graus II e III e geralmente se associam à recorrência^{80, 84}. A caracterização do complexo ATRX-DAXX em meningiomas é escassa, havendo uma descrição de mutação no gene *ATRX* em apenas 6,9% dos casos de meningiomas e relato da manutenção da expressão de *DAXX*^{85, 86}. Não há trabalhos sobre o impacto do comprimento do telômero na tumorigênese dos meningiomas.

Dentro deste contexto, propõem-se caracterizar o complexo ATRX-DAXX no processo fisiológico de envelhecimento cerebral humano e na tumorigênese de meningioma.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral: Analisar a expressão do complexo ATRX-DAXX em duas condições do cérebro humano: no processo fisiológico de envelhecimento cerebral e processo patológico de tumorigênese.

Objetivos específicos:

- 1) Analisar e comparar a expressão gênica do complexo remodelador ATRX-DAXX durante o envelhecimento cerebral humano e na progressão tumoral de meningiomas;
- 2) Analisar e comparar a distribuição proteica de ATRX-DAXX em tecido cerebral humano e em meningiomas;
- 3) Analisar e comparar o comprimento do telômeros nas duas condições e correlacionar com os dados do complexo ATRX-DAXX.

3.1 Desenho experimental

- 1) Análise da expressão gênica

Os níveis de expressão gênica dos genes *ATRX* e *DAXX* foram analisadas através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), em amostras de tecido cerebral humano do lóbulo parietal superior de autópsias de indivíduos normais estratificados por idade, e amostras de meningiomas coletados durante o projeto Genoma Clínico (FAPESP-2001/12898-4) que compõem o biorepositório do grupo de pesquisa de Biologia Molecular e Celular do LIM15.

- 2) Análise da expressão e localização proteica

O nível de expressão proteica e a distribuição intracelular de ATRX e DAXX foram analisados por imunoistoquímica em material preparado em parafina e a co-localização de ATRX e DAXX foi analisada por imunofluorescência.

- 3) Análise do comprimento do telômeros

O comprimento do telômeros foi estudado através de qRT-PCR em amostras de cérebro normal e de meningiomas.

- 4) Os achados de expressão gênica de *ATRX-DAXX* nas duas condições foram analisados por testes estatísticos e foram comparados, assim como também foram correlacionados ao comprimento do telômeros nas duas condições.

4. JUSTIFICATIVA DOS GENES ALVOS

O complexo ATRX-DAXX apresenta papel relevante na manutenção fisiológica da estrutura telomérica, como descrito anteriormente. Desta forma, o complexo desempenha uma função primordial no controle da replicação celular, assim como no processo de senescência das células e da progressão tumoral. O conhecimento detalhado da função deste complexo e seus componentes auxiliará a compreensão dos mecanismos envolvidos nas diferentes situações, fisio e patológica do encéfalo humano, podendo prover dados inéditos na literatura. As amostras de tecido cerebral que compõem o biorepositório do grupo apresentam uma estratificação de idade variando de 36 a 98 anos, o que permitiu a execução do desenho experimental indagando as alterações de ATRX e DAXX no envelhecimento cerebral normal, i.e., sem alterações neuropatológicas. Igualmente, as amostras tumorais de meningiomas analisadas neste trabalho permitiram a indagação do papel deste complexo na progressão tumoral dos meningiomas por apresentar distribuição em diferentes graus de malignidade.

5. MÉTODOS

5.1. Caracterização das Amostras Biológicas

Cento e oito amostras de tecido cerebral coletadas nos procedimentos de autópsia do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP), sob aprovação da Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) (registro nº 941.792/13041), no período de 2014 a 2016 foram analisadas. Foram coletados fragmentos de cerca de 2x2mm de tecido cerebral do giro pós central do lobo parietal na área sensorial primária. Foram excluídos casos de morte por doenças neurodegenerativas, acidente vascular encefálico e doenças infectocontagiosas (AIDS e Hepatite C). Foram coletadas amostras de indivíduos com idades que variaram entre 36 e 98 anos (idade média de $63,74 \pm 16,42$ anos) e a estratificação por década de idade e gênero é demonstrada na Figura 2.

Figura 2. Distribuição etária das amostras de tecido cerebral. Estratificação por década de idade das amostras de tecido cerebral humano. <40 = 9; 41-50 = 16; 51-60 = 22; 61-70 = 23; 71-80 = 15; 81-90 = 17; e >90 = 6 casos. Quanto ao gênero seguiu-se a distribuição: <40 = 3 feminino (F), 6 masculino (M); 41-50 = 4 F, 12 M; 51-60 = 5 F, 17 M; 61-70 = 4 F, 19 M; 71-80 = 8 F, 7 M; 81-90 = 10 F, 7 M; e >90 = 5 F, 1 M.

As amostras biológicas de 91 casos clinicamente diagnosticados de meningiomas intracraniais foram coletadas durante o procedimento cirúrgico pela Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período de junho de 2000 a setembro de 2009. O termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado aos pacientes de acordo com o comitê de ética da FMUSP (registro nº 200/05) para doação das amostras. A distribuição dos casos correspondeu a 67 grau I [21 meningoteliais (M), 36 transicionais (T), 10 fibrosos (F)], 18 grau II e 6 grau III.

5.2. Congelamento do tecido biológico e extração de DNA/RNA tecidual

Os fragmentos de tecido fresco foram prontamente congelados em nitrogênio líquido, e armazenados em tubos criogênicos à -80°C. O processo de congelamento seguiu os padrões de cuidado para condição RNase free.

Os fragmentos congelados foram processados para extração de RNA e DNA tecidual pelo kit AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado para posteriores análises, e o RNA foi submetido à transcrição reversa para síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando reagente Superscript III, da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), seguindo-se o protocolo do fabricante. O cDNA foi diluído na concentração de 1:10 em tampão TE (Tris/EDTA), e armazenado em freezer -20°C, até o seu uso. A análise de concentração e pureza foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), considerando-se como índices satisfatórios entre 1.8 e 2.0 na relação 260/280nm. A integridade do RNA foi analisada utilizando RNA ScreenTape do equipamento TapeStation 422 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise de expressão dos genes, *ATRX* e *DAXX*, no tecido cerebral de autópsia foi realizado qRT-PCR com *primers* previamente desenhados de acordo com protocolo estabelecido no laboratório.

As sequências FASTA, correspondentes ao mRNA dos genes, foram obtidas através da base de dados *Gene*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Com o propósito de checar a expressão gênica, os pares de *primers* foram desenhados de forma que o produto a ser amplificado estivesse no intervalo de pelo menos uma junção de éxons. Para obter a posição das bases das junções, recorreu-se ao Blat, ferramenta do *UCSC Genome Bioinformatics* (Kent Informatics, EUA). Além deste, os critérios utilizados para desenho dos *primers* foram: **I)** maior proximidade da extremidade 3' do gene, evitando-se produtos com distância maior que 3.000 pares de bases (pb) da mesma; **II)** proporção CG em torno de 50% do total de bases; **III)** *primers* com tamanho entre 18-25pb; **IV)** temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, com diferença preferencialmente de até 1°C entre os pares; **V)** limite de 3 bases repetidas em sequência; **VI)** ausência de estruturas secundárias como “*hairpins*”, homo e heterodímeros; e **VII)** amplificação de um produto de tamanho entre 80-130pb. Todos estes critérios tiveram como objetivo garantir a eficiência e especificidade da reação. Foi utilizado o programa Primer Express 3.0 para checagem de temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção de CG. Os *primers* desenhados tiveram sua especificidade checada pelo *Blat* e *Blast-n*, do NCBI. As sequências de *primers* específicas para cada gene estudado, confirmados pelo RefSeq foram sintetizadas pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, EUA) para *ATRX* e pela IBIOTECH (*IBIOTECH Pesquisa e Desenvolvimento LTDA*, Brasil) para *DAXX*.

As características destes primers estão especificadas na Tabela 1. Foi realizada a otimização dos *primers* quanto à concentração de uso, determinada pelo menor *cycle threshold* (Ct); curva de eficiência de amplificação; seguida de cálculo de eficiência pela fórmula $E = (10^{-1/slope}) - 1$, utilizando-se os dados de *slope* fornecidos pelo programa do aparelho de PCR. Foram testadas as

concentrações de 100nM, 200nM e 400nM de ambos *primers* em uma amostra composta por um pool de tecido cerebral total. Para o teste de eficiência dos *primers*, foi realizada diluição seriada do pool concentrado como se segue: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Foi realizada uma segunda otimização para o primer *DAXX*, nas mesmas concentrações, porém em um pool de tecido testicular, uma vez que a eficiência do *primer* em pool de tecido cerebral total se mostrou baixa.

Foi utilizado *Maxima SYBR Green* com ROX (Thermo Fisher) para as reações de amplificação no equipamento *ABI Prism 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). As configurações do equipamento foram ajustadas de acordo com as condições do fabricante: 2 minutos a 50°C (pré-aquecimento inicial), 10 minutos a 95°C (desnaturação), 40 ciclos de 95°C (15 segundos cada) e 1 minuto a 60°C.

Cada reação de PCR foi realizada em duplicatas, contendo valor final de 12µl cada, sendo 6 µl de *Maxima SYBR Green*, 3 µl de cDNA e 3 µl de solução de primers na concentração otimizada de 200nM para ambos os primers. Os valores de Ct foram obtidos a partir de *threshold* de 0.1 e calculados, em cada duplicata, como média aritmética. Foi aceito desvio padrão menor ou igual a 0.4. A reação foi repetida toda vez que o desvio padrão da duplicata ultrapassou este valor.

O cálculo de expressão absoluta dos dois genes foi realizado através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo ΔCt o Ct do gene analisado menos a média geométrica dos genes de referência. Para a normalização foram utilizados dois genes de referência: Glucuronidase beta (*GUSB*) e proteína de ligação ao TATA Box (*TBP*), que são genes constitutivos com expressão semelhante entre diversos tecidos, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Características dos *primers* *ATRX* e *DAXX* e dos genes de referência.

Gene	Tamanho do produto gerado (pb)	Primer:	Concentração (nM)	Eficiência (%)
ATRX	100	foward 5'-3' (F) reverse 5'-3' (R) F: TGGTGAAGGAAATGTGGATGA R: GCTGGGCTGCTTGGATTAGA	200	96
DAXX	108	F: TCACAACTGGGGAGATTCTGG	200	93

Tabela 1. Características dos *primers* *ATRX* e *DAXX* e dos genes de referência.
Continuação

Gene	Tamanho do produto gerado (pb)	Primer:	Concentração (nM)	Eficiência (%)
R: ACTGACCTTTGCCTTTCCACAT				
Genes de Referência				
TBP	98	F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT	200	100
GUSB	101	F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	400	98

5.4. Análise da expressão gênica de *ATRX*-*DAXX* nos meningiomas

As expressões gênicas de *ATRX* e *DAXX* foram analisadas nos dados gerados pelo sequenciamento de nova geração (NGS) na plataforma Illumina NextSeq 500 (Illumina, SanDiego, CA, USA) no centro multi-usuário Sequenciamento em Larga Escala (SELA), da FMUSP, através de QuantSeq 3' mRNA-Seq (Lexogen, Vienna, Austria)⁸⁷.

5.5. Análise da expressão proteica de *ATRX* e *DAXX*

A positividade, localização, intensidade de imunomarcacão e a localização intracelular das proteínas *ATRX* e *DAXX* foram analisadas no tecido cerebral de 10 casos representativos de autópsia de diferentes faixas etárias (<40 anos = 3 casos; 41-50 = 2 casos; 71-80 anos= 2 casos; 81-90 anos = 1 caso; >90 anos = 2 casos). Foram preparadas lâminas com cortes de 4 µm de espessura a partir de blocos de parafina. A avaliação proteica dos casos de meningiomas foi realizada em preparado de *tissue microarray* (TMA) com 55 casos de diferentes graus de malignidade (GI = 43 casos, sendo: 8 M, 27 T e 8 F; GII/GIII = 12 casos, sendo 9 GII, e 3 GIII). Foram retiradas três áreas representativas de 0.6mm de diâmetro de cada caso, assim como tecidos não-neoplásicos utilizados como controles.

Foi utilizado o kit NOVOLINK™ para as reações de imunohistoquímica, de acordo com o seguinte protocolo: processo de desparafinização (banhos de

xilol seguidos de lavagens com álcool em soluções decrescentes: 100%, 90%, 80% e 70%), hidratação do tecido com água destilada, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio de reações inespecíficas e incubação com os anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-ATRX (ab97508, Abcam, diluição 1:800 – para os casos de tecido cerebral de autópsia – e 1:100 - para os casos de meningioma-, pH 6.0), anticorpo monoclonal de camundongo anti-DAXX (amab91191, Sigma-Aldrich, diluição 1:150 – para tecido cerebral de autópsia – e 1:25 – para os casos de meningioma -, pH 9.0), por uma noite à temperatura de 4°C. No segundo dia foi realizada a incubação com polímero (Leica Biosystems Newcastle Ltd, kit NOVOLINK™, Ref: RE7112, Lote: 6019720), seguida de revelação do complexo antígeno-anticorpo com DAB (cromógeno que atribui cor amarronzada à marcação) e contra coloração dos núcleos celulares com hematoxilina de Harris. Todas as etapas foram seguidas de lavagens com solução de PBS 1x concentrado acrescido de 0,05% de Tween. As lavagens que se seguiram as etapas de Recuperação Antigênica e de coloração por hematoxilina foram realizadas com água destilada. Como última etapa foi realizada lavagem com água amoniacal 0.4%, para suavizar a coloração do núcleo e facilitar a leitura da reação nuclear. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em lavagens sucessivas em soluções de álcool com concentrações crescentes, de 70% a 100%, e diafanizadas em xilol. As lâminas foram montadas com *Entellan*® e lamínula, e observadas ao microscópio para análise dos resultados.

A análise de imunomarcação dos casos de autópsia foi realizada de forma semi-quantitativa. As lâminas foram analisadas em quatro campos individuais de acordo com a porcentagem de células marcadas e a intensidade da marcação, sendo que: 0 = negativo, 1 = marcação fraca, 2 = marcação moderada, 3 = marcação forte. As análises foram realizadas por dois investigadores independentes (SGC e SKNM) e revisões simultâneas foram feitas para determinação do escore de marcação final nos casos de leituras não concordantes. Foram realizadas reações para identificação de astrócitos (Anti-GFAP para astrócitos. Z0334, policlonal de coelho, diluição 1:500, pH 6.0. Agilent Dako, Santa Clara, CA) e de células micróglia (anti-IBA1, 019-19741,

policlonal de coelho, diluição 1:1000, pH 6.0. Wako Pure Chemical Industries Ltda., Osaka, Japan) para confirmação da leitura específica dos alvos do estudo no compartimento neuronal. A certificação da abundância proteica no tecido em estudo ao longo da idade foi realizada pela marcação da proteína *housekeeping* β -actina (Anti-Beta actina, A2228, monoclonal de camundongo, diluição 1:500, Sigma Aldrich), com a qual foi comparada a imunomarcação de ATRX e DAXX.

A análise da imunomarcação dos casos de meningioma, foi realizada através do *plugin Colour Deconvolution* do *software* ImageJ (NIH, Bethesda, USA), que separa as cores da reação e contabiliza a quantidade de marcação em determinada cor. O valor da intensidade de marcação foi obtido pela diferença entre a ausência total de marcação (fundo branco) e a presença de marcação de DAB na imagem (coloração marrom). As imagens foram tratadas a fim de neutralizar o fundo e a iluminação do campo foi mantida estável para todas as capturas das imagens utilizando o *software* NIS-Elements Viewer (Nikon Instruments, Tokyo, Japan). Todas as fotomicrografias foram obtidas em magnificação de 400x.

5.6. Imunofluorescência e análise de co-localização

A distribuição das proteínas ATRX e DAXX nos compartimentos celulares também foi analisado através de imunofluorescência de células em cultura. Esta análise foi realizada em células de linhagem tumoral devido a importante autofluorescência detectada nas amostras de cérebro de autópsia, o que gerou muitas dificuldades na análise da dupla marcação. A linhagem celular de glioma utilizada foi a A172, adquirida do ATCC, por apresentar expressão homogênea para ambos os genes, ATRX e DAXX. A linhagem foi autenticada pelo sistema de análise de pequenas repetições do tipo tandem GenePrint 10 (Promega, Madison, WI). As células foram cultivadas em monocamada com meio de cultura Dulbecco Eagle modificado de (Thermo Fisher Scientific), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

As células foram fixadas usando metanol e acetona (1:1). A membrana celular foi permeabilizada com Triton-X-100 (0,1%), o bloqueio foi realizado com 2% de albumina de soro bovino e 10% de soro de cabra. Os anticorpos primários utilizados foram anti-ATRX (ab97508; Abcam, policlonal de coelho, diluição 1: 2000) e anti-DAXX (amab91191, Sigma–Aldrich, monoclonal de camundongo, diluição 1: 200) que foram incubados por 15 horas a 4°C. Anticorpos secundários, anticorpo anti-imunoglobulina G (IgG) de coelho H&L (Alexa Fluor 488) e anticorpo anti-IgG de camundongo H&L (Alexa Fluor 568) foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (Thermo Fisher Scientific). A preparação foi analisada em microscópio confocal Zeiss 780-NLO (Thornwood, NY).

As imagens recuperadas foram analisadas para o teste de co-localização de ATRX e DAXX através do Teste de Co-localização do plugin Coloc 2 do software ImageJ/Fiji⁸⁸, de acordo com Método de Mander, baseado no coeficiente de correlação de Pearson excluindo os valores de intensidade média, gerou-se um coeficiente de sobreposição de Manders (MOC) variando de 0 (não co-localizado) para 1 (co-localização total). A análise foi realizada em triplicata, sendo que os valores apresentados foram correspondentes à média $\pm$ desvio padrão para cada proteína.

5.7. Análise do tamanho dos telômeros

A análise do comprimento do telômero foi baseada no protocolo de Cawthon, utilizando as referidas sequências de primers⁸⁹ protocolo de PCR quantitativo (qPCR) através do sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Essencialmente, 20 ng de DNA foram misturados a um SYBR (Power SYBRTM Green PCR Master Mix – Thermo Fisher Scientific) contendo os componentes necessários para a reação (polimerase, dNTPs, íons, intercalante com fluoróforo), além dos primers. Um gene de cópia única *RPLP0* (homólogo humano do gene *36B4*), que codifica uma proteína ribossomal, foi usado como *housekeeping*. A reação de amplificação consistiu de: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 54°C (para os primers

teloméricos) ou 58°C (para os primers de RPL0), 45 segundos a 72°C; 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C. A eficiência dos primers foi testada pela curva padrão com diluições seriadas de amostra de DNA controle. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos quando o desvio padrão ultrapassou 0.4. O comprimento dos telômeros foi calculado pela fórmula: $[2^{\text{mean Ct (telômeros)}} / 2^{\text{mean Ct (RPL0)}}] - 1 = 2^{-\Delta\text{Ct}}$.

5.8. Análises Estatísticas

Para as comparações estatísticas dos tecidos cerebrais de autópsia, a casuística foi dividida em dois grupos principais: amostras de indivíduos acima e abaixo de 65 anos de idade. Já para os casos de meningioma, a casuística foi dividida de acordo com o grau de malignidade: GI (Meningotelial, Transicional e Fibroso) e GII/GIII.

As análises foram realizadas no programa SPSS versão 15.0 (IBM) e GraphPad Prism versão 5.0 (SanDiego, CA, USA), iniciando-se pela avaliação da normalidade dos resultados (paramétrico e não paramétrico) através do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste *Mann-Whitney*, para resultados não paramétricos, sendo considerado significativo diferenças menores que 0,05 ($p < 0,05$). Ainda, para análises de resultados não paramétricos com mais de dois grupos foi utilizado teste *Kruskal-Wallis* com teste *post hoc* de *Dunn*. Para verificar o grau de associação entre as expressões dos genes *ATRX* e *DAXX*, foi aplicado o teste de Correlação de *Spearman*, para distribuição não paramétrica ou *Correlação de Pearson* para distribuição paramétrica. Os gráficos de dispersão para demonstração da distribuição dos níveis de expressão de ambos os genes e gráfico de correlação foram construídos pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 Análise do complexo ATRX-DAXX no processo de envelhecimento do tecido cerebral

a. Estratificação das amostras por grupo etário

O número de casos por década não foi suficiente para uma análise estatística. Desta forma, as amostras de tecido cerebral de autópsia foram divididas em dois grupos: abaixo e acima de 65 anos. Compuseram o grupo abaixo de 65 anos (<65) 50 casos, e o grupo acima de 65 anos (>65) contaram com 58 casos. Esta idade foi escolhida seguindo-se o critério da Organização Mundial de Saúde (OMS), que classifica como idoso o indivíduo acima dos 65 anos de idade para os países em desenvolvimento⁹⁰.

b. Análise da expressão gênica e proteica de ATRX e DAXX diminuem com a idade

Os níveis de expressão de *ATRX* e *DAXX* diminuíram significativamente com envelhecimento (*ATRX* $p < 0,0001$ e *DAXX* $p = 0,0033$) (Figura 3A). A média das expressões gênicas de jovens/idosos foi 2,19 para *ATRX* e 1,24 para *DAXX*, mostrando maior magnitude de diferença da expressão de *ATRX* do que de *DAXX* entre os dois grupos. Além disso, os níveis de expressão de ambos os genes se correlacionaram positivamente através do teste de Spearman-rho ($r = 0,491$, $p < 0,0001$) (Figura 3B).

Figura 3. Expressão gênica do complexo ATRX-DAXX no tecido cerebral humano. A: Expressões de *ATRX* e *DAXX* em tecidos cerebrais humanos acima e abaixo de 65 anos de idade por qRT-PCR com valores representados nos diagramas de caixa de Tukey, onde as barras representam o valor médio de cada grupo e os pontos pretos, os *outliers*. O teste de Mann-Whitney mostrou diferenças estatísticas entre os dois grupos para ambos os genes (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$). **B:** Correlação significativa de *ATRX* e *DAXX* ($r = 0,491$, $p < 0,0001$, teste de correlação de Spearman-rho).

Uma diminuição significativa em *ATRX* e *DAXX* também foi observada ao nível de proteína, considerando os casos abaixo e acima de 65 anos de idade (Figura 4A, B). As expressões de ambas proteínas foram quantificadas em células neuronais, nos compartimentos citosólico e nuclear, com imunorreação predominante no núcleo e no nucléolo, mas também presente no citosol, estendendo-se para a projeção axonal, que foi mais evidente para *ATRX*. Particularmente, a imunomarcção nuclear diminuiu com o envelhecimento para ambas as proteínas, notavelmente para *ATRX* (Figura 4B). Para prova da especificidade da marcação em neurônios, as marcações proteicas foram comparadas em astrócitos e micróglia. O reconhecimento do compartimento neuronal foi realizado comparando-se o tamanho dos núcleos, sendo maior nos neurônios. (Figura 5) A redução da imunomarcção das proteínas não foi consequente ao decréscimo geral do conteúdo proteico durante o envelhecimento, demonstrado pela manutenção da abundância β -actina, uma proteína estrutural de referência, nos dois grupos etários (Figura 5).

Figura 4. Expressões e localizações proteicas de ATRX e DAXX nas amostras de tecido cerebral de autópsia. **A:** Imunoistoquímica de ATRX e DAXX em 10 espécimes representativos de cérebro humano embebidos em parafina. Observou-se declínio das expressões das proteínas ATRX e DAXX em casos acima de 65 anos quando comparados com o grupo abaixo de 65 anos. As setas pretas indicam a positividade nos núcleos, nucléolo e projeções citoplasmáticas dos neurônios. Ampliação 600x. **B:** O histograma mostra a porcentagem de células positivas nos compartimentos nucleares (N) e do citosólico (C) para ATRX e DAXX nos dois grupos etários. Uma diminuição significativa da imunomarcção foi observada em idosos para ambas as proteínas. Escore de intensidade de imunomarcção 0: ausência, 1: leve, 2: moderado e 3: intensa.

Figura 5. Identificação dos diferentes compartimentos celulares cerebrais e manutenção da abundância proteica nos dois grupos etários. Imunomarcações de GFAP para astrócitos e IBA1 para micróglia em casos representativos dos dois grupos: <65 e > 65 anos. * apontam neurônios, e pontas de seta apontam astrócito e micróglia, respectivamente. A imunomarcação com intensidade similar nos dois grupos etários com β -actina, uma proteína estrutural de referência, demonstrou a manutenção da abundância proteica nos dois grupos etários.

c. Co-localização de ATRX e DAXX

A análise de co-localização realizada na linhagem celular de glioma maligno, A172. Observou-se a presença de ATRX ($\text{MOC} = 0,73 \pm 0,28$), e DAXX nos núcleos celulares ($\text{MOC} = 0,68 \pm 0,28$), com taxa de co-localização alta ($\text{MOC} = 0,93 \pm 0,10$). (Figura 6)

Figura 6. Co-localização das proteínas ATRX e DAXX nos núcleos celulares. Imunofluorescência em dupla marcação para DAXX (vermelho) e ATRX (verde) em células de glioma A172, demonstrando a co-localização de ambas as proteínas no núcleo. Núcleo foi corado em azul com 4',6-diamidino-2-fenilindol. Ampliação 400x.

d. Comprimento dos telômeros e correlação com os níveis de expressão de *ATRX* e *DAXX*

O comprimento dos telômeros foi significativamente menor nos idosos acima de 65 anos ($p=0,0490$) (Fig.7A) e, portanto, correlacionado negativamente com o envelhecimento ($r=-0,233$, $p=0,0473$). Observou-se uma diminuição do comprimento dos telômeros nos casos com hipoexpressão de *ATRX* ($r=0,206$, $p=0,0528$). Adicionalmente, menor comprimento de telômeros foi observado em casos com hipoexpressão de *ATRX* combinada com hipoexpressão de *DAXX*. (Figura 7B). A média do tamanho do telômero nestes casos foi de 6,566, 56% menor comparado aos casos com hiperexpressão de *ATRX* combinada com hiperexpressão de *DAXX*, que foi de 9,801.

Figura 7. Tamanho do telômero e correlação com o complexo ATRX-DAXX. A: O grupo idoso (>65) apresentou menor comprimento do telômero em comparação com casos abaixo de 65 anos ($p<0,05$, Teste de Mann-Whitney). **B:** A correlação de idade x comprimento do telômero foi estatisticamente significativa ($r= -0,233$, $p= 0,0473$, teste Spearman rho). Amostras com baixa expressão dos genes *ATRX* e *DAXX* (pontos amarelos) preponderaram entre os idosos (>65 anos) com menor comprimento do telômero ($r= 0,078$, $p= 0.648$).

No entanto, somente a expressão de *DAXX* comparado ao comprimento do telômeros não foi significativo ($r = 0,098$, $p = 0,3605$). (Figura 8)

Figura 8. Correlação do tamanho do telômero com as expressões de *ATRX* e *DAXX*. Os comprimentos do telômeros se correlacionaram com os níveis de expressão de *ATRX* com valor estatístico quase significativo ($r = 0,2060$, $p = 0,0528$) (A), mas não houve correlação com a expressão de *DAXX* ($r = 0,098$, $p = 0,3605$, teste de Spearman-rho).

Em resumo, foram observadas diminuições significativas das expressões gênica e proteica de *ATRX* e *DAXX* em amostras de substância cinzenta do lobo parietal de autópsia de indivíduos normais com mais de 65 anos de idade comparados àqueles com menos de 65 anos de idade. A diferença dos níveis de expressão de *ATRX* foi mais relevante comparada aos de *DAXX*. O comprimento do telômeros diminuiu com a idade e observou-se uma tendência de correlação com os níveis de expressão de *ATRX*.

6.2 Análise do complexo *ATRX*-*DAXX* no processo de tumorigênese dos meningiomas

a. Distribuição dos casos estudados

Foram analisados 91 pacientes clinicamente diagnosticados com meningioma (62 mulheres/29 homens; relação 2,13:1,0) com idades variando de 27 a 80 anos ($54,8 \pm 13,7$ anos), acompanhados por 100 ± 40 meses. Foram incluídos 67 casos benignos grau I (GI), sendo 21 meningoteliais (M), 36 transicionais (T) e 10 fibrosos (F), 18 casos atípicos grau II (GII) e 6 casos anaplásicos/malignos grau III (GIII).

b. Expressões gênica e proteica do complexo ATRX-DAXX na progressão tumoral dos meningiomas

A expressão dos genes que codificam para ATRX e DAXX foram analisados em todos os 91 casos de meningiomas. Foi observado aumento significativo do nível de expressão de *ATRX* nos meningiomas de alto grau (GII/GIII) quando comparados aos meningiomas de baixo grau (GI) ($p=0,035$) (Figura 9A). Embora tenha sido observada maior dispersão da expressão do gene *DAXX* nos meningiomas de GII/GIII com presença de casos com expressão aumentada em comparação com GI, não se observou diferença estatística entre os grupos ($p=0,497$) (Figura 9B). A expressão de *ATRX* foi significativamente maior em amostras de meningiomas de pacientes do gênero masculino ($p=0,009$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas expressões de *ATRX* ou *DAXX* quanto à idade ou status de recorrência.

Figura 9. Expressões dos genes *ATRX* e *DAXX* em GII/GIII em comparação com meningiomas GI. A expressão de *ATRX* foi significativamente maior nos meningiomas GII/GIII ($p = 0,035$) (A), e não houve diferença significativa na expressão de *DAXX* entre os dois grupos (B).

A análise da expressão proteica de ATRX e DAXX foi realizada em 55 casos de meningiomas (Figura 10A). As expressões de ATRX e DAXX foram detectadas no núcleo e no citoplasma, sendo significativamente maiores em GII/GIII em relação aos meningiomas GI ($p=0,0005$, e $p=0,028$,

respectivamente), no entanto não se observou diferenças nas marcações entre os subtipos histológicos (M, T e F) nos meningiomas GI (Figura 10B).

c. Análise do comprimento dos telômeros nos meningiomas

Foi observada baixa variação no comprimento dos telômeros de meningiomas, independentemente da idade ($r = -0.093$, $p = 0.540$) (Figura 11A) ou grau de malignidade. (Figura 11B)

Figure 11. Tamanho do telômero em meningiomas. **A:** Observou-se baixa variabilidade do comprimento dos telômeros nos meningiomas, independentemente da idade ($r = -0,093$, $p = 0,540$). Pontos vermelhos representam meningiomas GII/GIII. **B:** Histograma demonstrando a variação do tamanho do telômeros nos subtipos histopatológicos dos meningiomas GI em comparação com os meningiomas GII/GIII.

Neste estudo, observamos um aumento significativo da expressão de ATRX nos níveis gênico e proteico, e um aumento do nível de expressão da proteína DAXX em GII/GIII em comparação com meningiomas GI. Foi observada ainda, a manutenção do comprimento do telômero nos diferentes graus de malignidade tumoral.

Figura 10. Imunoistoquímica de ATRX e DAXX em diferentes graus de meningiomas. A: A imunomarcapção positiva para ATRX e DAXX foi observada nos núcleos e citoplasma, sendo maior em GII/GIII comparado aos meningiomas GI, principalmente nos núcleos ($p=0,0005$ para ATRX, e $p=0,028$ para DAXX). Imagens representativas dos subtipos histopatológicos GI meningoteial (M), transicional (T) e fibroso (F); meningiomas atípicos (GII) e malignos (GIII) são apresentados com aumento de 400x. **B:** O gráfico de dispersão com barras mostra o escore de intensidade de imunomarcapção das duas proteínas, ATRX e DAXX, nos grupos analisados.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou um decréscimo das expressões gênica e proteica do complexo ATRX-DAXX no tecido cerebral humano ao longo do envelhecimento.

De fato, descreve-se que a expressão de ATRX tem importante função na fase de desenvolvimento em diversos tecidos⁹¹, incluindo o tecido cerebral, onde o ATRX tem papel relevante no desenvolvimento cerebral normal, na organização cortical e no processo de mielinização⁹². Em tecido cerebral murino, ATRX desempenha função no desenvolvimento e manutenção da região hipocampal⁹³, sendo imprescindível para a cognição normal, incluindo a conservação do aprendizado e processamento da memória⁹⁴. Acredita-se que ATRX tenha papel na diferenciação dos neurônios e sua sobrevivência⁹⁵, principalmente em neurônios pós-mitóticos, que apresentam maior expressão de *ATRX* se comparado com as células progenitoras neurais (NPC's)⁹⁶. Embora a expressão nas NPC's seja menor, ATRX é requerido para sua replicação normal, por controlar a dinâmica cromossomal⁹⁷. Por ser um remodelador de cromatina da família SWI/SNF, ATRX pode se ligar às estruturas *G-quartet* quadruplexes do DNA e ajudar em sua manutenção e integridade^{29, 31}. A diminuição da expressão de ATRX em níveis gênico e proteico tem sido associada a defeitos na organização cromossômica, assim como em sua segregação durante a mitose e meiose celular⁹⁸⁻¹⁰¹. Em modelos animais, a depleção de ATRX em células embrionárias apresentaram instabilidade telomérica¹⁰². A diminuição da expressão de ATRX no tecido cerebral com a idade demonstrada no presente estudo sugere, portanto, uma perda progressiva da proteção da região telomérica.

ATRX interage com DAXX, a chaperona de histonas, associando-se fisicamente ao centro de histonas dos nucleossomos, controlando a acessibilidade cromatínica^{36, 37}. DAXX tem papel amplamente descrito na regulação da transcrição gênica devido as suas interações com fatores controladores da acessibilidade cromatínica, além de sua relevante função na resposta apoptótica por sua interação com a proteína quinase ativada por

mitogênio 5 (ASK1), fator atuante da via de sinalização de apoptose do receptor Fas¹⁰³. No tecido cerebral, descrevem-se alterações de suas funções em doenças neurológicas como Doença de Alzheimer¹⁰⁴, isquemia cerebral^{105, 106} e Doença de Parkinson¹⁰⁷ tanto *in vitro* como em modelos animais. A perda de DAXX associa-se a defeitos na deposição de histona H3.3, a anormalidades nas modificações da cromatina, com impacto na modulação de circuitos neuronais¹⁰⁸. Em modelos animais, a expressão de DAXX demonstrou-se ser tecido-específica e diminuiu com o aumento da idade no fígado, rins, coração, córtex e cerebelo¹⁰⁹. Os nossos resultados de decréscimo dos níveis de expressão gênica e proteica de DAXX no tecido cerebral humano com o envelhecimento corroboram estes achados prévios em modelos animais. E, sugerem uma consequente disfunção da deposição da histona com alteração da acessibilidade cromatínica.

O complexo ATRX-DAXX apresenta funções no agrupamento e estabilização da cromatina, e controle do processo de replicação regulando a forquilha de replicação. Este complexo atua principalmente nas regiões de heterocromatina como a heterocromatina telomérica, mantendo sua estabilidade através de interações epigenéticas com fatores de transcrição, marcações em caudas de histona, e mantendo o padrão de metilação do DNA^{55, 108, 110}. A redução concomitante e com correlação significativa de ATRX e DAXX apontam para uma disfunção deste complexo no tecido cerebral humano com o avançar da idade, sugerindo uma instabilidade na região telomérica.

De fato, no presente estudo foi observada a diminuição do tamanho dos telômeros no decorrer da idade, sugerindo uma associação desta redução no comprimento com a senescência celular e ao aumento gradual na sinalização de danos ao DNA como descrito anteriormente^{111, 112}. Interessantemente, os resultados na presente casuística demonstraram que os casos com baixa expressão de ATRX e DAXX se associaram ao menor comprimento de telômeros, corroborando a relação do complexo ATRX-DAXX, particularmente ATRX, na manutenção dos telômeros. Esta observação se alinha com os achados previamente descritos de aumento da sinalização de

dano ao DNA nos telômeros na ausência de ATRX^{70, 102}. Desta forma, a diminuição da expressão dos componentes do complexo ATRX-DAXX podem contribuir na perda da manutenção da estrutura telomérica e conduzir à perda neuronal levando a disfunção da aprendizagem e da memória e, finalmente, ao declínio cognitivo em idosos.

Por outro lado, este complexo ATRX-DAXX pode contribuir na replicação celular contínua levando à tumorigênese. De fato, mutações de ATRX e DAXX foram relatadas como fatores desencadeantes de alongamento alternativo dos telômeros (ALT – *Alternative Lengthening of Telomeres*) em alguns tipos tumorais^{113, 114}, incluindo tumores do Sistema Nervoso Central^{63, 73}. Em gliomas de alto grau, como os astrocitomas anaplásicos e glioblastomas primários, o aumento na expressão de ATRX causou impacto na sobrevida global dos pacientes, sendo associado a pior prognóstico, bem como resistência terapêutica^{115, 116}. Um aumento do nível de expressão de DAXX também foi relacionado ao aumento do ciclo celular, proliferação celular e, conseqüentemente, ao crescimento do tumor em gliomas de alto grau¹¹⁷. Adicionalmente, a presença de DAXX no citoplasma das células, conforme detectado no presente estudo, pode bloquear a apoptose^{33, 34}. A expressão de DAXX também foi maior em metástases em comparação com tumores primários de mama, próstata e cólon¹¹⁸. Da mesma forma, no câncer de ovário, a expressão aumentada de DAXX foi associada com aumento da tumorigênese, metástase e quimiorresistência¹¹⁹.

A manutenção do comprimento do telômero é essencial para que a célula continue se dividindo. Portanto, as células cancerosas podem utilizar a via da telomerase, onde se faz necessária a atuação do complexo ATRX-DAXX para preservar o comprimento dos telômeros, ou com ALT, um mecanismo de alongamento dos telômeros mediado por recombinação homóloga. ALT foi associada à perda de expressões ATRX e/ou DAXX, e foi observada em vários tipos de tumor, incluindo astrocitomas^{73, 120}, leiomiomas uterinos¹²¹, tumores neuroendócrinos pancreáticos¹²², sarcomas⁷² e neuroblastomas¹²³. Contudo, observamos com este estudo a presença de expressão do complexo ATRX-DAXX nos diferentes graus de meningiomas, sugerindo a presença deste

complexo protegendo os telômeros, o que foi corroborado pela baixa variabilidade do comprimento telomérico. O mecanismo ALT provavelmente não está ativado em meningiomas devido à ausência de telômeros longos. De fato, a via ALT pode estar reprimida pela elevada expressão de ATRX em meningiomas de alto grau como relatado anteriormente⁶⁶. O impacto da hiperexpressão de ATRX em meningiomas de alto grau deverá ser abordado em estudos adicionais para identificar as vias de sinalização implicadas na progressão maligna dos meningiomas.

Em resumo, os resultados deste estudo corroboraram o importante papel do complexo ATRX-DAXX no destino da célula por meio de sua interação com a estrutura telomérica (Figura 12). O aprofundamento na compreensão do papel do complexo ATRX-DAXX nos mecanismos funcionais no processo de disfunção cognitiva na senescência e no processo tumoral poderá contribuir para abordagens terapêuticas inovadoras nestas condições.

Figura 12. Papel esquemático do complexo ATRX-DAXX na estrutura telomérica. Ação do complexo ATRX-DAXX no envelhecimento fisiológico do cérebro, atuando no encurtamento do telômero em comparação com sua atuação na manutenção do telômero nos meningiomas.

8. CONCLUSÕES

- Observou-se menor expressão do complexo ATRX-DAXX nos tecidos cerebrais humanos de autópsia de indivíduos acima de 65 quando comparados aos tecidos dos indivíduos abaixo desta idade. Observou-se aumento da expressão de ATRX-DAXX nos meningiomas mais malignos (GII/GIII).
- Detectou-se menor expressão proteica de ATRX e DAXX nos neurônios de indivíduos com idade acima de 65 anos e maior expressão de ATRX e DAXX nos meningiomas GII/GIII.
- O comprimento do telômero diminuiu no tecido cerebral humano com o avanço da idade, enquanto manteve-se estável nos meningiomas independente do grau de malignidade.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*. 1984;311(5986):532-7.
2. Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6506-11.
3. Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet*. 2012;13(11):770-80.
4. Kulkarni M, Mukherjee A. Understanding B-DNA to A-DNA transition in the right-handed DNA helix: Perspective from a local to global transition. *Prog Biophys Mol Biol*. 2017;128:63-73.
5. Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:931-54.
6. Spagnol ST, Armiger TJ, Dahl KN. Mechanobiology of Chromatin and the Nuclear Interior. *Cell Mol Bioeng*. 2016;9(2):268-76.
7. Arimondo PB, Egger G, Tost J. Epigenetics. *Biochimie*. 2012;94(11):2191-2.
8. Mirabella AC, Foster BM, Bartke T. Chromatin deregulation in disease. *Chromosoma*. 2016;125(1):75-93.
9. Langst G, Manelyte L. Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction. *Genes (Basel)*. 2015;6(2):299-324.
10. Feser J, Tyler J. Chromatin structure as a mediator of aging. *FEBS Lett*. 2011;585(13):2041-8.
11. Maison C, Almouzni G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(4):296-304.
12. Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: the means to the end. *FEBS J*. 2011;278(19):3579-95.
13. He Q, Kim H, Huang R, Lu W, Tang M, Shi F, Yang D, Zhang X, Huang J, Liu D, Songyang Z. The Daxx/Atrx Complex Protects Tandem Repetitive Elements during DNA Hypomethylation by Promoting H3K9 Trimethylation. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):273-86.
14. Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(9):461-6.
15. Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. 2000;20(6):1899-1910.
16. Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*. 1995;80(6):837-45.
17. Tang P, Park DJ, Marshall Graves JA, Harley VR. ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(7):339-44.
18. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 1988 – . Acesso ATRX, Homo

sapiens; [citado mar 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/546>.

19. Sailau ZK, Bogolyubov DS, Bogolyubova IO. Nuclear distribution of the chromatin-remodeling protein ATRX in mouse early embryogenesis. *Acta Histochem.* 2017;119(1):18-25.
20. Tang Y, Wang J, Lian Y, Fan C, Zhang P, Wu Y, Li X, Xiong F, Li X, Li G, Xiong W, Zeng Z. Linking long non-coding RNAs and SWI/SNF complexes to chromatin remodeling in cancer. *Mol Cancer.* 2017;16(1):42.
21. Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(3):711-20.
22. Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* 2011;21(3):396-420.
23. Gibbons RJ, Bachoo S, Picketts DJ, Aftimos S, Asenbauer B, Bergoffen J, Berry SA, Dahl N, Fryer A, Keppler K, Kurosawa K, Levin ML, Masuno M, Neri G, Pierpont ME, Slaney SF, Higgs DR. Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of a PHD-like domain. *Nat Genet.* 1997;17(2):146-8.
24. De La Fuente R, Baumann C, Viveiros MM. Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction.* 2011;142(2):221-34.
25. Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S, Bird A. Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2709-14.
26. Kernohan KD, Jiang Y, Tremblay DC, Bonvissuto AC, Eubanks JH, Mann MR, Bérubé NG. ATRX partners with cohesin and MeCP2 and contributes to developmental silencing of imprinted genes in the brain. *Dev Cell.* 2010;18(2):191-202.
27. Rangasamy S, D'Mello SR, Narayanan V. Epigenetics, autism spectrum, and neurodevelopmental disorders. *Neurotherapeutics.* 2013;10(4):742-56.
28. Moye AL, Porter KC, Cohen SB, Phan T, Zyner KG, Sasaki N, Lovrecz GO, Beck JL, Bryan TM. Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nat Commun.* 2015;6:7643.
29. Law MJ, Lower KM, Voon HP, Hughes JR, Garrick D, Viprakasit V, Mitson M, De Gobbi M, Marra M, Morris A, Abbott A, Wilder SP, Taylor S, Santos GM, Cross J, Ayyub H, Jones S, Ragoussis J, Rhodes D, Dunham I, Higgs DR, Gibbons RJ. ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell.* 2010;143(3):367-78.
30. De La Fuente R, Baumann C, Viveiros MM. ATRX contributes to epigenetic asymmetry and silencing of major satellite transcripts in the maternal genome of the mouse embryo. *Development.* 2015;142(10):1806-17.
31. Clynes D, Jelinska C, Xella B, Ayyub H, Taylor S, Mitson M, Bachrati CZ, Higgs DR, Gibbons RJ. ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS One.* 2014;9(3):e92915.

32. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997;89(7):1067-76.
33. Tang SY, Wan YP, Wu YM. Death domain associated protein (Daxx), a multi-functional protein. *Cell Mol Biol Lett*. 2015;20(5):788-97.
34. Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol*. 2006;16(2):97-104.
35. Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol*. 2003;23(20):7108-21.
36. Michaelson JS. The Daxx enigma. *Apoptosis*. 2000;5(3):217-20.
37. Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14075-80.
38. Yeung PL, Chen LY, Tsai SC, Zhang A, Chen JD. Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin alpha3. *J Cell Biochem*. 2008;103(2):456-70.
39. Kim EJ, Park JS, Um SJ. Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(18):5356-67.
40. Tang J, Qu LK, Zhang J, Wang W, Michaelson JS, Degenhardt YY, El-Deiry WS, Yang X. Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):855-62.
41. Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 16):3319-30.
42. Elsaesser SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD, Patel DJ. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature*. 2012;491(7425):560-5.
43. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*. 2004;116(1):51-61.
44. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):264-75.
45. Bano D, Piazzesi A, Salomoni P, Nicotera P. The histone variant H3.3 claims its place in the crowded scene of epigenetics. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(3):602-14.
46. Cleven AH, Höcker S, Briaire-de Bruijn I, Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Bovée JV. Mutation Analysis of H3F3A and H3F3B as a Diagnostic Tool for Giant Cell Tumor of Bone and Chondroblastoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(11):1576-83.
47. Frank D, Doenecke D, Albig W. Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene*. 2003;312:135-43.

48. Witt O, Albig W, Doenecke D. Transcriptional regulation of the human replacement histone gene H3.3B. *FEBS Lett.* 1997;408(3):255-60.
49. Rhodes D, Giraldo R. Telomere structure and function. *Curr Opin Struct Biol.* 1995;5(3):311-22.
50. Galer P, Wang B, Šket P, Plavec J. Reversible pH Switch of Two-Quartet G-Quadruplexes Formed by Human Telomere. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(6):1993-7.
51. Neidle S, Parkinson GN. The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(3):275-83.
52. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res.* 2013;319(2):133-41.
53. Frey A, Listovsky T, Guilbaud G, Sarkies P, Sale JE. Histone H3.3 is required to maintain replication fork progression after UV damage. *Curr Biol.* 2014;24(18):2195-201.
54. Salomoni P. The PML-Interacting Protein DAXX: Histone Loading Gets into the Picture. *Front Oncol.* 2013;3:152.
55. Elsaesser SJ, Goldberg AD, Allis CD. New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(2):110-7.
56. Drane P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 2010;24(12):1253-65.
57. Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3826-30.
58. Xue Y, Gibbons R, Yan Z, Yang D, McDowell TL, Sechi S, Qin J, Zhou S, Higgs D, Wang W. The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10635-40.
59. Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E. ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3):a026567.
60. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458-60.
61. Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, Dettmer M, Rudolph T, Banz V, Hunger F, Pasquinelli S, Speel EJ, Perren A. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology.* 2014;146(2):453-60.e5.
62. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz Jr LA, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011;331(6021):1199-1203.

63. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DAK, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, Von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Taboru U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-31.
64. Panse G, Chrisinger JS, Leung CH, Ingram DR, Khan S, Wani K, Lin H, Lazar AJ, Wang WL. Clinicopathological analysis of ATRX, DAXX and NOTCH receptor expression in angiosarcomas. *Histopathology*. 2018;72(2):239-47.
65. Heaphy CM, Bi WL, Coy S, Davis C, Gallia GL, Santagata S, Rodriguez FJ. Telomere length alterations and ATRX/DAXX loss in pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2020;33(8):1475-81.
66. Napier CE, Huschtscha LI, Harvey A, Bower K, Noble JR, Hendrickson EA, Reddel RR. ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget*. 2015;6(18):16543-58.
67. Gesserick C, Blasco MA. Novel roles for telomerase in aging. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(6):579-83.
68. Whitehouse I, Owen-Hughes T. ATRX: Put me on repeat. *Cell*. 2010;143(3):335-6.
69. Voon HP, Hughes JR, Rode C, De La Rosa-Velazquez IA, Jenuwein T, Feil R, Higgs DR, Gibbons RJ. ATRX Plays a Key Role in Maintaining Silencing at Interstitial Heterochromatic Loci and Imprinted Genes. *Cell Rep*. 2015;11(3):405-18.
70. Watson LA, Solomon LA, Li JR, Jiang Y, Edwards M, Shin-ya K, Beier F, Bérubé NG. Atrx deficiency induces telomere dysfunction, endocrine defects, and reduced life span. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2049-63.
71. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*. 2002;21(4):598-610.
72. Liao JY, Lee JC, Tsai JH, Yang CY, Liu TL, Ke ZL, Hsu HH, Jeng YM. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Mod Pathol*. 2015;28(12):1545-54.
73. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettegowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Maitra A, Papadopoulos N, Meeker AK. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011;333(6041):425.

74. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
75. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
76. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
77. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-9.
78. Sun C, Dou Z, Wu J, Jiang B, Iranmanesh Y, Yu X, Li J, Zhou H, Zhong C, Peng Y, Zhuang J, Yu Q, Wu X, Yan F, Xie Q, Chen G. The Preferred Locations of Meningioma According to Different Biological Characteristics Based on Voxel-Wise Analysis. *Front Oncol*. 2020;10: 1412.
79. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *Lancet*. 2004;363(9420):1535-43.
80. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas RV. An overview of meningiomas. *Future Oncol*. 2018;14(21):2161-77.
81. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, Vecht C. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2), 153–71.
82. 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;131(6):803-20.
83. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*. 2010;99(3):379-91.
84. Pereira BJA, Oba-Shinjo SM, de Almeida AN, Marie SKN. Molecular alterations in meningiomas: Literature review. *Clin Neurol Neurosurg*. 2019;176:89-96.
85. Fürtjes G, Heß K, Wagner A, Senner V, Brokinkel C, Stummer W, Brokinkel B. Letter: Retention of ATRX and DAXX Expression in Meningiomas. *Neurosurgery*. 2017;81(2):E22-3.
86. Gill CM, Loewenstern J, Rutland JW, Arib H, Pain M, Umphlett M, Kinoshita Y, McBride RB, Bederson J, Donovan M, Sebra R, Fowkes M, Shrivastava RK. In Reply: Retention of ATRX and DAXX Expression in Meningiomas. *Neurosurgery*. 2020;86(2):E244-6.
87. Pereira BJA, Oba-Shinjo SM, de Almeida AN, Marie SKN. 2021. *Submitted*
88. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
89. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
90. World Health Organization. World report on ageing and health. *World Health Organization*. 2015; 246. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/186463>. Acesso em: 30 abr 2017.

91. Tang P, Argentaro A, Pask AJ, O'Donnell L, Marshall-Graves J, Familiari M, Harley VR. Localization of the chromatin remodelling protein, ATRX in the adult testis. *J Reprod Dev.* 2011;57(3):317-21.
92. Shioda N, Beppu H, Fukuda T, Li E, Kitajima I, Fukunaga K. Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J Neurosci.* 2011;31(1):346-58.
93. Lee JS, Lee S, Lim BC, Kim KJ, Hwang YS, Choi M, Chae JH. Alpha-thalassemia X-linked intellectual disability syndrome identified by whole exome sequencing in two boys with white matter changes and developmental retardation. *Gene.* 2015;569(2):318-22.
94. Tamming RJ, Siu JR, Jiang Y, Prado MA, Beier F, Bérubé, NG. Mosaic expression of Atrx in the mouse central nervous system causes memory deficits. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):119-26.
95. Barresi V, Ragusa A, Fichera M, Musso N, Castiglia L, Rappazzo G, Travali S, Mattina T, Romano C, Cocchi G, Condorelli DF. Decreased expression of GRAF1/OPHN-1-L in the X-linked alpha thalassemia mental retardation syndrome. *BMC Med Genomics.* 2010;3:28.
96. Medina CF, Mazerolle C, Wang Y, Bérubé NG, Coupland S, Gibbons RJ, Wallace VA, Picketts DJ. Altered visual function and interneuron survival in Atrx knockout mice: inference for the human syndrome. *Hum Mol Genet.* 2009;18(5):966-77.
97. Ritchie K, Watson LA, Davidson B, Jiang Y, Bérubé, NG. ATRX is required for maintenance of the neuroprogenitor cell pool in the embryonic mouse brain. *Biol Open.* 2014;3(12):1158-63.
98. De La Fuente R, Viveiros MM, Wigglesworth K, Eppig JJ. ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Dev Biol.* 2004;272(1):1-14.
99. Ritchie K, Seah C, Moulin J, Isaac C, Dick F, Bérubé, NG. Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J Cell Biol.* 2008;180(2):315-24.
100. Seah C, Levy MA, Jiang Y, Mokhtarzada S, Higgs DR, Gibbons RJ, Bérubé NG. Neuronal death resulting from targeted disruption of the Snf2 protein ATRX is mediated by p53. *J Neurosci.* 2008;28(47):12570-80.
101. Baumann C, Viveiros MM, De La Fuente R. Loss of maternal ATRX results in centromere instability and aneuploidy in the mammalian oocyte and pre-implantation embryo. *PLoS Genet.* 2010;6(9):e1001137.
102. Wong LH, McGhie JD, Sim M, Anderson MA, Ahn S, Hannan RD, George AJ, Morgan KA, Mann JR, Choo KHA. ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 2010;20(3):351-60.
103. Niu YL, Li C, Zhang GY. Blocking Daxx trafficking attenuates neuronal cell death following ischemia/reperfusion in rat hippocampus CA1 region. *Arch Biochem Biophys.* 2011;515(1-2):89-98.

104. Persson T, Lattanzio F, Calvo-Garrido J, Rimondini R, Rubio-Rodrigo M, Sundström E, Maioli S, Sandebring-Matton A, Cedazo-Mínguez A. Apolipoprotein E4 Elicits Lysosomal Cathepsin D Release, Decreased Thioredoxin-1 Levels, and Apoptosis. *J Alzheimers Dis.* 2017;56(2):601-17.
105. Liang XY, Li HN, Yang XY, Zhou WY, Niu JG, Chen BD. Effect of Danshen aqueous extract on serum hs-CRP, IL-8, IL-10, TNF- α levels, and IL-10 mRNA, TNF- α mRNA expression levels, cerebral TGF- β 1 positive expression level and its neuroprotective mechanisms in CIR rats. *Mol Biol Rep.* 2013;40(4):3419-27.
106. Wang L, Zhou C, Wang Z, Liu J, Jing Z, Zhang Z, Wang Y. Dynamic variation of genes profiles and pathways in the hippocampus of ischemic mice: a genomic study. *Brain Res.* 2011;1372:13-21.
107. Saeed U, Ray A, Valli RK, Kumar AMR, Ravindranath V. DJ-1 loss by glutaredoxin but not glutathione depletion triggers Daxx translocation and cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(2):127-44.
108. Michod D, Bartesaghi S, Khelifi A, Bellodi C, Berliocchi L, Nicotera P, Salomoni P. Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation. *Neuron.* 2012;74(1):122-35.
109. Lessard-Beaudoin M, Laroche M, Demers MJ, Duclos C, Denault JB, Grenier G, Riechers SP, Wanker EE, Graham RK. Age-dependent differential expression of death-associated protein 6 (Daxx) in various peripheral tissues and different brain regions of C57BL/6 male mice. *Biogerontology.* 2016;17(5-6):817-28.
110. Elsässer SJ, Noh KM, Diaz N, Allis CD, Banaszynski LA. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature.* 2015;522(7555):240-4.
111. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):3-11.
112. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine.* 2017;21:14-20.
113. Clynes D, Jelinska C, Xella B, Ayyub H, Scott C, Mitson M, Taylor S, Higgs DR, Gibbons RJ. Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nat Commun.* 2015;6:7538.
114. Lee JC, Jeng YM, Liao JY, Tsai JH, Hsu HH, Yang CY. Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas. *Mod Pathol.* 2015;28(8):1064-73.
115. Cai J, Chen J, Zhang W, Yang P, Zhang C, Li M, Yao K, Wang H, Li Q, Jiang C, Jiang T. Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors. *Oncotarget.* 2015;6(20):18105-15.

116. Han B, Meng X, Wu P, Li Z, Li S, Zhang Y, Zha C, Ye Q, Jiang C, Cai J, Jiang T. ATRX/EZH2 complex epigenetically regulates FADD/PARP1 axis, contributing to TMZ resistance in glioma. *Theranostics*. 2020;10(7):3351-65.
117. Benitez JA, Ma J, D'Antonio M, Boyer A, Camargo MF, Zanca C, Kelly S, Khodadadi-Jamayran A, Jameson NM, Andersen M, Miletic H, Saberi S, Frazer Ka, Cavenee WK, Furnari FB. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nat Commun*. 2017;8:15223.
118. Mahmud I, Liao D. DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(15):7734-52.
119. Pan WW, Zhou JJ, Liu XM, Xu Y, Guo LJ, Yu C, Shi QH, Fan HY. Death domain-associated protein DAXX promotes ovarian cancer development and chemoresistance. *J Biol Chem*. 2013;288(19):13620-30.
120. Velázquez Vega JE, Brat DJ. Incorporating Advances in Molecular Pathology Into Brain Tumor Diagnostics. *Adv Anat Pathol*. 2018;25(3):143-71.
121. Ahvenainen TV, Mäkinen NM, von Nandelstadh P, Vahteristo MEA, Pasanen AM, Bützow RC, Vahteristo PM. Loss of ATRX/DAXX expression and alternative lengthening of telomeres in uterine leiomyomas. *Cancer*. 2018;124(24):4650-6.
122. Singhi AD, Liu TC, Roncaioli JL, Cao D, Zeh HJ, Zureikat AH, Tsung A, Marsh JW, Lee KK, Hogg ME, Bahary N, Brand RE, McGrath KM, Slivka A, Cressman KL, Fuhrer K, O'Sullivan RJ. Alternative Lengthening of Telomeres and Loss of DAXX/ATRX Expression Predicts Metastatic Disease and Poor Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res*. 2017;23(2):600-9.
123. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Yamaoka E, Hiyama K. Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2014;49(12):1835-8.

APÊNDICE 1 – Aprovação do Comitê de Ética

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL E EXPRESSÃO DE TFAM NO CÓRTEX SENSORIAL PRIMÁRIO NO ENVELHECIMENTO

Pesquisador Responsável: Suely Kazue Nagahashi Marie

Versão: 1

Pesquisador Executante: Clarisse Pereira Nunes da Silva

CAAE: 39697014.8.0000.0068

Co-autores: Gisele Reislabele Moretti Paula Sola Sueli Mieko Oba Shinjo Carlos Augusto G Pasqualucci

Finalidade Acadêmica: Aprimoramento

Orientador: Suely Kazue Nagahashi Marie

Instituição: HCFMUSP

Departamento: NEUROLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13041

Número do Parecer: 941.792

Data da Relatoria: 28/01/2015

Apresentação do Projeto: O projeto apresenta de forma adequada uma proposta de estudo com amostras de autópsia de indivíduos normais de córtex sensorial primário em todas as faixas etárias, coletados pelo Serviço de Verificação de Óbitos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SVO-HCFMUSP), para avaliar a alteração no número de cópias de DNAm, os danos oxidativos no DNAm e a variação na expressão de TFAM com o envelhecimento.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo do presente estudo é estabelecer uma relação entre a variação do número de cópias do DNAm, a expressão do gene TFAM e o estado de oxidação do genoma mitocondrial em tecido cerebral normal durante o envelhecimento natural.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos pois trata-se de amostras post-mortem obtidas de autópsia. Como possíveis benefícios consideramos que o estudo pode contribuir para a melhor compreensão do metabolismo energético do tecido cerebral ao longo do processo de envelhecimento, oferecendo subsídios para procedimentos preventivos e para um envelhecimento saudável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é relevante cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: adequado

Recomendações: não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

São Paulo, 28 de Janeiro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE 2 – Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Variação do número de cópias de DNA mitocondrial e expressão de TFAM no córtex sensorial primário no envelhecimento

Pesquisador: Suely Kazue Nagahashi Marie

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 39697014.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.224.396

Apresentação do Projeto:

Adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer uma relação entre a variação do número de cópias do DNAm, a expressão do gene TFAM e o estado de oxidação do genoma mitocondrial em tecido cerebral normal durante o envelhecimento natural.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não envolve riscos para os doadores do material, por se tratar de análise de tecido de autópsia coletados após morte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador submeteu uma emenda para acrescentar um novo procedimento nas mesmas amostras. Com os blocos de tecido congelados, serão realizados criocortes para dois procedimentos com o intuito de verificar expressão proteica e alterações no tamanho dos telômeros das células presentes no tecido. A descrição dessa metodologia encontra-se na seção 4 do projeto "Papel do complexo Atrx-Daxx na manutenção dos telômeros".

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.224.396

durante a senescência do encéfalo humano" já aprovado anteriormente. Não haverá alteração na quantidade inicial de material coletado, tampouco alteração no resultado final. O número de amostras obtidas é suficiente para todos os experimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados, a emenda inclui um projeto de iniciação que será realizado com as mesmas amostras e que fornecerá apenas dados adicionais sem modificações no resultado do projeto anteriormente apresentado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ciente da emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_970876_E1.pdf	01/08/2017 15:51:35		Aceito
Outros	projeto_atual.doc	01/08/2017 15:49:33	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Outros	carta_cappesq.pdf	01/08/2017 15:47:47	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Outros	emenda.pdf	01/08/2017 15:47:11	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Outros	Suely Marie.Clarisse.cadastro 13041.0001.pdf	02/12/2014 15:27:01		Aceito
Folha de Rosto	Suely Marie.Clarisse.FR.13041.0001.pdf	02/12/2014 15:21:55		Aceito
Outros	Anuência SVOC.jpg	25/11/2014 15:17:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Aprimoramento_ Clarisse Nunes.pdf	10/11/2014 16:18:24		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.224.396

SAO PAULO, 17 de Agosto de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE 3 – Aprovação do Comitê de Ética

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS IMPLICADOS NA RECORRÊNCIA TUMORAL DOS MENINGIOMAS ATÍPICOS

Pesquisador: Suely Kazue Nagahashi Marie

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 63079616.2.0000.0065

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.135.672

Apresentação do Projeto:

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS IMPLICADOS NA RECORRÊNCIA TUMORAL DOS MENINGIOMAS ATÍPICOS

Objetivo da Pesquisa:

identificação de marcadores tumorais específicos em meningiomas atípicos que evoluem mal

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não há risco - estudo histoquímico e anatomopatológico

benefício - previsão de evolução mais desfavorável em alguns tipos tumorais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

o n da amostra é pequeno, dada a especificidade do estudo em questão

estudo com finalidade de conclusão de doutoramento

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

não há

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 3.135.672

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1272680_E1.pdf	06/12/2018 22:22:45		Aceito
Outros	CRONOGRAMA_2018.docx	06/12/2018 22:20:28	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVADADISPENSADOTCLE.docx	02/02/2017 22:49:23	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Outros	USP.pdf	15/12/2016 19:46:12	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	15/12/2016 19:43:12	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TESEDR.doc	24/10/2016 14:06:22	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	24/10/2016 14:00:54	Suely Kazue Nagahashi Marie	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

APÊNDICE 4 – Tabela de dados da casuística de tecido cerebral de autópsia

Whole Brain N° de amostra	Gênero	Idade	Intervalo post-mortem (h)	Expressão absoluta ATRX (2 ^{-DCT})	Expressão absoluta DAXX (2 ^{-DCT})	Expressão absoluta Telômeros (2 ^{-DCT})	FFPE
WB 01	F	89	14h	0,79	1,47	86,64	
WB 02	M	50	10h	2,28	0,96	26,43	
WB 03	M	42	12h	1,82	1,88	57,00	x
WB 04	F	77	12h	1,69	1,02	3,13	x
WB 05	M	62	12h	2,09	1,54	0,97	
WB 06	M	56	12h	1,77	2,69	19,13	
WB 07	M	54	16h	2,04	1,63	12,67	
WB 08	M	78	13h	1,46	1,18	19,71	
WB 09	M	78	6h	1,36	1,90	4,93	
WB 10	F	70	13h	1,47	3,24	3,59	
WB 11	M	74	15h	1,90	1,80	2,09	x
WB 12	M	63	14h	2,46	1,82	6,18	
WB 13	M	84	23h	1,15	2,34	19,63	x
WB 14	F	57	15h	1,39	1,72	40,31	
WB 15	M	44	11h	2,33	2,54	58,52	x
WB 16	F	47	24h	3,29	2,59	71,45	
WB 17	F	94	68h			4,77	
WB 18	M	64	15h	2,90	2,69		
WB 19	M	34	14h	1,47	2,58	3,84	x
WB 20	M	84	14h	1,93	2,61	13,75	
WB 21	M	51	20h	3,99	1,91	2,15	
WB 22	M	54	10h	4,14	2,74	5,96	
WB 23	M	54	17h	3,27	3,64	0,97	
WB 24	M	63	18h	2,46	3,19	6,08	
WB 25	M	43	14h	5,20	3,63	3,62	
WB 26	M	66	12h	3,09	1,94	3,25	
WB 27	M	85	19h	1,88	6,86	1,22	
WB 28	F	98	19h	1,20	1,32	0,02	x
WB 29	M	66	28h	2,15	1,58	1,18	
WB 30	M	64	12h	2,25	2,07	6,28	
WB 31	F	91	15h	2,32	4,99	1,57	
WB 32	M	48	24h	3,44	2,55	1,55	
WB 33	M	67	6h	1,71	1,58	4,90	
WB 34	M	37	19h	1,91	1,77		
WB 35	M	37	16h	2,33	2,87	43,06	x
WB 36	M	40	11h	4,29	3,28	7,02	x
WB 37	M	55	16h	6,64	2,54	6,72	
WB 38	F	59	15h	4,94	2,78	13,93	

Whole Brain N° de amostra	Gênero	Idade	Intervalo post-mortem (h)	Expressão absoluta ATRX (2-DCT)	Expressão absoluta DAXX (2-DCT)	Expressão absoluta Telômeros (2- DCT)	FFPE
WB 39	M	52	13h	3,87	2,38	1,50	
WB 40	M	67	17h	3,38	4,77		
WB 41	F	50	13h	7,72	4,39		
WB 42	M	80	18h	2,26	2,22	1,61	
WB-43	F	86	18h			1,57	
WB-44	M	36	19h			1,93	
WB-45	M	59	21h			0,94	
WB 46	F	43	21h	2,72	1,87	1,34	
WB 47	F	46	25h	3,67	2,48	1,67	
WB 48	F	86	23h	0,89	4,05		
WB 49	M	90	15h	0,66	2,02	1,80	
WB 50	F	79	20h	1,09	1,97	1,85	
WB 51	M	44	22h	2,07	1,34	1,31	
WB 52	M	35	14h	1,51	2,15	0,14	
WB 53	F	79	15h	1,46	1,05	1,25	
WB 54	M	73	23h	0,82	2,13	1,05	
WB 55	M	42	26h	2,14	1,90	1,29	
WB 56	M	49	22h	3,38	1,98	0,74	
WB 57	M	53	15h				
WB 58	M	58	14h	2,77	2,26	1,09	
WB 59	F	64	25h	1,58	2,21	1,58	
WB 60	M	75	19h	1,17	1,08		
WB 61	F	85	11h	1,11	1,48	0,89	
WB 62	M	87	20h	1,00	4,67	0,79	
WB 63	M	61	15h	3,13	1,97	2,47	
WB 64	F	68	27h	0,82	2,13	1,93	
WB 65	M	73	12h	2,21	3,11	1,63	
WB 66	F	86	15h				
WB 67	M	77	14h	1,88	2,19	1,38	
WB 68	F	60	23h	3,60	1,94	1,81	
WB 69	M	57	14h	4,38	5,39	1,17	
WB 70	F	70	16h	1,03	1,80	2,57	
WB 71	M	77	14h	1,50	1,81	2,88	
WB 72	F	44	29h	2,52	3,93	2,18	
WB 73	F	83	15h	1,79	3,55	1,78	
WB 74	M	36	21h	1,15	2,33	0,93	
WB 75	M	84	22h	0,74	2,46	1,90	
WB 76	F	60	21h	1,15	1,97	2,29	
WB 77	F	82	20h	1,98	2,90	1,88	
WB 78	F	75	15h				
WB 79	F	88	19h	0,44	2,40	1,68	

Whole Brain N° de amostra	Gênero	Idade	Intervalo post-mortem (h)	Expressão absoluta ATRX (2-DCT)	Expressão absoluta DAXX (2-DCT)	Expressão absoluta Telômeros (2- DCT)	FFPE
WB 80	M	54	18h	2,35	3,23	0,96	
WB 81	M	41	21h	1,06	1,78	1,12	
WB 82	F	64	28h	1,19	1,88	2,43	
WB 83	M	67	16h			1,49	
WB 84	M	84	12h	0,66	1,76	2,16	
WB 85	M	71	20h	0,38	2,25	1,92	
WB 86	M	55	12h	1,51	1,56	1,49	
WB 87	F	54	17h	2,28	4,20	1,99	
WB 88	F	36	15h	1,03	1,92	1,59	
WB 89	F	58	13h	2,66	3,01	2,02	
WB 90	F	43	14h	0,90	1,82	1,48	
WB 91	M	68	18h	0,85	3,26	1,67	
WB 92	M	65	22h	1,15	2,14	1,77	
WB 93	M	55	17h	0,67	3,68	1,31	
WB 94	M	87	19h				
WB 95	M	61	22h	1,45	2,35	1,42	
WB 96	F	60	18h	1,83	1,77	0,42	
WB 97	M	95	14h	0,30	3,08	4,70	
WB 98	F	86	18h	1,16	1,07	1,27	
WB 99	F	37	19h	1,78	2,00	1,80	
WB 100	F	67	14h	0,64	2,13	1,51	
WB 101	M	91	8h	0,46	2,10	1,16	
WB 102	F	63	12h	0,99	1,42	1,48	
WB 103	M	66	10h	1,15	1,82	1,10	
WB 104	F	75	19h	1,80	1,07	1,30	
WB 105	M	59	16h	1,98	3,05	1,92	
WB 106	F	96	13h	0,32	1,78	1,46	
WB 107	M	45	14h	1,32	2,11	0,97	
WB 108	M	70	11h	0,86	2,10	1,14	

APÊNDICE 5 – Tabela de dados da casuística de meningioma

Grau	Caso	N° de amostra	Gênero	Idade	Expressão absoluta ATRX ($2^{-\text{DCT}}$)	Expressão absoluta DAXX ($2^{-\text{DCT}}$)	Expressão absoluta Telômeros ($2^{-\text{DCT}}$)	TMA
I	Meningotelial	121	F	59	8,694959	5,51486		x
I	Meningotelial	144	F	55	8,512257	4,770365		
I	Meningotelial	150	F	54	8,077424	5,287908		
I	Meningotelial	221	M	31	8,755812	6,520629		
I	Meningotelial	288	F	36	8,768511	4,966864	2,303587	x
I	Meningotelial	293	F	70	8,723011	4,757434		
I	Meningotelial	303	F	45	8,232617	5,297632		
I	Meningotelial	304	M	69	8,621046	4,838345		
I	Meningotelial	376	M	37	8,677749	5,590667		
I	Meningotelial	494	M	28	8,677749	5,590667		
I	Meningotelial	549	M	73	8,660127	5,406288		x
I	Meningotelial	641	M	76	8,694394	5,887039		
I	Meningotelial	869	F	22	8,035716	5,64309		
I	Meningotelial	870	M	50	8,585823	5,18318	0,996383	
I	Meningotelial	979	F	60	8,419908	5,485361		
I	Meningotelial	1102	F	78	8,501328	6,175906		x
I	Meningotelial	1153	F	51	8,684381	5,434339	2,647104	
I	Meningotelial	1215	F	44	8,23015	4,954292	2,940878	
I	Meningotelial	1259	F	49	8,659591	5,728953		
I	Meningotelial	1291	F	66	8,516633	5,08799	2,060225	x
I	Meningotelial	1392	M	58	7,834629	5,60361	1,998466	x
I	Transicional	84	F	54	8,556446	5,330095	1,907201	
I	Transicional	114	F	46	8,580422	4,696342	2,624697	x
I	Transicional	136	F	69	8,373297	5,446929		x
I	Transicional	212	F	47	8,435903	5,766522		x
I	Transicional	219	F	68	8,877155	4,795091		
I	Transicional	223	F	58	8,537006	5,166284	2,293853	
I	Transicional	231	M	75	8,359338	5,567837		x
I	Transicional	308	F	58	8,637173	5,587668	2,499767	
I	Transicional	333	F	39	8,348471	5,569871	2,553242	
I	Transicional	343	F	46	8,182904	5,641916	2,49493	
I	Transicional	365	M	54	9,012488	5,611071	2,081811	
I	Transicional	389	F	53	8,784514	5,172725	2,947738	
I	Transicional	416	F	75	8,516841	5,05951		
I	Transicional	444	M	35	8,522339	5,031178	2,270409	

Grau	Caso	N° de amostra	Gênero	Idade	Expressão absoluta ATRX (2 ^{-DCT})	Expressão absoluta DAXX (2 ^{-DCT})	Expressão absoluta Telômeros (2 ^{-DCT})	TMA
I	Transicional	447	F	41	8,867085	5,560214		
I	Transicional	454	M	62	8,533228	4,879331		x
I	Transicional	470	F	47	8,561284	5,284839	1,751741	x
I	Transicional	484	M	43	8,63427	5,475638	2,393011	x
I	Transicional	551	F	52	8,552489	5,037805	1,715186	
I	Transicional	602	F	48	6,993266	4,275409		x
I	Transicional	626	M	66	8,59205	5,188835		x
I	Transicional	708	M	47	8,897013	5,03636	2,279202	
I	Transicional	821	F	77	8,464	5,184853		
I	Transicional	830	F	72	8,051447	5,820189		x
I	Transicional	844	F	69	8,495122	4,706978	2,357834	x
I	Transicional	970	F	69	8,424488	5,026493		x
I	Transicional	1004	F	57	8,420184	5,656884		x
I	Transicional	1053	M	53	8,525382	5,011758		x
I	Transicional	1068	F	58	8,549071	5,214298		
I	Transicional	1089	F	64	8,34121	5,942377	1,828713	
I	Transicional	1110	F	42	8,595663	5,449909	1,993352	
I	Transicional	1266	F	55	8,394907	5,629209	1,772218	x
I	Transicional	1271	F	60	8,632566	5,452691	2,187177	x
I	Transicional	1320	F	42	8,735955	4,570167	1,571203	x
I	Transicional	1321	F	34	8,60168	4,82202	2,427953	x
I	Transicional	1388	F	72	8,140276	5,399519	2,001622	x
I	Fibroso	54	M	57	8,487897	5,566706	2,944321	x
I	Fibroso	82	F	50	8,832498	4,836291		
I	Fibroso	240	F	45	8,831403	5,090802	1,937617	x
I	Fibroso	361	F	44	8,488937	5,396962		
I	Fibroso	422	F	79	8,636486	5,088336	2,872733	x
I	Fibroso	434	F	52	8,278591	5,12847		
I	Fibroso	475	F	76	8,562422	5,420925	2,135054	x
I	Fibroso	1186	F	77	9,108868	5,85178	2,489261	
I	Fibroso	1376	M	51	8,895969	5,645322	2,060179	x
I	Fibroso	1385	M	44	8,854244	5,561736	2,008261	x
II	Atípico	292	M	53	8,715808	5,057866	0,920494	
II	Atípico	325	M	69	8,453759	4,640566		
II	Atípico	430	M	39	8,48808	4,412199	1,172227	
II	Atípico	960	M	60	10,14125	5,18301		x
II	Atípico	966	M	53	8,941896	4,241965	2,065329	
II	Atípico	1114	M	39	8,437735	5,897434	2,141224	

Grau	Caso	N° de amostra	Gênero	Idade	Expressão absoluta ATRX (2^{-DCT})	Expressão absoluta DAXX (2^{-DCT})	Expressão absoluta Telômeros (2^{-DCT})	TMA
II	Atípico	1167	M	45	8,689376	5,229945	1,592044	x
II	Atípico	25	F	58	8,607726	5,059007	2,033915	
II	Atípico	474	F	60	8,372061	5,504412		x
II	Atípico	482	F	55	8,542136	4,955247		x
II	Atípico	489	F	64	8,654946	5,370914	1,809411	
II	Atípico	525	F	27	8,693196	4,72096		
II	Atípico	777	F	65	8,760073	5,527412	2,401564	
II	Atípico	924	F	80	9,370682	4,768822	2,358089	x
II	Atípico	954	F	33	8,57401	7,751361	2,86951	x
II	Atípico	1213	F	74	8,903215	5,264615		
II	Atípico	1222	F	55	8,296066	5,466893	1,534154	x
II	Atípico	1314	F	58	8,637267	4,307685	3,451195	
III	Maligno	102	M	48	8,791363	5,11738	2,260731	
III	Maligno	171	F	74	9,00061	4,910558		
III	Maligno	348	F	44	8,36364	6,450285		x
III	Maligno	656	F	72	8,308512	9,125751	2,273761	x
III	Maligno	672	M	35	9,413929	5,745147	2,741701	
III	Maligno	1410	M	41	9,891764	6,215793	2,637763	