

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

MARCELLA SUELMA TORRECILLAS ROSA

**Expressão tecidual e sérica de microRNAs associados a
receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas
grau I, II e III**

**Ribeirão Preto
2018**

MARCELLA SUELMA TORRECILLAS ROSA

**Expressão tecidual e sérica de microRNAs associados a
receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas
grau I, II e III**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da
Cunha Tirapelli.

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rosa, Marcella Suelma Torrecillas

Expressão tecidual e sérica de microRNAs associados a receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas grau I, II e III.

52p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

1. Meningioma. 2. microRNAs. 3. Estrógeno.
4. Progesterona 5. Progressão tumoral

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcella Suelma Torrecillas Rosa

Expressão tecidual e sérica de microRNAs associados a receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas grau I, II e III.

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Primeiramente agradeço a Deus pela motivação e aos meus pais Suélem e Vander, meu reconhecimento e gratidão pela educação e formação, destacando ainda a extensão aos meus filhos.

Mãe sei o quanto estaria orgulhosa e feliz, este título tem muito de você. Eternamente te amo.

Pai, meu companheiro, meu incentivador, minha segurança. Se hoje concluo o mestrado, agradeço pelo apoio e incentivo.

Aos meus filhos, João Pedro e Luiz Henrique, obrigado pela compreensão e constante incentivo.

Aos meus irmãos, Bruce e Alessandra, obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus cunhados, Márcio, Marina e Ligiane, por constituírem na minha torcida.

A todos de minha querida família, meus agradecimentos pelo incentivo durante toda esta jornada.

A Juliana Pischiotin da Silva Moraes, secretária do Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica, obrigado pela atenção e carinho.

Meu muito obrigada a todos os colegas do laboratório de Biologia Molecular, pela atenção e compreensão. Destaco especialmente o Fermino Sanches Lizarte Neto e Rogério Lenotti Zuliani, pela ajuda na realização dos experimentos. Foram essenciais. Agradeço também a Maria Fernanda Barbirato da Mata Tiezzi, Fabiana de Oliveira Bueno e Fabiana Pansani, muito importantes na minha jornada.

Com prazer e alegria, meus agradecimentos ao Victor e Lucas Tirapelli. Obrigada pela atenção e carinho para comigo e meus filhos.

Ao professor Doutor Luis Fernando Tirapelli, meus reconhecimentos e agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Profa Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, destaco seus conhecimentos e elegância, sua dedicação à sua carreira, sua competência, sobretudo sua capacidade de com segurança transmitir seus conhecimentos. Cresci muito como profissional e pessoa e agradeço sempre pela sua amizade, confiança, pelo carinho, por ter de fato me orientado e me guiado por todo este tempo de mestrado. Minha eterna gratidão.

“Depois de um tempo, você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem, mais quem você tem na vida”

William Shakespeare

RESUMO

ROSA, MST. **Expressão tecidual e sérica de microRNAs associados a receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas grau I, II e III.** 2018. 52f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os meningiomas são os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) mais frequentes e representam 35,5% dos casos considerando-se todas as faixas etárias. Apesar dos progressos ocorridos nas últimas décadas, a tumorigênese dos meningiomas ainda permanece como um desafio. Há um consenso da necessidade de ferramentas moleculares para ajudar tanto no diagnóstico quanto no prognóstico dos meningiomas. Neste contexto, alguns trabalhos demonstram a importância do papel dos receptores de estrógeno e progesterona, assim como o entendimento das alterações nos níveis de expressão dos microRNAs (miRNAs) na tumorigênese dos meningiomas. Alguns estudos demonstram que o perfil de expressão sérico dos miRNAs tem correlação com a classificação e evolução clínica, sendo de grande interesse o uso desse material por se tratar de um procedimento não-invasivo, ou seja, como biomarcadores. Objetivos: avaliar o perfil de expressão tecidual e sérica de microRNAs associados as vias dos receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas grau I, II e III. Pacientes e métodos: foram utilizadas amostras de tecido e plasma de 40 pacientes com meningiomas grau I, II e III. Para a análise da expressão dos miRNAs miR-34a, miR-143, miR-145 e miR-335 foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Resultados: os miRNAs: miR-34a e miR-145 apresentaram diferença estatística significativa nas amostras de tecido tumoral entre os grupos estudados com menor expressão nas amostras de meningiomas grau II quando comparadas as amostras grau I e III. Não observamos diferença estatística significativa na expressão dos miRNAs nas amostras de plasma. Conclusão: os miRNAs selecionados não apresentaram correlação com a progressão tumoral em meningiomas.

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

ABSTRACT

ROSA, MST. **Tissue and serum expression of microRNAs associated with estrogen and progesterone receptors in Meningiomas grade I, II and III.** 2018. 52f. Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Meningiomas are the most common primary Central Nervous System (CNS) tumors, accounting for 35.5% of the cases, considering all age groups. Despite the progress made in recent decades, the tumorigenesis of meningiomas still remains a challenge. There is a consensus of the need for molecular tools to assist both diagnosis and prognosis of meningiomas. In this context, some studies demonstrate the importance of the role of estrogen and progesterone receptors, as well as the understanding of alterations in microRNA (miRNAs) expression levels in the tumorigenesis of meningiomas. Some studies have shown that the serum expression profile of the miRNAs correlates with the classification and clinical evolution, being of great interest the use of this material because it is a non-invasive procedure, i.e., as biomarkers. Objectives: To evaluate the tissue and serum expression profile of microRNAs associated with the estrogen and progesterone receptor pathways in meningiomas grade I, II and III. Patients and methods: tissue and blood samples from 40 patients with grade I, II and III meningiomas were used. For analysis of miRNA expression miR-34a, miR-143, miR-145 and miR-335 was used the real-time PCR technique. Results: miRNAs: miR-34a and miR-145 presented a significant statistical difference in the tumor tissue samples between the groups with lower expression in the samples of grade II meningiomas when compared to samples I and III. We did not observe statistically significant statistical difference in miRNA expression in blood samples. Conclusion: the selected miRNAs showed no correlation with tumor progression in meningiomas.

Keywords: Meningiomas, microRNAs, tumor progression, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese dos microRNAs (Kimura e Ricarte Filho, 2006).....	21
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-34a entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0201$, Kruskal Wallis test).34
- Gráfico 2.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-34a entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,6753$, Kruskal Wallis test).34
- Gráfico 3.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-143 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0591$, Kruskal Wallis test).35
- Gráfico 4.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-143 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,5590$, Kruskal Wallis test).35
- Gráfico 5.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0379$, Kruskal Wallis test).36
- Gráfico 6.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1939$, Kruskal Wallis test).36
- Gráfico 7.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-335 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1522$, Kruskal Wallis test).37
- Gráfico 8.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-335 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1719$, Kruskal Wallis test).37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
DEPC	Substância que inativa enzimas RNAses (Dietilpirocarbonato)
DGCR8	Cofator da enzima Drosha na biogênese dos MicroRNAs (<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
ER	Receptor de Estrogênio
Exp5	Enzima Exportina 5 da biogênese dos MicroRNAs
miRNA	MicroRNA
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR	Receptor de Progesterona
RAn-GTP	Cofator da enzima exportina 5
RISC	Complexo multimérico que se acopla aos MicroRNAs (<i>RNA induced silence complex</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_{se} III	Enzima RNA polimerase III
RNU 24	Gene normatizador (Pequeno RNA nucleolar)
RNU 48	Gene normatizador (Pequeno RNA nucleolar)
RQ-PCR	Transcrição reversa quantitativa da PCR
SNC	Sistema Nervoso Central
T_m	Temperatura de fusão (<i>temperature of melting</i>)
UTR	Região não traduzida da fita de RNA _m (<i>untranslated region</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 PACIENTES E MÉTODOS	28
4.1 Pacientes.....	28
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Extração de RNA das amostras de tecido tumoral.....	28
4.2.2 Extração do RNA do plasma	29
4.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos microRNAs.....	30
4.2.4 RQ microRNAs: miR-34a, miR-143, miR-145 e miR-335	30
4.2.5 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	34
5.1 miRNA-34a no Tecido Tumoral	34
5.2 miRNA-34a no Plasma	34
5.3 miRNA-143 no Tecido Tumoral	35
5.4 miRNA-143 no Plasma	35
5.5 miRNA-145 no Tecido Tumoral	36
5.6 miRNA-145 no Plasma	36
5.7 miRNA-335 no Tecido Tumoral	37
5.8 miRNA-335 no Plasma	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	45
8 REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Meningiomas são os tumores cerebrais primários mais comuns e representam aproximadamente 36% de todos os tumores primários do sistema nervoso central, com taxas de incidência anual de aproximadamente 4,4 a cada 100.000 indivíduos, sendo mais comum em mulheres e após a quinta década de vida (KRAMPLA, et al. 2004, MARCISCANO, et al. 2015, MAROSI et al., 2008; PHAM et al., 2011, WICKREMESEKERA, et al. 2010, YANO, et al. 2006). Meningiomas também são os tumores cerebrais primários mais diagnosticados em adultos, sendo responsáveis por aproximadamente um terço de todos esses casos (BOSNYAK, et al. 2015). Aproximadamente 15.000 pacientes serão diagnosticados com tumores cerebrais a cada ano nos Estados Unidos e cerca de 15% (= 2250 pacientes) terão o diagnóstico histológico de meningioma (HUG, et al. 2000).

Os meningiomas são caracterizados como tumores que se originam da célula neoplásica da aracnóide. É um dos tumores mais comuns contabilizando 13 a 20% dos tumores do Sistema Nervoso Central (DAS et.al., 2003). Têm uma incidência anual de aproximadamente 6 por 100.000 da população (WHITTLE et.al., 2004).

Trata-se da quase totalidade das neoplasias que afetam primariamente as meninges, embora ocasionalmente outros tipos de tumores primários também possam ocorrer (GIROLAMI; FROSCH; ANTHONY, 1999; BALMACEDA; SISTI; BRUCE, 2002). Os meningiomas são considerados neoplasias benignas, pois, em geral, não produzem metástases, não são invasivos e são usualmente curados após a ressecção cirúrgica (PRAMESH et.al., 2003).

Em países ocidentais, a prevalência aumenta de forma significativa quando a idade se torna mais avançada, com porcentagens mais elevadas de tumores clinicamente silenciosos entre idosos (KRAMPLA, et al. 2004).

No entanto, esses tumores possuem potencial de se tornarem agressivos e invadir o cérebro e/ou a calota craniana, ou ainda, de desenvolverem metástase. As taxas de recorrência local após a ressecção completa variam de 9% a 32% (PRAMESH et.al., 2003), e infere-se que 1:1.000 dos meningiomas metastatizam (BALMACEDA; SISTI; BRUCE, 2002; PRAMESH et.al., 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os meningiomas podem ser classificados em 3 graus com base em critérios histológicos: Grau I (benigno), Grau II (atípico) e Grau III (anaplásico); ocorrendo em ordem decrescente de

frequência (YANO, *et al.* 2006). Cerca de 3% dos meningiomas benignos e 78% dos tumores atípicos recidivam em cinco anos. Os meningiomas malignos são raros, com incidência variando entre 2% a 10% (ADLAKHA *et al.*, 1999). Em virtude do crescimento lento dos meningiomas e do bom prognóstico após ressecção, a cirurgia é o tratamento de escolha (PRAMESH *et al.*, 2003).

Os meningiomas Grau I apresentam comportamento menos agressivo (MARCISCANO, *et al.* 2015), porém outros subtipos histológicos demonstram um comportamento clínico mais agressivo e, apesar do tratamento cirúrgico, frequentemente ocorre recorrência local. De acordo com a classificação da OMS, entre 5% e 15% dos meningiomas são atípicos (Grau II), enquanto 1-2% são meningiomas anaplásico (Grau III) (JORDI, *et al.* 2007). Algumas características histológicas estão relacionadas com a agressividade biológica dos meningiomas, tais como; pleomorfismo nuclear, densidade celular, nucléolos, mitoses, necrose e infiltração do cérebro (NICOLAS, *et al.* 2000).

Os meningiomas de grau I são caracterizados como de crescimento lento e com figuras mitóticas ocasionais, embora com ocorrência de pleomorfismo nuclear. Os três padrões arquiteturais mais comuns são o meningotelial, o fibroblástico e o transicional (WHITTLE *et al.*, 2004).

Nos meningiomas grau II são reconhecidos dois padrões arquiteturais, os meningiomas de células claras e os meningiomas cordóides; além de um índice mitótico de $\geq 4/10$ HPF (campos de grande aumento). Este índice de pelo menos quatro figuras mitóticas por 10 HPF (campos de grande aumento) é a característica mais importante, permitindo um diagnóstico histológico de atipia na ausência de outras características como o aumento da celularidade, pequenas células com alto índice de núcleo no citoplasma, nucléolo proeminente e necrose. Na ausência do índice mitótico, pelo menos três destas cinco características devem estar presentes no diagnóstico histológico de atipia. Estes tumores têm um alto índice de recorrência (29-40%) em comparação ao grau I (7-20%), particularmente após uma ressecção subtotal (WHITTLE *et al.*, 2004).

Os meningiomas de grau III são subclassificados no padrão arquitetural em papilares e rabdóides. Apresentam maior perda na regulação do ciclo celular e na sua diferenciação, com achados focais ou difusos de alto índice mitótico 20/10HPF (campos de grande aumento) e/ou livre de anaplasia. Este grau mostra um comportamento biológico mais agressivo e está clinicamente associado com alto

risco de recorrência local além de um prognóstico menos favorável (PERRY; GUTMANN; REIFENBERGER, 2004).

Supostos fatores preditivos de recorrência do tumor e sobrevida global de meningiomas são a idade, extensão da ressecção, grau histológico e alguns marcadores. Entre estes, ainda grau histológico é o fator prognóstico mais relevante. Enquanto a taxa de recorrência para meningiomas atípicos são de aproximadamente 40%, esse número sobe para 80% para meningiomas anaplásico. Além disso, o grau histológico também está associado com a sobrevivência, com uma taxa de mortalidade de 21% em 5 anos para meningiomas atípicos e um tempo médio de sobrevivência de <2 anos para meningiomas anaplásico. (JORDI, *et al.* 2007)

Localização do tumor é um fator crítico para determinar o prognóstico e opções de terapia, especialmente ressecção cirúrgica. A maioria dos meningiomas são encontrados no compartimento supratentorial, mais geralmente ao longo dos seios venosos durais na convexidade cerebral, e nas regiões de asa esfenoidais. Locais menos comuns da origem supratentorial incluem a bainha do nervo óptico, e plexo coróide (SARAF, *et al.* 2011).

Estudos sugerem que a suscetibilidade ao desenvolvimento dos meningiomas está associada a fatores como histórico familiar e alterações em vias moleculares, como por exemplo, genes de reparo no DNA; outro fator de risco estabelecido para meningiomas, é a exposição a radiação ionizante em dose elevada, mas doses menores também podem aumentar o risco(WIEMELS, *et al.* 2010). Outras fatores de risco são discutidos, embora seu impacto real seja controverso, onde incluem-se: lesões cerebrais, exposição ao chumbo, consumo de álcool, exposição campos eletromagnéticos, hábitos alimentares e substituição de hormônios femininos (KRAMPLA, *et al.* 2004).Estudos também sugerem que além de estudar os fatores ambientais e genéticos separadamente, é necessário analisar a interação entre os dois (WIEMELS, *et al.* 2010) .

Estudos citogenéticos demonstram que a perda total ou em partes do cromossomo 22 é dos principais eventos na tumorigênese dos meningiomas (DUMANSKI, *et al.* 1990; NICOLAS, *et al.* 2000;SEIZINGER, *et al.* 1987). A perda do braço curto do cromossomo 1 representa a segunda anormalidade cromossomal mais frequente dos meningiomas e está associada ao desenvolvimento dos meningiomas atípicos (LOMAS, *et al.* 2001; LOPEZ-GUINES, *et al.* 2004; NUNES, *et al.* 2005).

A etiologia dos meningiomas permanece largamente desconhecida, mas alguns fatores predisponentes para o desenvolvimento podem ser traumas, neurofibromatose tipo II, aberração no cromossomo 22, infecção viral crônica e hormônios femininos. Podem se desenvolver silenciosamente por muitos anos sem provocar sintomas clínicos e sua frequência de ocorrência pode ser subestimada principalmente em pessoas idosas assintomáticas (SCHNEIDER et.al., 2005).

O tratamento inicial inclui a cirurgia, onde a morbidade cirúrgica é consideravelmente maior em pacientes mais velhos com tumores assintomáticos, com isso, acompanhamento de perto de meningiomas de baixo grau pode ser a melhor estratégia (YANO, *et al.* 2006). A ressecção cirúrgica tem sido historicamente a modalidade de tratamento primário para meningiomas, independentemente de subtipo. A extensão da ressecção é um fator determinante do risco de recorrência e a necessidade de terapia adjuvante. A radioterapia pós-operatória é recomendada na maioria dos casos, mesmo ainda não sendo totalmente determinado se a radioterapia é benéfica. Ko et al (2007) constataram que cirurgia seguida de radioterapia reduziu a recorrência local de meningiomas em comparação com a cirurgia sozinha (KO, *et al.* 2007).

A maioria dos meningiomas podem ser ressecados, muitas vezes fornecendo alívio imediato de déficits neurológicos, convulsões e outros sintomas. Muitos estudos demonstram que a extensão da ressecção é um importante preditor de recorrência (SIMON, *et al.* 2006).

Muitos pesquisadores defendem a radioterapia adjuvante para tratamento dos meningiomas anaplásicos (Grau III), independentemente da extensão da ressecção pois estes tumores tem uma taxa extremamente alta de recorrência local. No entanto, é difícil de determinar os efeitos da radioterapia em meningiomas atípicos (Grau II). As taxas de recorrência são muito elevadas, 38-52% e 50-84%, respectivamente para meningiomas atípicos e anaplásico/meningiomas malignos após cinco anos(KO, *et al.* 2007; SIMON, *et al.* 2006).

Técnicas de análises genômicas como, por exemplo, microarranjos e metodologias de seqüenciamentos do genoma humano tem ajudado com a descoberta de genes com suscetibilidade ao câncer (FUTREAL, *et al.* 2004). A formação de tumores cerebrais é um processo complexo que envolve um acúmulo de alterações genéticas. Alterações específicas em cada tipo de tumor e diferentes vias genéticas conduzem a diferentes tipos de tumor. Isso significa que informações

genéticas examinadas de tumores em ressecção cirúrgica podem ter diagnóstico valioso, sendo, portanto, um acréscimo aos tradicionais diagnósticos histopatológicos (HASHIMOTO et.al., 2002).

Neste contexto se destacam estudos da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas (ALEXIOU et al., 2010).

Hormônios como a progesterona e estrógeno apresentam papel na estimulação do desenvolvimento do meningioma; os receptores de progesterona presentes em 76% e receptores de estrógeno em 19%. (SIOKA, 2009) Estes receptores se apresentaram presentes em maior quantidade em tumores benignos, já no meningioma mais agressivo, apresenta números baixos ou até mesmo ausentes de receptores de progesterona. (HUISMAN, 1991)

Após uma série de descobertas, foi sugerido associação entre os hormônios e o risco do meningioma, com presença de estrógeno, progesterona e receptores de andrógeno em alguns meningiomas. (WIEMELS, et al. 2010) Estudos demonstram que o meningioma altera seu tamanho durante a fase lútea do ciclo menstrual e gravidez, e também a regressão de múltiplos meningiomas em paciente após a interrupção da terapia agonista. (CLAUS, et al. 2007) (VADIVELU, et al. 2010)

Estudos feitos sobre o risco relativo de meningioma associado com o uso de hormônios nas mulheres na pré-menopausa quando comparado com hormônios na pós-menopausa é que iniciaram a abordagem sobre o uso de hormônios exógenos (contraceptivos orais e/ou terapia de reposição hormonal) associados ao aumento do risco de meningioma. (WIEMELS, et al. 2010)

Os receptores de progesterona são pouco expressos em tecido normal de aracnóide, enquanto que em meningiomas apresentam aumento de expressão, com uma maior proporção de positividade de receptores de progesterona em mulheres, sendo na maioria dos casos tumores *de novo*. É consenso na literatura que a expressão positiva de receptores de progesterona ocorre mais freqüentemente em meningiomas de baixo grau do que em meningiomas malignos, além disso, observa-se também um menor índice de recorrência desses tumores (AL-MEFTY et al., 2004; AL-MEFTY et al., 2006; AL-MEFTY et al., 2007; ALEXIOU et al., 2010; CARVALHO et al., 2007; CLAUS et al., 2008; CHOY et al., 2011; LUSIS et al., 2004; MAROSI et al., 2008; MAWRIN et al., 2010).

Os receptores de estrógeno, por sua vez, não são expressos normalmente em tecidos meningeais e quando expressos em meningiomas, estão relacionados

a um maior potencial de comportamento clínico agressivo e maior índice de recorrência, sendo mais freqüentes em homens (AL-MEFTY et al., 2004; AL-MEFTY et al., 2006; AL-MEFTY et al., 2007; CARVALHO et al., 2007; CLAUS et al., 2008; CHOY et al., 2011; LUSIS et al., 2004; MAROSI et al., 2008; MAWRIN et al., 2010).

Por apresentarem expressão alterada em meningiomas, os receptores de estrógeno e progesterona podem ser focos de estudos como terapia anti-endócrina (GRUNBERG, *et al.* 2001). Estudos também demonstram que os meningiomas alteram seu tamanho durante a fase lútea do ciclo menstrual e gravidez (CLAUS, *et al.* 2007; VADIVELU, *et al.* 2010).

Estudos demonstram o risco de desenvolvimento de meningiomas associado com ao uso de hormônios em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa. WIGERTZ et al (2008) relataram aumento o surgimento de meningiomas em mulheres na pós-menopausa com uso de terapia de reposição hormonal. Mulheres que utilizaram anticoncepcionais hormonais por longo período também obtiveram aumento do risco de meningioma (WIGERTZ, *et al.* 2008; WIEMELS, *et al.* 2010).

Mesmo as taxas de terapia de reposição hormonal (TRH) terem diminuído nos últimos anos, o uso de contraceptivos orais permanecem com grande uso, o medicamento mais usado entre as mulheres. Se tornando um questionamento comum sobre a conveniência do uso desses medicamentos entre os neurocirurgiões e neuro-oncologistas, avaliando também sobre os riscos para a saúde global, como o risco de câncer de mama e endométrio, como risco também de doença cardio e cerebrovascular. (CLAUS, *et al.* 2007) Existem observações sobre a TRH, que pode ser um fator de risco para o meningioma, onde essa terapia também apresenta aumento do risco do câncer de mama, doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral isquêmico e trombose venosa; isso com o uso prolongado de TRH. (BLITSHTEYN, *et al.* 2008)

Estudos moleculares e imunohistoquímicos confirmam que o meningioma é um tumor hormônio sensível, aproximadamente 70% dos meningiomas expressam os receptores de progesterona e 30% expressam receptores de estrógeno. (BLITSHTEYN, *et al.* 2008)

Portanto, entender a iniciação e o crescimento dos meningiomas a nível molecular pode ajudar a definir alvos de terapia molecular (CLAUS et al., 2008). Neste contexto, estudos recentes demonstram que pequenas moléculas de RNA proteína não codificantes, chamadas de microRNAs (miRNAs ou miRs), funcionam

como supressores tumorais e oncogenes. Os miRNAs controlam o crescimento celular, diferenciação e apoptose, e a desregulação em sua expressão está relacionada à tumorigênese em vários tipos de tumores (KERSCHER e SLACK, 2006). Os miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento e progressão dos tumores cerebrais e atuam como reguladores importantes em algumas vias da tumorigênese desses tumores (TURNER, et al. 2010).

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA, contendo de 18-24 nucleotídeos que regulam a estabilidade ou a eficiência de transcrição do RNA mensageiro (mRNA) (MENDELL, 2005). Aproximadamente 40% a 50% dos mRNA dos mamíferos podem ser regulados a nível de transcrição por microRNAs. Nos mamíferos, microRNAs específicos controlam o desenvolvimento, destino das células neuronais e apoptose (JEYASEELAN et al.,2009).

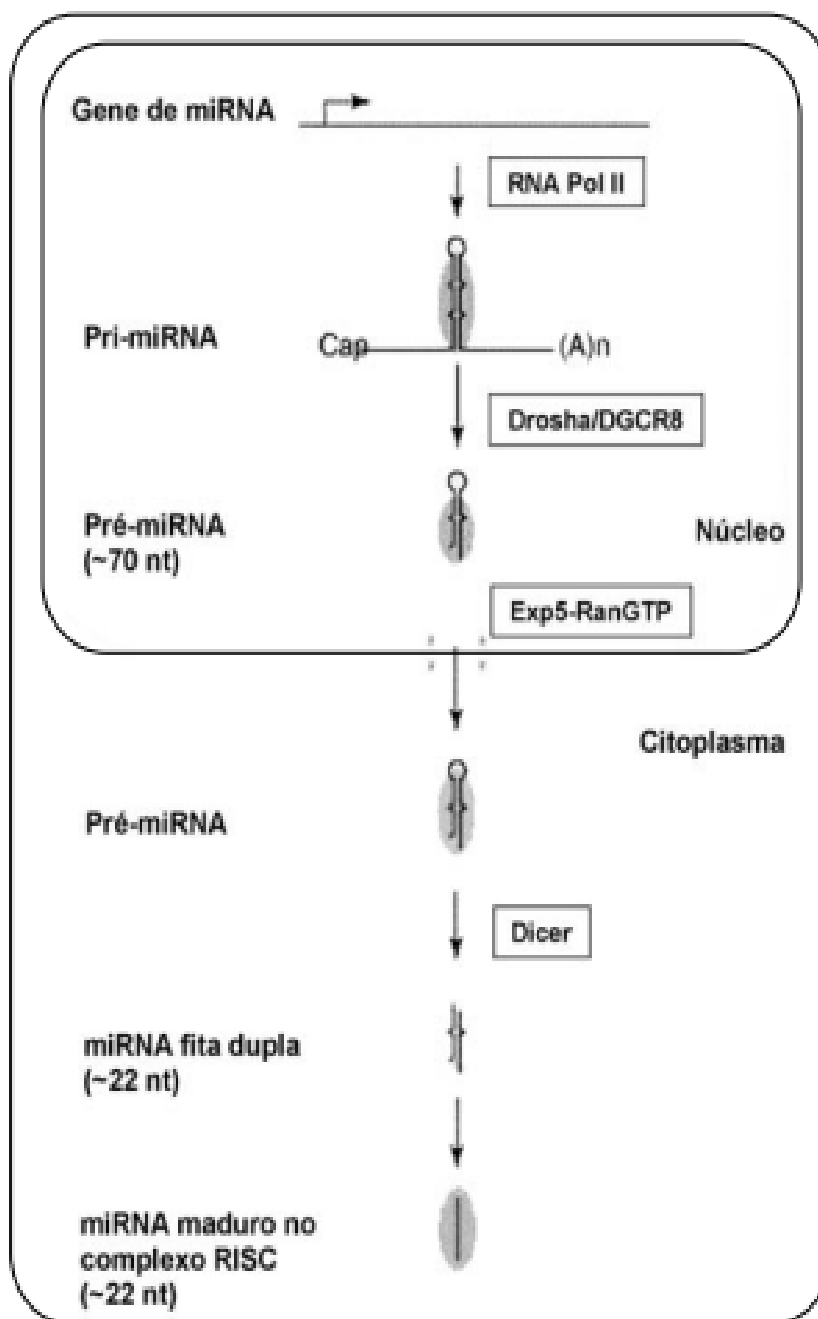
Os primeiros membros descobertos desta família foram lin-4 e let-7, que surgiram durante os anos 1990 a partir de estudos genéticos de nematóides mutantes. (LAI, 2003) Quando associados com suas proteínas, formam um dos complexos de ribonucleoproteína mais abundantes na célula, logo a bioinformática foi desenvolvida para complementar as abordagens experimentais na identificação dos genes. (BARTEL, 2004)

O processo de formação e atividade do microRNA inicia-se através da enzima RNA polimerase II que irá gerar um longo transcrito de microRNA primário (pri-miRNA) que, posteriormente, é clivado pela Drosha e, no citoplasma, é processado pela Dicer (PORKKA et al.,2007). O microRNA primário é processado através de um mecanismo conservador para produzir a maturação do microRNA. Os microRNAs são processados por um alto regulador, a fim de controlar a quantidade de microRNA ativo nas células. (LAWLER ; CHIOCCA, 2009).

A biogênese do microRNA (Figura 1), inicia-se com a transcrição do gene pelo RNA polimerase II, ao longo da sua transcrição. Durante essa transcrição, é gerado um microRNA primário (pri-miRNA), que será clivado ainda no núcleo da célula pela Drosha e seu cofator, gerando um microRNA maduro (pré-miRNA) com aproximadamente, 70 nucleotídeos .Rapidamente ,esse pré-miRNA será enviado para o citoplasma da células, através da exportina 5 e seu cofator, onde ele vai ser processado pela Dicer gerando um microRNA, de fita dupla de, aproximadamente, 22 nucleotídeos. O microRNA é enviado para dentro do complexo RISC; apenas

uma fita duplex permanece no complexo pra controlar expressão pós transcricional e gene alvo (FILHO E KIMURA, 2006).

Figura 1. Biogênese dos microRNAs (Kimura e Ricarte Filho, 2006).



Saydan et al. (2009), utilizaram microarrays para detectar 407 microRNAs, em 14 meningiomas. Os resultados demonstraram que 43 microRNAs estavam desregulados na maioria das amostras de meningiomas. Houve alterações na de expressão de 20 microRNAs; esses foram validados por qRT-PCR, sendo que 17

estavam altamente expressos e 3 apresentaram-se hipoexpressos em dois ensaios independentes. Os microRNAs que foram confirmados como hiperexpressos pela técnica de qRT-PCR foram miR-19b, let7d, let7g, miR-100, miR-125a, miR-103, miR-370, miR-106b, miR-106a, miR-125b, let7b, miR-26a, miR-23b, e miR-29a. Os três microRNAs hipoexpressos, ou seja, que apresentaram uma diminuição acentuada nos níveis de expressão foram miR-200a, miR-373 e miR-575. Em seguida, em outro ensaio foi observado que o miR-200a demonstrou um papel fundamental no crescimento dos meningiomas. A redução do nível do miR-200a contribuiu para tumorigênese, através de dois caminhos convergentes, mediadas por uma alta regulação de três alvos deste microRNA.

Em estudo recente, Katar et al (2017) observaram um aumento da expressão do miR-21 e, inversamente, diminuição da expressão de miR-107 de acordo com o grau histopatológico.

Zhi e colaboradores (2016) constataram aumento nos níveis séricos dos microRNAs: miR-106a-5p, miR-219-5p, miR-375 e miR-409-3p enquanto que os miRNAs: miR-197 e miR-224 apresentaram-se hipoexpressos. Também constaram que a alta expressão de miR-409-3p e baixa expressão de miR-224 foram significativamente correlacionadas com maiores taxas de recorrência.

Evidências substanciais sugerem o envolvimento de algumas vias moleculares na tumorigênese dos meningiomas, entre elas destacam-se as vias dos receptores hormonais. Também, sabe-se que os microRNAs atuam como moduladores tumorais em vários tipos de neoplasias, inclusive nos tumores do Sistema Nervoso. Portanto, a identificação dos microRNAs que possam regular a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona poderá contribuir futuramente na classificação molecular, diagnóstico, prognóstico e tratamento mais eficazes dos meningiomas, assim como elucidar se essas importantes vias estão associados a progressão tumoral.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que alguns microRNAs, que tem como alvo receptores de estrógeno e progesterona, possam estar associados com o mecanismo de progressão tumoral em meningiomas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de microRNAs, que tem como alvos receptores de estrógeno e progesterona, em amostras de tecido tumoral e plasma de pacientes com diagnóstico de meningiomas, assim o papel desses miRNAs como possíveis biomarcadores associados a progressão tumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão de microRNAs associados as vias dos receptores de estrógeno e progesterona: miR-34, miR-143, miR-145 e miR-335 em amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I, II e III;

- Quantificar a expressão de microRNAs associados as vias dos receptores de estrógeno e progesterona: miR-34, miR-143, miR-145 e miR-335 em amostras de plasma e de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I, II e III;

PACIENTES E METÓDOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Serão utilizadas 40 amostras de meningiomas, sendo 16 meningiomas grau I, 16 meningiomas grau II, 8 meningiomas grau III e 10 amostras controle de aracnóide. As amostras tumorais foram obtidas de cirurgias realizadas pela equipe médica de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e encontram-se armazenadas em Biorrepositório da Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. O diagnóstico clínico e histopatológico foi realizado conforme critérios descritos pela OMS.

Todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram abordados no pré-operatório para a obtenção de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. É importante salientar que todos os investigadores envolvidos neste projeto, bem como os pacientes, foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram um acordo formal, antes da coleta. As amostras já existentes pertencem a um banco de tumores aprovado pela Comissão de Ética do HCFMRP/USP. O presente estudo também foi aprovado pelo CEP em processo HCRP nº 5940/2016.

Os microRNAs estudados miR-34a, miR-143, miR-145 e miR-335 foram selecionados pela literatura em artigos científicos que comprovaram que os mesmos regulam a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de RNA das amostras de tecido tumoral

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

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

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também utilizamos um equipamento chamado Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 considera-se que o material esteja degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. A faixa ideal a ser obtida é de 1,7 a 1,9, porém consideramos uma amostra boa na faixa de 1,61 a 1,99.

4.2.2 Extração do RNA do plasma

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

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

4.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos microRNAs

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) do microRNA, a transcrição reversa foi feita utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados 0,75 μ l de RT Buffer, seguido de 0,075 μ l de dNTP's, 1,5 μ l de *primers* específicos (miRNAs e controles endógenos), e 0,5 μ l da enzima MultiScribeTM, 0,094 μ l de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5 μ l, e sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a $16^{\circ}C$, 30 min a $42^{\circ}C$, 5 min a $85^{\circ}C$ e, em seguida, a $4^{\circ}C$. Para o PCR em tempo real, foram utilizados 4,5 μ L do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10 μ L.

4.2.4 RQ microRNAs: miR-34a, miR-143, miR-145 e miR-335

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial de microRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase, tradução literal de *Polymerase*

Chain Reaction (PCR), quantitativa em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

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

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

Realizamos a quantificação relativa dos microRNAs miR-34a, miR-134, miR-145 e miR-335, nas quais as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico Taqman Máster Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA. Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), juntamente com o *software* Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram, então, exportados para planilhas do *software* Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

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

4.2.5 Análise estatística

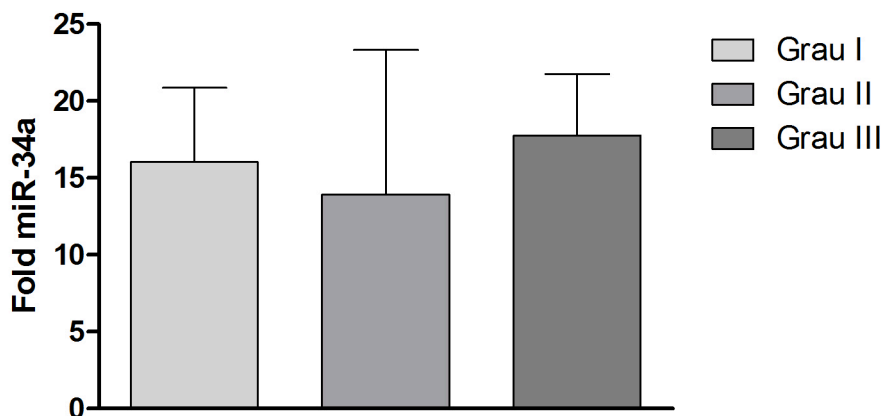
Para a análise da expressão gênica pelo método quantitativo de PCR em tempo real foram calculados os coeficientes de regressão; uma transformação *log* será aplicada para os valores de expressão dos genes para estabilização da variância. Também foram calculados intervalos de confiança de 95% (IC). O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

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 miRNA-34a no Tecido Tumoral

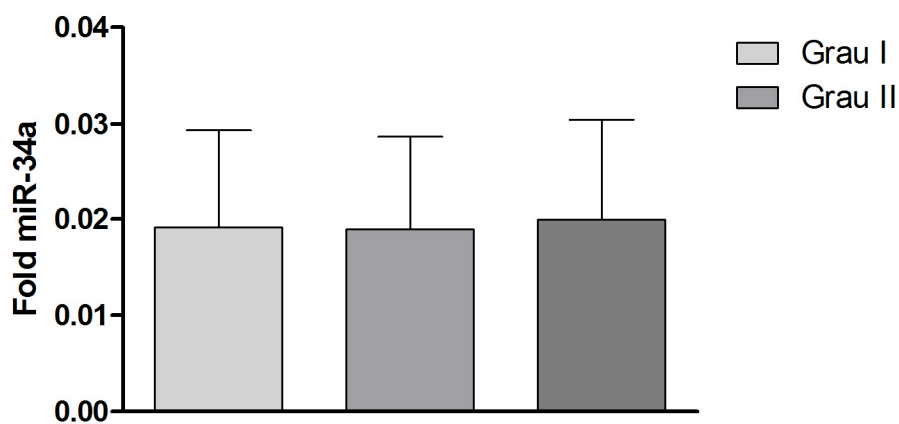
Gráfico 1. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-34a entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0201$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.2 miRNA-34a no Plasma

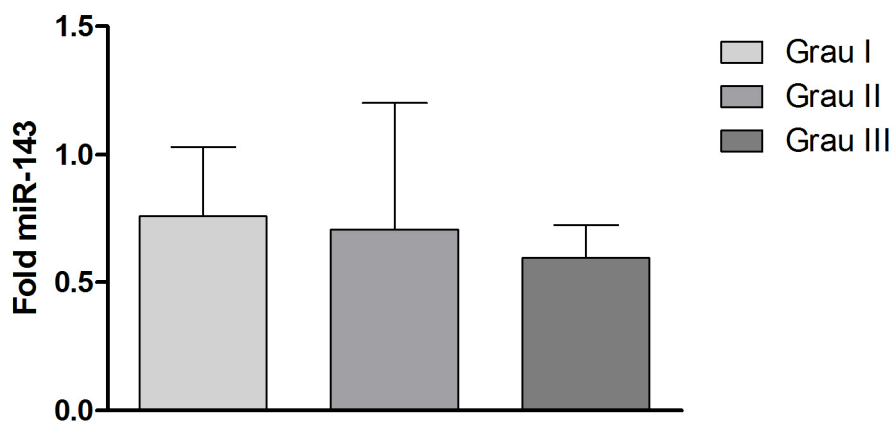
Gráfico 2. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-34a entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,6753$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.3 miRNA-143 no Tecido Tumoral

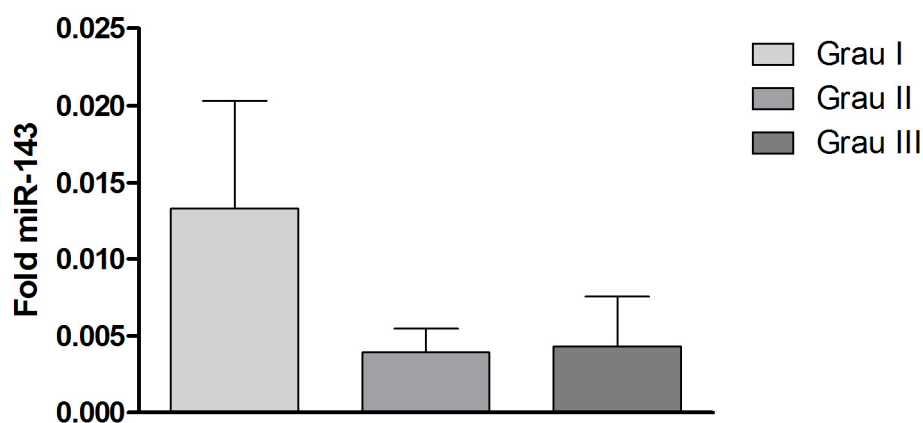
Gráfico 3. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-143 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0591$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.4 miRNA-143 no Plasma

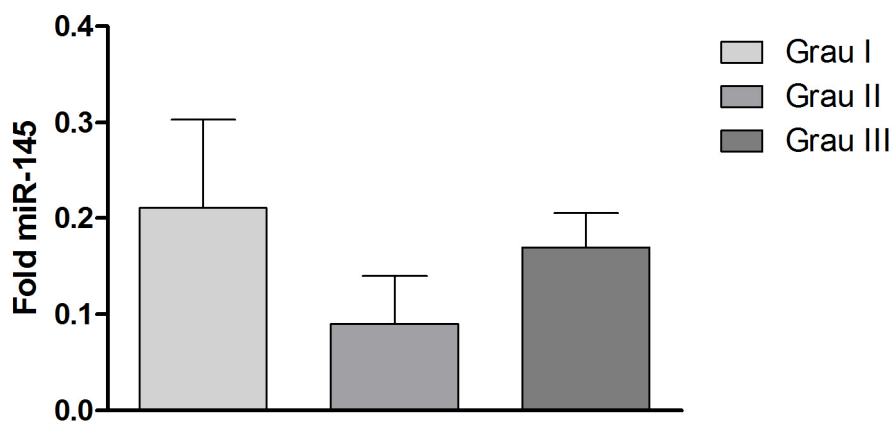
Gráfico 4. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-143 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,5590$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.5 miRNA-145 no Tecido Tumoral

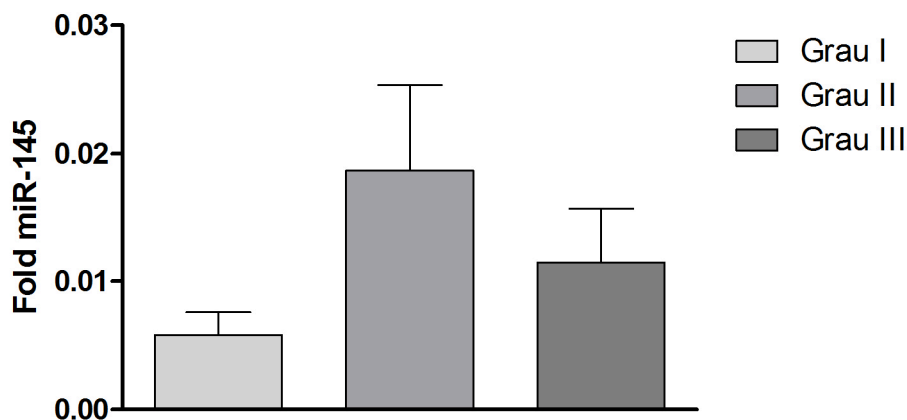
Gráfico 5. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,0379$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.6 miRNA-145 no Plasma

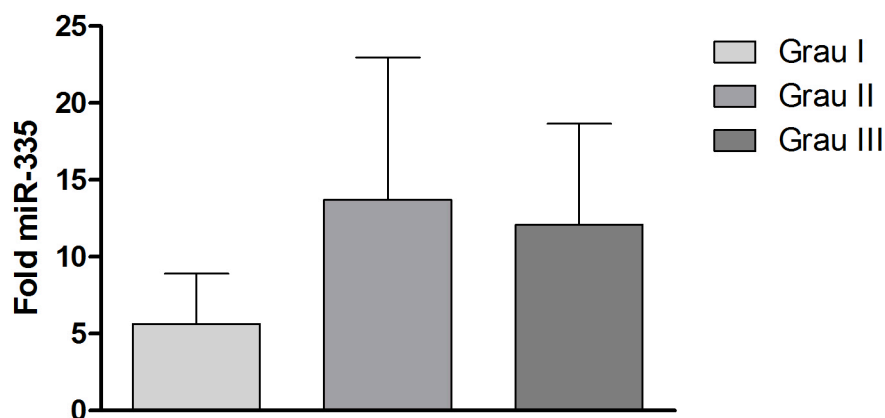
Gráfico 6. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1939$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.7 miRNA-335 no Tecido Tumoral

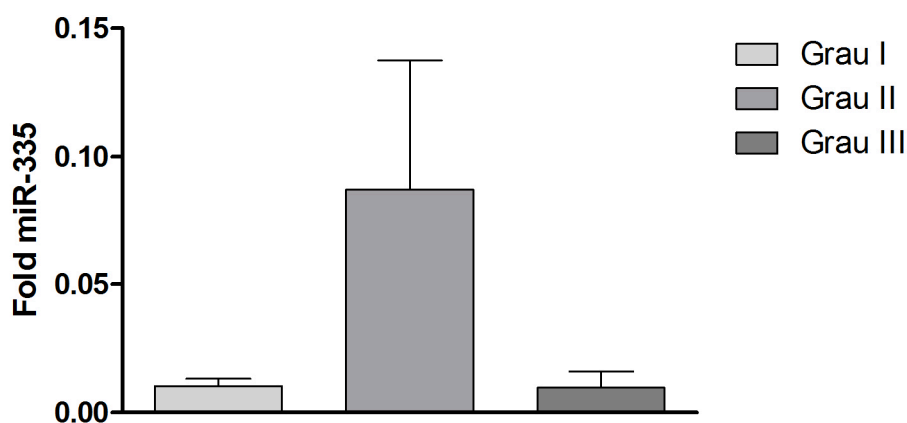
Gráfico 7. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-335 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1522$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

5.8 miRNA-335 no Plasma

Gráfico 8. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-335 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos de meningioma grau I, meningioma grau II e meningioma grau III ($p = 0,1719$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Estudos tem investigado a relevância dos receptores de estrogênio e progesterona no prognóstico de pacientes com diagnóstico de meningioma, sendo relatado maior crescimento tumoral de meningiomas em mulheres durante a gravidez ou que fazem uso de terapia hormonal após a menopausa (HUA et al., 2017). Dessa forma, tem sido observado que esses hormônios aceleram o crescimento das células tumorais em meningiomas, ocorrendo uma maior predisposição de meningiomas benignos no sexo feminino e de meningiomas grau III no sexo masculino (HUA et al., 2017).

Leães et al. (2010) ao analisarem a expressão dos receptores de estrógenos (ER) em amostras de 126 pacientes com diagnóstico de meningioma e de 19 indivíduos normais (controle), observaram a expressão de ER em 24,6% dos pacientes com meningioma e 0% dos indivíduos normais (controle) (LEAES et al., 2010). Diferentes pesquisas têm estabelecido também uma ligação do meningioma e esteróides sexuais, sendo observada a presença de predominância de receptores de progesterona com menor número de receptores de estrógeno em tumores de grau I. Já os tumores de graus, II e III tem demonstrado quantidade menor de receptores de progesterona (HARLAND et al., 2017).

Estudos moleculares sobre meningiomas benignos de crescimento lento podem adicionar conhecimentos importantes sobre fatores subjacentes à formação de tumores, bem como fatores que impeçam tumores benignos de progredirem para malignidade. Atualmente, pesquisas que visam o esclarecimento da tumorigênese baseiam-se principalmente no estudo de tumores malignos, sendo a biologia das neoplasias benignas raramente é investigada. Portanto, estudos com o objetivo de associar uma possível integração entre as vias moleculares dos receptores hormonais com as vias de progressão tumoral podem contribuir para o entendimento da tumorigênese dos meningiomas assim como identificação de miRNAs que regulem essas vias será uma avanço no desenvolvendo de novas ferramentas para o diagnóstico, prognóstico e tratamento desses tumores. Nesse contexto, em nosso estudo, identificamos miRNAs previamente caracterizados com reguladores dos receptores de estrógeno e progesterona e avaliamos a expressão dos mesmos nos diferentes graus de meningiomas.

El-Gewely et al. (2016), ao realizarem estudo utilizando 22 amostras das quais 15 eram amostras de meningiomas de grau I e II e 6 amostras eram de controle (aracnoide e dura-máter), observaram uma hiporeexpressão do miR-34a em meningiomas de grau I e II em comparação com tecido normal da dura-máter. No entanto, nenhuma diferença de expressão desse miRNA foi observada entre os tecidos tumorais de grau I e II (EL-GEWELY et al., 2016).

Gao et al. (2013) ao avaliarem a expressão do miR-34a em amostras de pacientes com glioma, observaram uma baixa expressão desse miRNA quando comparada a amostras de tecido cerebral normal. Além disso, amostras de glioma que apresentaram alta expressão do miR-34a demonstraram níveis de expressão reduzido de Bcl-2 quando comparados aos tecidos com baixa expressão do miR-34a. Portanto, esses achados indicam que o papel do miR-34a na progressão tumoral está inversamente correlacionado com a expressão de Bcl-2, apresentando assim evidências desse miRNA como novo biomarcador com potencial para detecção e prognóstico de gliomas (Gao *et al.*, 2013).

Wang et al., 2017 demonstraram em células de câncer de mama a expressão diminuída do miR-34a em relação a células epiteliais da mama. Evidenciaram também a diminuição dos níveis de expressão de miR-34a nas linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo, ER e HER-2, quando comparadas com células epiteliais da mama controle, não sendo observada diferença do miR-34a entre os tumores de mama PR-positivo e PR-negativo. Esses achados demonstram um importante papel do miRNA-34a na tumorigênese do câncer de mama (WANG et al., 2017).

Em nosso estudo, as análises das amostras teciduais de meningiomas demonstraram diminuição nos níveis do miR-34a nas amostras de grau II quando comparadas aos graus I e III, assim como discreto aumento na expressão desse miRNA nas amostras de tumores grau III em relação aos tumores graus I e II. Nas amostras de plasma não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os diferentes graus tumorais. Portanto, apesar das diferenças previamente descritas não foi observada correlação entre a expressão do miR-34a com a progressão tumoral .

O miRNA-143 ainda é pouco estudado na literatura, o estudo de Chang et al. (2015) avaliaram o perfil de expressão global de miRNAs por *microarray* em 24 amostras de câncer de mama triplo negativo, identificando 25 miRNAs que estavam

desregulados em pacientes portadoras de câncer de mama. Em seguida para validar os resultados, foram selecionados randomicamente 7 desses miRNAs para serem quantificados em amostras de câncer de mama por PCR-RT. Os miRNAs: miR-143-5p, miR-145-3p, miR-145-5p e miR-143-145 demonstraram baixos níveis de expressão em pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo quando comparados amostras de tecido adjacentes de mama normal, sugerindo assim o miR-143 como potencial biomarcador para a detecção precoce do câncer de mama triplo negativo (Chang *et al.*, 2015).

Kodahl *et al.*, 2014, analisaram a expressão diferencial de 174 miRNAs em amostras de soro de pacientes pós-menopausa com receptor de estrógeno positivo no estágio inicial de câncer de mama através da técnica microRNA PCR array, sendo identificados 9 miRNAs diferencialmente expressos. Para que fossem validados os resultados, foram utilizadas 60 amostras de soro de pacientes pós-menopausa com receptor de estrógeno positivo no estágio inicial do câncer de mama por PCR-RT. Dentre os 9 miRNAs validados, os miRNAs miR-133a, miRNA-139-5p, miRNA-143, miR-145 e miR-365 se apresentaram hipoexpressos em amostras de câncer de mama receptor de estrógeno positivo, enquanto que os miRNAs- 15a, miRNA-18a, miRNA-107 e miRNA-425 demonstraram-se hiperexpressos nas amostras de câncer de mama receptor de estrógeno positivo. Esses achados demonstram que alguns miRNAs também estão envolvidos na tumorigênese do câncer de mama, sugerindo que o miRNA-143 pode futuramente ser utilizado como biomarcador para detecção e avaliação da eficácia do tratamento de pacientes portadores de câncer de mama (Kodahl *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, não observamos diferença estatística significativa nas amostras de tecido tumoral entre os diferentes graus. Também não constatamos diferenças nas amostras de plasma entre os tumores grau I, II e III. O que pode demonstrar que o miR-143 não tem envolvimento na progressão dos meningiomas e que o mesmo não tem potencial como biomarcador para esse tipo de tumor cerebral.

Alguns estudos da literatura também sugerem o miR-145 como supressor do crescimento e a migração celular em amostras de câncer de mama em relação ao tecido normal da mama (PIPERIGKOU, *et al.*, 2017). Chang *et al.* (2015) demonstraram que o miR-143-5p e o miR-145-5p estavam hipoexpressos em 24 amostras de câncer de mama triplo quando comparado a 14 amostras de tecido normal adjacente (CHANG *et al.*, 2015).

O miR-145 tem sido descrito na literatura como o primeiro miRNA associado a meningiomas de alto grau, sendo responsável pelo crescimento proliferativo de meningiomas invasivos. Todavia, os mecanismos moleculares responsáveis pela redução da expressão de miR-145 em meningiomas atípicos e anaplásicos não foram elucidados. Kliese et al., 2013 observaram em cultura de células que a diminuição dos níveis de expressão do miR-145 em meningiomas agressivos está associada a maior motilidade e invasão tumoral (KLIESE, et al 2013).

Dados da literatura tem descrito a expressão do miR-145 em diferentes tipos de tumores. Em glioblastoma, a hiperexpressão do miR-145 tem sido relacionada a invasão tumoral, enquanto que no câncer gástrico tem sido associado a inibição da invasão e metástase. Sabe-se, também, que esse miRNA é negativamente regulado pela metilação do DNA no câncer de próstata (KLIESE, et al 2013). Em nosso estudo, o miR-145 apresentou diminuição nos níveis nas amostras de grau II quando comparadas aos graus I e III, assim como discreto aumento na expressão nos tumores grau I em relação aos graus II e III. Nas amostras de plasma não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os diferentes graus tumorais.

Estudos demonstram que o miR-335 apresenta níveis de expressão desregulado em vários tipos de tumores, sugerindo dessa forma um importante papel desse miRNA na tumorigênese. Shi et al., 2012, ao utilizarem 10 amostras de meningioma grau I, 05 amostras de meningioma grau II e 10 amostras de meningioma grau III, observaram a hiperexpressão do miR-335 nas amostras teciduais dos meningiomas, principalmente em amostras de meningiomas de grau III quando comparado com o tecido controle da aracnoide. Os autores descrevem o papel do miR-335 como um potencial oncogene, uma vez que, a sua supressão em ensaios com células tumorais de meningiomas ocasionaram uma inibição da proliferação celular e a parada G0/G1 do ciclo celular. Esses achados demonstram o envolvimento do miRNA-335 na tumorigênese dos meningiomas, sugerindo que o miRNA-335 pode futuramente ser utilizado como biomarcador para detecção e avaliação da eficácia do tratamento de pacientes portadores de meningiomas (SHI, et al, 2012). Em nosso estudo não observamos diferenças estatísticas entre os diferentes graus histopatológicos tanto nas amostras de tecido tumoral quanto nas amostras de plasma, o que nos permiti sugerir que talvez ocorra uma especificidade nas vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e progressão dos meningiomas

associadas a etnia dos pacientes. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão da tumorigênese e progressão dos meningiomas, e assim consequentemente, a identificação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e tratamento desses tumores.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os microRNAs analisados, que tem como alvo receptores de estrógeno e progesterona, não apresentaram-se como possíveis biomarcadores associados a progressão tumoral dos meningiomas.

Os miRNAs miR-34a e miR-145 apresentaram baixos níveis de expressão nas amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau II quando comparados as amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I e III;

Os miRNAs miR-34a, miR-134, miR-145 e miR-335 apresentaram hipoexpressos nas amostras de plasma de pacientes com diagnóstico de meningiomas grau I, II e III.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- ALEXIOU, G et al., Genetic and molecular alterations in meningiomas. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 113, 261-267, 2010.
- AL-MEFTY, O et al., Radiation-induced meningiomas: clinical, pathological, cytokinetic, and cytogenetic characteristics. **J Neurosurg**, 100, 1002-1013, 2004.
- AL-MEFTY O, KADRI PA, PRAVDENKOVA S, SAWYER JR, STANGEBY C, HUSAIN M.J. Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. *Neurosurg*. 2004 Aug;101(2):210-8.
- BAST JR, R.C. *Cancer Medicine*. 5th ed. London: **American Cancer Society**; 2000.
- BOSNYAK, E.; KAMSON, D.O.; GUASTELLA, A.R.; *et al.* Molecular imaging correlates of tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in human meningiomas. **Neuro-Oncology**. 0, 1–9. 2015.
- CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 6(11):857-66. 2006.
- CARVALHO, L. H. et al., Molecular signatures define two main classes of meningiomas. **Molecular Cancer**, 6, 2007.
- CHAN, R.C.; THOMPSON, G.B. Morbidity, mortality, and quality of life following surgery. **J Neurosurg**.60:52-60, 1984.
- CHANG, Y. Y. et al. Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing. **Mol Cancer**, v. 14, p. 36, Feb 2015. ISSN 1476-4598.
- CHOY, W et al. The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. **Neurosurg Focus**, São Francisco, Califórnia, 30, 2011.
- CLAUS, E et al., Specific Genes Expressed in Association with Progesterone Receptors in Meningioma. **Cancer Res**, 68: 314-322, 2008.
- DUMANSKI, J.P.; ROULEAU, G.A.; NORDENSKJOLD, M.; *et al.* Molecular Genetic Analysis of Chromosome 22 in 81 Cases of Meningioma. **Cancer Research** 58:61-5867. 1990.

- EL-GEWELY, M. et al. Differentially Expressed MicroRNAs in Meningiomas Grades I and II Suggest Shared Biomarkers with Malignant Tumors. **Cancers**, v. 8, n. 3, p. 31, 3 mar. 2016.
- ESQUELA-KERSCHER A1, SLACK FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr; 6(4):259-69.
- FILHO, R.M.C.J.; KIMURA, T.E. MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 50: 1102- 1107, 2006.
- FUTREAL, P.A.; COIN, L.; MARSHALL, M.; *et al.* A census of human cancer genes. **Nat Rev Cancer**. 4:177-183. 2004.
- GAO, H.; ZHAO, H.; XIANG, W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. **J Neurooncol**, v. 113, n. 2, p. 221-8, Jun 2013. ISSN 1573-7373.
- GRUNBERG, S.M.; RANKIN, C.; TOWNSEND, J.; *et al.* Phase III double-blind randomized placebo controlled study of mifepristone (RU486) for treatment of unresectable meningioma. **ACSO Proc** 20:56a, 2001.
- HASHIMOTO et al., Diagnostic molecular genetics and its application to clinical decision in brain tumors. **Elsevier Science**, 221-229, 2002.
- HUA, L. et al. Prognostic value of estrogen receptor in WHO Grade III meningioma: a long-term follow-up study from a single institution. *Journal of Neurosurgery*, p. 1–9, 18 ago. 2017.
- HUG, E.B.; DE VRIES, A.; THORNTON, A.F. *et al.* Management of atypical and malignant meningiomas: role of high-dose, 3D-conformal radiation therapy. **Journal of Neuro-Oncology** 48: 151–160, 2000.
- JORDI, B.; BRELL, M., FERRER, I.; *et al.* Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. **Neuropathology**. 27, 114–120. 2007.
- KATAR S, BARAN O, EVRAN S, CEVIK S, AKKAYA E, BARAN G, ANTAR V, HANIMOGLU H, KAYNAR MY. Expression of miRNA-21, miRNA-107, miRNA-137 and miRNA-29b in meningioma. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017 May; 156:66-70. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.03.016. Epub 2017 Mar 20.

- KERSCHER, A.E.; SLACK, F.J. Oncomirs — microRNAs with a role in câncer. **Nat Rev Cancer**. 6:259-269. 2006.
- KLIESE N, GOBRECHT P, PACHOW D, ANDRAE N, WILISCH-NEUMANN A, KIRCHES E, RIEK-BURCHARDT M, ANGENSTEIN F, REIFENBERGER G, RIEMENSCHNEIDER MJ, MEESE E, PANAYOTOVA-DIMITROVA D, GUTMANN DH, MAWRIN C. miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells. *Oncogene*. 2013 Sep 26;32(39):4712-20. doi: 10.1038/onc.2012.468. Epub 2012 Oct 29.
- KIM, V.N.; NAM, J.W. Genomics of microRNA. **TRENDS in Genetics** Vol.22 No.3 March 2006.
- KODAHL, A. R. et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. **Mol Oncol**, v. 8, n. 5, p. 874-83, Jul 2014. ISSN 1878-0261.
- LAWLER S, CHIOCCAEA. Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2009 May; 92(3):297-306.
- LEÃES CG, MEURER RT, COUTINHO LB, FERREIRA NP, PEREIRA-LIMA JF, DA COSTA OLIVEIRA M: Immunohistochemical expression of aromatase and estrogen, androgen and progesterone receptors in normal and neoplastic human meningeal cells. *Neuropathology* 30:44–49, 2010.
- LOPES-GUINÉS, C.; CERDÁ-NÍCOLAS, M.; GIL-BENZO, R.; *et al.* Association of Loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. **Cancer Genetics e Citogenetics**. 148:123-128. 2004.
- LOMAS, J.; BELLO, M.J., ARJONA, D.; *et al.* Analysis of p73 Gene in Meningiomas with deletion at 1p. **Cancer Genetics and Citogenetics**. 129:88-91. 2001.
- LUDWIG, N.; KIM, Y.J.; MUELLER, S.C.; *et al.* Posttranscriptional deregulation of signaling pathways in meningioma subtypes by differential expression of miRNAs. **Neuro-Oncology** 17(9), 1250–1260, 2015.
- LUSIS, E; GUTMANN, D. Meningioma: an update. **Current Opinion in Neurology**, St Louis, USA, v.17, p. 678-692, 2004.
- KRAMPLA, W.; NEWRKLA, S.; PFISTERER, W.; *et al.* Frequency and risk factors for meningioma in clinically healthy 75-year-old patients. **American Cancer Society**. 1208–1212, 2004.

- KO, K.W.; NAM, D.H.; KONG, D.S.; *et al.* Relationship between malignant subtypes of meningioma and clinical outcome. **Journal of Clinical Neuroscience** 747–753, 2007.
- KULSHRESHTLA, R.; FERRACIN, M.; NEGRINI, M.; *et al.* Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. **Cell Cycle**. 6:1426-1431. 2007.
- MARCISCANO, A.E.; RACHAMIMOV, A.O.S.; NIEMIERKO, A.; *et al.* Benign meningiomas (WHO Grade I) with atypical histological features: correlation of histopathological features with clinical outcomes. **J Neurosurg**. DOI: 10.3171/2015.1.JNS142228. 2015.
- MAROSI, C *et al.* Meningioma. **Oncology Hematology**, Viena, Austria. V. 67, p. 153-171, jan. 2008.
- MARWIN, C; PERRY A. Pathological classification and molecular genetics of meningioma. **JNeurooncol**, San Francisco, California, v.99, p.379-391, 2010.
- MCCUTCHEON I.E.; FLYVBJERG, A.; HILL, H.; *et al.* Antitumor activity of the growth hormone receptor antagonist pegvisomant against human meningiomas in nude mice. **J Neurosurg**. 94:487-492. 2001.
- NICOLAS, M.C.; GINES, C.L.; BACETE, M.P.; *et al.* Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors. **Journal of Neuro-Oncology** 47: 99–108, 2000.
- NUNES, F.; YIPING, S.; NIIDA, Y.; *et al.* Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. **Cancer Genetic and Cytogenetics**. 135-139. 2005.
- PEARSON, B.E.; MARKERT, J.M.; FISHER, W.S.; *et al.* Hitting a moving target: evolution of a treatment paradigm for atypical meningiomas amid changing diagnostic criteria. **Neurosurg Focus** 24 (5):E3. 2008.
- PERRY, A.; STAFFORD, S.L.; SCHEITHAUER, B.W.; *et al.* Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. **Am J Surg Path**. 21 : 1455–65. 1997.
- PHAM, M *et al.* Molecular genetics of meningiomas: aststematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. **Neurosurg Focus**, Los Angeles, Califórnia, v.30, 2011.

- PORKKA KP1, PFEIFFER MJ, WALTERING KK, VESSELLA RL, TAMMELA TL, VISAKORPI T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.
- RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J.L.; *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Res.** 14:1902-1910. 2004.
- SARAF, S.; MCCARTHY, B.J.; VILLANO, J.L. Update on Meningiomas. **The Oncologist.**16:1604–1613. 2011.
- SAYDAM, O *et al.* Downregulated MicroRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-Cadherin and Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 29, p. 5923–5940, 2009.
- SEIZINGER, B. P.; DE LA MONTE, S.; ATKINS, I.; *et al.* Molecular genetic approach to human meningiomas: loss of genes on chromosome 22. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84: 5419-5423. 1987.
- SIMON, M.; BOSTROM, J.; SCHRAMM, J. Interinstitutional variance of postoperative radiotherapy and follow up for meningiomas in Germany: impact of changes of the WHO classification. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 77:767–773. 2006.
- TUNNER, J.D.; WILLIAMSON, R.; ALMEFTY, K.K.; *et al.* The many roles of microRNAs in brain tumor biology.28: 1-7. 2010.
- TURNER JD, WILLIAMSON R, ALMEFTY KK, NAKAJI P, PORTER R, TSE V, KALANI MY The many roles of microRNAs in brain tumor biology. *Neurosurg Focus.* 2010 Jan;28(1):E3.
- VADIVELU S1, SHARER L, SCHULDER M. Regression of multiple intracranial meningiomas after cessation of long-term progesterone agonist therapy. *J Neurosurg.* 2010 May;112(5):920-4.
- YANO, S.; KURATSU, J.I.; THE KUMAMOTO BRAIN TUMOR RESEARCH GROUP. Indications for surgery in patients with asymptomatic meningiomas based on an extensive experience. **J Neurosurg**105:538–543, 2006.
- WANG Y, ZHANG X, CHAO Z, KUNG HF, LIN MC, DRESS A, WARDLE F, JIANG BH, LAI L. MiR-34a modulates ErbB2 in breast cancer. *Cell Biol Int.* 2017 Jan;41(1):93-101. doi: 10.1002/cbin.10700.

- WHITTLE IAN; SMITH COLIN; NAVOO PARTHIBAN; COLLIE DONALD. Meningiomas. **Lancet**, 2004; 363: 1535-43.
- WIEMELS, J.; WRENSCH, M.; CLAUS, E.B. *et al.* Epidemiology and etiology of meningioma. **J Neurooncol** 99:307–314, 2010.
- WICKREMESEKERA, A.; HOVENS, C.M.; KAYE, A.H. Expression of ErbB-1 and ErbB-2 in meningioma. **Journal of Clinical Neuroscience**. 1155–1158. 2010.
- WIGERTZ A1, LÖNN S, HALL P, AUVINEN A, CHRISTENSEN HC, JOHANSEN C, KLAEBOE L, SALMINEN T, SCHOEMAKER MJ, SWERDLOW AJ, TYNES T, FEYCHTING M. Reproductive factors and risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Oct;17(10):2663-70.
- WILLIS, J.; SMITH, J.W., ERRIDGET, S. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. **Neuropathology and Applied Neurobiology**.31, 141–149. 2005.
- YAO-YIN CHANG, WEN-HUNG KUO, JUI-HUI HUNG, CHIEN-YUEH LEE, YUNG-HUA LEE, YA-CHU CHANG, WEN-CHUN LIN, CHENG-YING SHEN, CHIUN-SHENG HUANG, FON-JOU HSIEH, LIANG-CHUAN LAI, MONG-HSUN TSAI, KING-JEN CHANG, ANDERIC Y CHUANG SACHDEVA M, MO YY. Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res*. 2010;70:378–87.
- ZHI F, SHAO N, LI B, XUE L, DENG D, XU Y, LAN Q, PENG Y, YANG Y. **A serum 6-miRNA panel as a novel non-invasive biomarker for meningioma**. *Scientific Reporter*. 2016 Aug 25;6:32067.