



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

CARLOS EDUARDO MATOS CARVALHO BASTOS

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM
MENINGIOMAS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

BELÉM - PA
2013

CARLOS EDUARDO MATOS CARVALHO BASTOS

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM
MENINGIOMAS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular
Orientador: Prof. Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi
Co-orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

BELÉM - PA
2013

*“You’ll never get to Heaven
IF you’re scared of getting high”*

(Kylie Minogue – Red Blooded Woman)

Às mulheres de minha vida:
minha mãe Suely, minha avó Isabel
e minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cleusa Nagamachi por ter aberto as portas do LabCito pra mim, por ter confiado no meu potencial e ter me apoiado perante os muitos obstáculos que surgiram durante essa jornada. Sempre foste uma leoa protegendo seu “filho científico”.

Ao Prof. Dr. Júlio Pieczarka pelo apoio, pelas ajudas e correções de resumos, artigos.

Ao Prof. Dr. Nilson Anselmo, coordenador do Projeto “Caracterização Citogenética e Molecular de Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense”, por me permitir ser parte desse projeto.

À Profa. Dra. Bárbara Borges, não somente pela grande ajuda, conversas, discussões científicas, mas por ser uma grande amiga que muito admiro. Sabes que sou teu fã e sempre serei grato por TUDO.

Ao Prof. Dr. Eduardo Santos, pela grande contribuição para a finalização desse trabalho. Agradeço por estar sempre pronto e disponível para ajudar.

À minha família que abdicou da minha presença para poder apoiar (em todos os sentidos) os meus sonhos. Mesmo de longe, sempre foi (e será) minha fortaleza mais segura. Todo o amor, apoio emocional e financeiro e mesmo os puxões de orelha jamais serão esquecidos. Agradeço todo dia por ter a melhor mãe, avó e irmãs do mundo.

À minha família paraense, grandes amigos que atuam como pais e mães (e às vezes como irmãos caçulas birrentos) em Belém: Alex Klautau, Alexandre Daibes, Ana Patrícia Cordeiro, Benedito Diniz Jr, Diego Pinheiro, Isabela Diniz e Jamilly Pinto. Sou muito grato pela força, pelo cuidado, pela amizade, pela dedicação, conselhos e por todo amor. Não conseguiria passar por tudo sem vocês ao meu lado.

Aos meus amigos que mesmo não tão perto, sempre se fazem presentes: Alan Gonçalves, Carine Azevedo, Celso Alves Filho, Diego Faria, Fabrício Eleres, Frederico Mondale, Jarbiane Silva, Layanne Alves, Pollyana Sousa, Renato Moreira, Vanilson Silva e Viviane Conceição.

À família LabCito, que como toda família tem aqueles que são mais próximos, aqueles mais distantes, mas que funcionam junto como qualquer família. Em especial, ao Aduino, Adenilson, Cristiane, Ingrid, Karina, Stella, Thayse e Willam, pelos momentos tanto de ajuda e apoio, como nos de descontração fora do laboratório. À Milla Machado, que mesmo do Canadá, mandou seu apoio, amizade, carinho e artigos.

Aos técnicos Jorge Rissino, Shirley Ferreira e à Conceição Mandu. Esse trabalho não seria possível sem a assistência de vocês.

À Universidade Federal do Pará, em especial ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pela ajuda e apoio logístico.

Ao CNPq, CAPES e FAPESPA pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
1.2 BASE GENÉTICA DO CÂNCER	26
1.2.1 Ciclo celular e câncer	30
1.2.2 Oncogenes	31
1.2.3 Genes Supressores de Tumor	33
1.3 EPIGENÉTICA	34
1.3.1 Epigenética e câncer	37
1.3.2 Ciclo do Folato e carcinogênese	42
1.4 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	44
1.4.1 Meningiomas	45
1.4.2 Genética dos meningiomas	46
2. OBJETIVOS	49
3. CAPÍTULO I - Análise do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T em meningiomas na população paraense	50
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
Amostra	52
Extração de DNA genômico	52
Reação em cadeia da Polimerase	52
Sequenciamento do DNA	53
Análises Estatísticas	53
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	54
BIBLIOGRAFIA	57
4. CAPÍTULO II – Padrão de metilação dos miRNA 124a2 e miRNA124a3 em meningiomas na população paraense	63
RESUMO	63
INTRODUÇÃO	64

MATERIAL E MÉTODO	65
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	67
BIBLIOGRAFIA	69
5. CAPÍTULO III – Análise do padrão de metilação de genes supressores tumorais em meningiomas	75
RESUMO	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	77
Amostra	77
Ensaio de PCR de Metilação de DNA	77
Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento	77
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	79
BIBLIOGRAFIA	81
6. CONCLUSÕES GERAIS	87
7. BIBLIOGRAFIA	88
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	104
ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA – INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE	105

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Propriedades básicas adquiridas pelas células tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2010) 27
- Figura 2.** Ciclo celular e pontos de checagem. Durante o ciclo celular, células progridem da fase G1 para a fase S, onde ocorre a replicação de DNA. Células com o dobro de conteúdo de DNA passam da fase G2 para a fase M, onde ocorre a segregação cromossômica, seguida de divisão celular (citocinese). Células quiescentes (em G0) podem entrar no ciclo sob estímulo de mitógeno. Pontos de checagem impedem a progressão no ciclo celular se o processo não foi completado de forma satisfatória ou se existe dano no DNA. Pontos no início da fase G1 impedem que a célula entre em ciclo celular se as condições do meio não estiverem favoráveis à divisão. Na transição G1/S, é checada a integridade do material genético. O ponto de checagem em S previne que a célula sofra divisão sem que a sua replicação esteja completa. O ponto de checagem na transição G2/M, impede que a segregação cromossômica ocorra caso todas as cromátides não estejam ligadas ao fuso (VERMEULEN *et al.*, 2003) 31
- Figura 3.** Metilação da citosina. SAM = S-adenosil metionina; DNMT = DNA-metiltransferases (ZHU & YAO, 2007). 35
- Figura 4.** Efeito da metilação na transcrição. A) Representação de uma célula normal, com uma região promotora não-metilada (círculos brancos). A constituição da cromatina está transcricionalmente favorável, e caracterizada por nucleossomos espaçados e não compactados com histonas acetiladas (elipses lisas), permitindo o acesso de co-ativadores (CA), histonas acetilases (HAT) e fatores de transcrição (TF), mas não interagem com as DNA metil-transferases (DNMTs). B) Representação de uma célula cancerosa, metilada de forma aberrante (círculos pretos), apresentando nucleossomos compactados com histonas desacetiladas (elipse tracejada). O gene encontra-se silenciado transcricionalmente, pela interação com as DNMTs e o não acesso ao complexo transcricional (BAYLIN & HERMAN, 2000). 39
- Figura 5.** miRNA atuando como genes supressores tumorais e oncogenes. A) Tecido normal, transcrição correta do microRNA (miRNA), processamento e

ligação para complementaridade de sequências no RNAm-alvo resultando na repressão da expressão do gene-alvo através de bloqueio da tradução da proteína ou alteração da estabilidade do RNAm (não mostrado). Todos os resultados têm o nível normal de crescimento celular, proliferação, diferenciação e morte celular. B) MicroRNA atuando como supressor de tumor. Após mutação, ocorre redução ou deleção de um miRNA, que atua inibindo os transcritos oncogênicos. Todos os resultados podem envolver o aumento da proliferação, angiogênese, diminuição dos níveis de apoptose, não diferenciação ou desdiferenciação do tecido, conduzindo a formação do tumor. C) MicroRNA atuando como oncogene, resultaria na formação de um tumor. Após mutação, ocorre aumento na expressão do miRNA, que atuará inibindo transcritos de supressor de tumor. ORF (*Open Reading Frame* – Quadro aberto de leitura) Adaptado de ESQUELA-KERSCHER & SLACK (2006).

42

CAPÍTULO I

Figura 1 - Eletroferogramas representando os genótipos relativos ao polimorfismo C>T do gene *MTHFR*. A)genótipo CC. B)genótipo CT. C)genótipo TT

60

CAPÍTULO II

Figura 1 – Padrão eletroforético de miRNA124a3 em meningioma

73

CAPÍTULO III

Figura 1 – Eletroferograma mostrando a ausência de metilação nos sítios CpG (destacados na figura) analisados na região promotora do gene *CDKN2B* em pacientes com meningioma

86

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Elementos regulatórios do ciclo celular em neoplasias humanas. 32

Tabela 2. miRNAs hipermetilados em cânceres humanos e suas consequências funcionais (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012) 41

CAPÍTULO I.

Tabela 1 – Riscos do meningioma associado com o polimorfismo *MTHFR* C677T 61

Tabela 2 – Associação entre os genótipos do gene *MTHFR* e características histopatológicas dos pacientes 62

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Associação entre o padrão de metiação de miRNA 124a2 e características histopatológicas dos pacientes 72

Tabela 2 - Associação entre o padrão de metiação de miRNA 124^{a3} e características histopatológicas dos pacientes 74

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Porcentagem de sítios CpG não metilados e metilados em duas amostras de meningioma 85

RESUMO

Os meningiomas são os tumores intracranianos mais frequentes, originando-se das meninges que revestem o cérebro e cordão espinhal. Apesar de terem sido um dos primeiros neoplasmas sólidos estudados citogeneticamente, ainda são escassos os estudos genéticos e epigenéticos nesses tumores. O presente trabalho teve como objetivo investigar alterações genéticas e epigenéticas que pudessem contribuir na iniciação e progressão tumoral em meningiomas na população paraense. Essa tese está subdividida em três capítulos. No Capítulo I foi investigada a associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e meningioma em 23 pacientes da população paraense, utilizando 96 indivíduos sem histórico de lesões pré-neoplásicas como grupo controle. Essa associação não foi encontrada, apesar de sugerir um aumento não estatisticamente significativo no risco de desenvolver meningioma em portadores do genótipo TT quando comparados ao genótipo CC. No Capítulo II foi avaliado o padrão de metilação em duas famílias do microRNA124 em meningiomas na população paraense. Hipermetilação na região promotora de miRN124a2 e miRNA124a3 parece ser um evento frequente, uma vez que foi encontrada em 73,9% e 69,56% das amostras analisadas, respectivamente. No Capítulo III, foi analisado o padrão de metilação dos genes *APC*, *BRCA1*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *ESR1*, *FHIT*, *GSTP1*, *MGMT*, *MLH1*, *NEUROG1*, *PDLIM4*, *PTEN*, *RARB*, *RASSF1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73*, *VHL* e *WIF1* em um meningioma de grau I e um de grau II através de uma placa comercial desenvolvida através da tecnologia MethylScreen. O padrão de metilação do gene *CDKN2B* também foi analisado na amostra coletada em 25 pacientes com meningioma através da conversão por bissulfito, PCR e sequenciamento direto. O gene *RASSF1A* apresentou-se metilado em 16,73% e 63,66% dos sítios CpGs analisados na amostra de meningioma de grau I e grau II, respectivamente. O gene *RUNX3* se apresentou metilado apenas na amostra de grau II em 52,88% dos sítios CpG analisados. Nossos resultados apontam a importância das alterações epigenéticas na tumorigênese e progressão tumoral em meningiomas.

Palavras-chave: meningioma, polimorfismo, *MTHFR*, metilação, miRNA124a2, miRNA124a3, *RUNX3*, *RASSF1A*.

ABSTRACT

Meningiomas are the most common intracranial tumors that originate from the meninges surrounding the brain and spinal cord. Despite meningiomas were among the first solid neoplasms to be studied cytogenetically, little is known about their genetic and epigenetic profile. This study aimed to investigate genetic and epigenetic alterations that could contribute to tumor initiation and progression in meningiomas in the population of Pará, Brazil. This thesis is subdivided into three chapters. In Chapter I we investigated the association between the *MTHFR* C677T and meningioma in 23 patients in the population of Pará. A total of 96 healthy individuals with no previous pre-neoplastic lesions were selected for the control group. This association was not found. Although not statistically significant, our observation suggests that the TT genotype increases the risk of developing meningioma when compared to CC genotype. In Chapter II we evaluated the methylation pattern in two members of microRNA124 family in meningiomas in the population of Pará. Hypermethylation of the promoter region of miRN124a2 and miRNA124a3 appears to be a frequent event, as was found in 73.9% and 69.56% of the samples, respectively. In Chapter III, we analyzed the methylation pattern of the *APC*, *BRCA1*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *ESR1*, *FHIT*, *GSTP1*, *MGMT*, *MLH1*, *NEUROG1*, *PDLIM4*, *PTEN*, *Rb*, *RASSF1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73*, *VHL* and *WIF1* genes in a grade I and in a grade II meningiomas through an assay developed by MethylScreen. Pattern of methylation of *CDKN2B* was also analyzed in 25 patients with meningioma through bisulfite conversion, PCR and direct sequencing. *RASSF1A* was methylated in 16.73% and 63.66% of the CpG sites analyzed in the grade I and grade II meningioma, respectively. *RUNX3* is methylated only in grade II meningioma in 52.88% of the CpG sites analyzed. Our results point to the importance of epigenetic changes in tumorigenesis and tumor progression in meningiomas.

Key words: meningioma, polymorphism, *MTHFR*, methylation, miRNA124a2, miRNA124a3, *RUNX3*, *RASSF1A*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde sua descoberta, o câncer tem sido definido de muitas maneiras, começando por Hipócrates ao observar os grossos vasos sanguíneos que alimentavam os tumores e o remetia a patas de caranguejos, utilizando esse termo para identificá-los. A partir dos estudos de Laennec em melanomas em 1804, o termo câncer tem sido utilizado por patologistas para descrever células com aparência inapropriada obtidas em diferentes estágios. A partir do século XX, baseado nos estudos de Boveri publicados em 1929, o modelo genético do câncer predominou, baseado em suas teorias do papel das anormalidades cromossômicas na tumorigênese (FEINBERG *et al.*, 2006). Na era moderna, considerando as várias alterações moleculares que ocorrem nos diferentes tumores, o termo câncer refere-se a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum um crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011).

O câncer apresenta-se como um problema de saúde pública mundial, sendo a maior causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda em países em desenvolvimento. Estimativas mundiais apontaram 12,7 milhões de casos e 7,6 milhões de mortes causadas por câncer em 2008, sendo 56% dos casos e 64% das mortes ocorrendo em países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2011; UMAR *et al.*, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) espera 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas convivendo com câncer no ano de 2030 (INCA, 2011).

No Brasil, seguindo a tendência mundial, doenças infecciosas e parasitárias têm deixado de ser a principal causa de morte desde os anos 60, sendo substituídas pelas doenças do sistema circulatório e neoplasias, como resultado do envelhecimento da população, reflexo do processo de urbanização e melhorias da saúde pública (INCA, 2011; JEMAL *et al.*, 2011). Em 2012, eram esperados aproximadamente 518.510 novos casos no Brasil, sendo 257.870 no sexo masculino e 260.640 no sexo feminino. Desses, 9.670 novos casos eram esperados no Pará, sendo 3.500 em Belém (INCA, 2011).

Dados do *National Cancer Institute* mostram que as mortes por câncer de pulmão, cólon, mama, próstata e estômago têm diminuído cerca de 1% ao ano. Apesar disso, a sobrevida do paciente com câncer pouco mudou. A cada ano, cerca de 400 mil

americanos morrem de neoplasias diversas. No Brasil, o Ministério da Saúde registrou 114 óbitos por câncer para cada 100 mil habitantes em 1999 (WARD, 2002).

1.2 BASE GENÉTICA DO CÂNCER

De um modo geral, o câncer é uma doença genética, uma vez que o fenótipo tumoral maligno resulta de alterações genéticas ou epigenéticas em uma célula, que podem conferir vantagens seletivas que serão transmitidas para suas células-filhas. O resultado é a geração de uma população clonal com crescimento aberrante e potencial metastático (CAHILL *et al.*, 1999; GREAVES & MALEY, 2012; MALUMBRES & CARNERO, 2003). Desde a publicação dos estudos de Nowell em 1976, o câncer tem sido validado como um complexo sistema evolucionário darwiniano, onde clones evoluem a partir de interações de lesões seletivamente vantajosas, seletivamente neutras e lesões deletérias (GREAVES & MALEY, 2012).

As primeiras evidências de uma base genética do câncer sugeriram com as observações de Hansemann em 1890 e as de Boveri em 1902, que em estudos independentes, sugeriram que os números anormais de cromossomos em mitoses multipolares fossem a causa da formação tumoral. No entanto, evidência de um gene ou genes específicos relacionados com a carcinogênese só foi possível após o descobrimento do vírus do sarcoma de Rous em 1911, seguido pela descoberta do seu homólogo celular, *src*, uma tirosinoquinase com atividade oncogênica, 60 anos depois. Em 1987, o gene do retinoblastoma, identificado na região cromossômica 13q14, foi o primeiro gene supressor de tumor a ser descoberto. Desde então, muitos genes alterados na carcinogênese têm sido identificados (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Ainda não está claro quantas vias regulatórias diferentes devem estar alteradas para gerar células tumorais e se essas vias são semelhantes nos diferentes tipos de câncer. Alguns estudos, entretanto, sugerem que todos os fenótipos tumorais envolvem, pelo menos, dez propriedades essenciais (Figura 1) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A propriedade mais fundamental das células tumorais é a capacidade de sustentar uma proliferação crônica. Tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais de crescimento que permitem a entrada e progressão no ciclo de divisão e crescimento celular, mantendo a homeostase do número de células, a manutenção da arquitetura e função dos tecidos. As células tumorais, por outro lado, tem a capacidade de sustentar uma manutenção de sinalização proliferativa. Esses sinais são conferidos, em sua maior

parte, pelos fatores de crescimento que se ligam aos receptores na superfície celular contendo domínios tirosinoquinases que emitem sinais que regulam a progressão do ciclo, bem como o crescimento celular (HANAHAN & WEINBERG, 2000, 2011). Além de fatores de crescimento, alguns hormônios e citocinas estão relacionados com a autossuficiência em sinais de crescimento. Mitógenos epiteliais, como o fator de crescimento do hepatócito (HGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator derivado do estroma (SDF) e a interleucina-6 (IL-6), são encontrados altamente expressos em diferentes tipos de tumor (HANAHAN & COUSSENS, 2012; PIETRAS & ÖSTMAN, 2010).

Para manter sua capacidade proliferativa e permitir seu crescimento, as células neoplásicas desenvolvem resistência aos programas de morte celular. Células tumorais possuem múltiplos mecanismos que limitam ou contornam a apoptose. A mais comum é

Figura 1. Propriedades básicas adquiridas pelas células tumorais



Fonte: HANAHAN & WEINBERG (2011)

a perda de função do *TP53*, um importante sensor de danos do DNA presente no circuito que induz a apoptose, observado em mais de 50% dos cânceres humanos. Outra forma de evadir a apoptose é aumentar a expressão de reguladores apoptóticos (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*) ou de sinais de sobrevivência (*Igf1/2*), regulando negativamente fatores pro-apoptóticos (*Bax*, *Bim*, *Puma*). Autofagia e necrose são mais duas barreiras que precisam ser ultrapassadas durante o desenvolvimento tumoral (HANAHAN & COUSSENS, 2012; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Para gerar tumores macroscópicos, as células tumorais necessitam possuir um potencial replicativo ilimitado, diferentemente da maioria das células normais que passa por um número limitado de sucessivos ciclos celulares e de crescimento. Evidências indicam que a manutenção dos telômeros protegendo as extremidades dos cromossomos está envolvida na capacidade de proliferação ilimitada. A telomerase, DNA polimerase responsável por adicionar nucleotídeos nas extremidades do DNA telomérico está praticamente ausente nas células não imortalizadas, mas presente em níveis altamente significantes nas células imortalizadas, incluindo as células cancerosas humanas. Isso indica um potencial replicativo ilimitado importante na progressão tumoral, essencial para o seu estado de crescimento maligno (HANAHAN & COUSSENS, 2012; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Para fornecimento de nutrientes e oxigênio, bem como o descarte de metabólitos e dióxido de carbono, as células tumorais necessitam possuir a habilidade de formar novos vasos sanguíneos. Nesse processo chamado de angiogênese, alguns fatores pró-angiogênicos, como VEGF, FGF, SDF e TSP-1, parecem estar relacionados com a sinalização e estimulação da formação de novos vasos em tumores (HANAHAN & WEINBERG, 2000, 2011; PIETRAS & ÖSTMAN, 2010).

As propriedades de invasão e metástase são outras capacidades adquiridas pelas células cancerosas, que representam um passo importante na tumorigênese. Esse processo é resultado de uma sucessão de alterações biológicas e de secreção de fatores como TGF- β e HGF, passando pelas etapas de: invasão local, seguida por invasão nos vasos sanguíneos e linfáticos; entrada nos sistemas linfáticos e hematogênicos; saída do lumina desses vasos para o parênquima de tecidos distantes; formação de pequenos nódulos (micrometástase) e, finalmente, crescimento dessas lesões em tumores macroscópicos (HANAHAN & WEINBERG, 2011; PIETRAS & ÖSTMAN, 2010).

A instabilidade genômica é inerente à maioria das células cancerosas humanas. Defeitos na manutenção genômica e no reparo são vantagens seletivas importantes na progressão tumoral. Pelo menos uma forma de instabilidade genômica em tumores humanos está associada com defeitos na via de reparo de DNA. Esse sistema de reparo normalmente mantém uma baixa taxa de mutação espontânea. A perda do sistema de reparo está associada com alguns cânceres familiares, ocorrendo nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral e conferindo um fenótipo mutante, o qual acelera o acúmulo de mutações em genes relacionados à tumorigênese durante a vida do indivíduo, levando à malignidade. A perda do DNA telomérico em muitos tumores também gera uma instabilidade cariotípica associada com ampliações e perdas de segmentos cromossômicos (BECKMAN & LOEB, 2005; HANAHAN & WEINBERG, 2011; KARRAN, 1996; PIETRAS & ÖSTMAN, 2010; SIEBER *et al.*, 2005; WARD, 2002).

Muitos tumores são densamente infiltrados por células do sistema imune, refletindo as condições inflamatórias que surgem nos tecidos. Inflamação pode fornecer moléculas bioativas para o microambiente tumoral, incluindo: fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa (EGF); fatores de sobrevivência que limitam a morte celular; fatores pro-angiogênicos (VEGF e FGF2) que são enzimas que modificam a matriz extracelular (MMP-9), facilitando a angiogênese, a invasão e a metástase; e espécies reativas de oxigênio que são altamente mutagênicas para as células vizinhas (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

As células cancerosas reprogramam seu metabolismo energético para dar suporte à proliferação celular crônica e descontrolada. Mesmo na presença de oxigênio, o seu metabolismo energético é praticamente limitado à glicólise, levando a um estado chamado glicólise aeróbica. Para compensar a baixa produção de ATP, comparada à fosforilação oxidativa mitocondrial, elas regulam positivamente transportadores de glicose, como o GLUT1, aumentando o transporte de glicose para o citoplasma (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Uma importante capacidade que as células cancerosas possuem é a de evadir a destruição imune, desabilitando componentes do sistema imunológico liberados para destruí-las. Por exemplo, as células cancerosas podem paralisar células NK e CTLs secretando TGF- β e outros fatores imunossupressores. Outros mecanismos operam para o recrutamento de células inflamatórias que são imunossupressoras ativas, incluindo células T regulatórias e células supressoras derivadas do mieloide (MDSCs). Ambas têm a

capacidade de suprimir ações dos linfócitos citotóxicos (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

1.2.1 Ciclo celular e câncer

As evidências apontam o câncer como uma doença do ciclo celular, uma vez que a grande maioria dos tumores apresenta defeitos que comprometem a maquinaria do ciclo, levando a um aumento da sua taxa proliferativa. Esses defeitos podem atingir tanto os componentes do seu ciclo ou elementos de suas cascatas de sinalização (MALUMBRES & CARNERO, 2003).

O ciclo celular é composto de uma sequência ordenada de fases. A célula diferenciada se encontra em G_0 , onde ela atingiu sua diferenciação terminal e está quiescente. Se a célula está destinada a proliferar, ela entra em G_1 , período em que aumenta de tamanho e prepara as proteínas necessárias para a síntese de DNA. Durante esta fase, a célula é sensível às condições ambientais (controle externo). Se elas não forem favoráveis, a divisão celular para em G_1 . No entanto, se ultrapassar o ponto de restrição (ponto R), a divisão celular ocorrerá independente das condições ambientais. Na fase S, sintetiza-se o DNA. No início de G_2 existe outro ponto de controle importante, onde será verificada a qualidade do material replicado. Finalmente, na fase mitótica (fase M), o DNA duplicado será equitativamente dividido entre duas células filhas. A mitose será interrompida se, na checagem da mitose, forem detectadas anormalidades na divisão dos cromossomos (WARD, 2002).

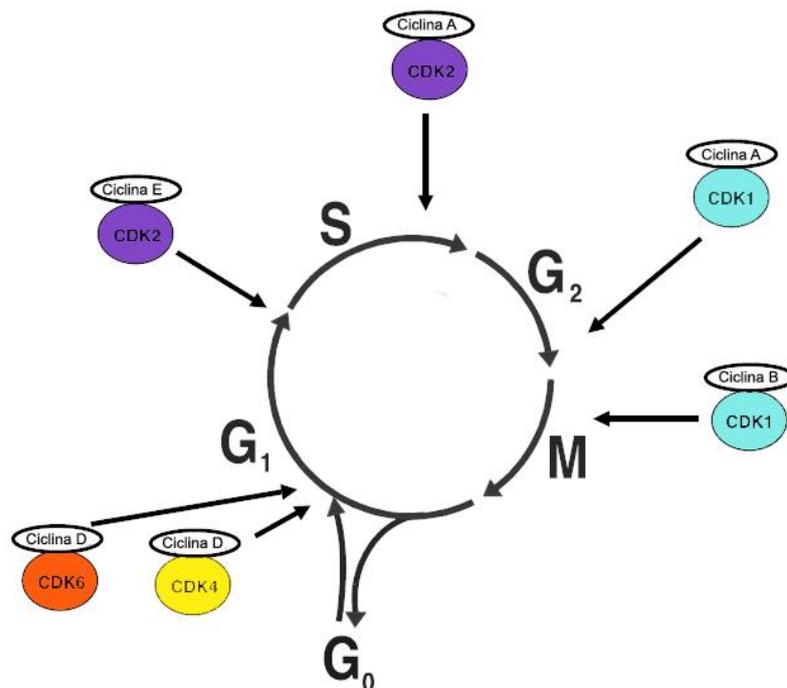
A maioria dos componentes do ciclo celular, apontados como marcadores de aberrações tumorigênicas, controla direta ou indiretamente a progressão para G_1 e a transição G_1/S . Mais precisamente, essas moléculas regulam os eventos ao redor do ponto R. Essa progressão pelo ciclo celular é, em parte, controlada por uma série de proteínas chamadas “quinases dependentes de ciclinas” (CDKs) e seus substratos, particularmente nas transições de fases, tanto de G_1 para S quanto de G_2 para M (VERMEULEN *et al.*, 2003) (Figura 2). Os níveis de ciclinas oscilam durante as fases do ciclo, determinando o momento apropriado de sua ligação com CDKs, que fosforilam uma série de substratos chave que permitirão a progressão de uma fase à outra do ciclo celular. Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras de tal progressão no ciclo de divisão celular: os inibidores de CDKs

(CDKs) (PAULOVICH, *et al.*, 1997). Alguns elementos regulatórios do ciclo celular envolvidos em neoplasias humanas podem ser observados na Tabela 1.

1.2.2 Oncogenes

Os proto-oncogenes compreendem um grupo diverso de genes, cujos produtos têm papéis importantes na regulação bioquímica da célula, como, por exemplo, a sua divisão. Consequentemente, uma mutação em um destes pode perturbar o balanço químico interno e induzir a um estado canceroso (TAHARA, 2004).

Figura 2. Ciclo celular e pontos de checagem. Durante o ciclo celular, células progridem da fase G₁ para a fase S, onde ocorre a replicação de DNA. Células com o dobro de conteúdo de DNA passam da fase G₂ para a fase M, onde ocorre a segregação cromossômica, seguida de divisão celular (citocinese). Células quiescentes (em G₀) podem entrar no ciclo sob estímulo de mitógeno. Pontos de checagem impedem a progressão no ciclo celular se o processo não foi completado de forma satisfatória ou se existe dano no DNA. Pontos no início da fase G₁ impedem que a célula entre em ciclo celular se as condições do meio não estiverem favoráveis à divisão. Na transição G₁/S, é checada a integridade do material genético. O ponto de checagem em S previne que a célula sofra divisão sem que a sua replicação esteja completa. O ponto de checagem na transição G₂/M, impede que a segregação cromossômica ocorra caso todas as cromátides não estejam ligadas ao fuso



Fonte: VERMEULEN *et al.* (2003)

Tabela 1. Elementos regulatórios do ciclo celular em neoplasias humanas. Modificado de PAULOVICH *et al.* (1997).

Molécula	Alteração	Tumor Representativo
<i>CDK4</i>	Amplificação, mutação	Sarcomas, melanoma
<i>CDK6</i>	Translocação, superexpressão	Leucemia/linfoma, gliomas, melanoma
<i>CDK2</i>	Amplificação	Carcinoma hepatocelular
<i>CCND1</i>	Amplificação, translocação, superexpressão	Câncer prostático e de mama, adenoma da paratireóide, carcinoma gástrico e esofágico, mieloma múltiplo
<i>CCND2</i>	Superexpressão	Tumores da linhagem germinativa
<i>CCND3</i>	Superexpressão	Carcinoma de mama, linfoma, leucemia
<i>CCNE1</i>	Superexpressão	Carcinomas de mama, de ovário e gástrico
<i>CCNA1</i>	Superexpressão	Carcinoma hepatocelular
<i>CDKN2A</i>	Deleção, mutação, metilação	Melanoma, linfoma/leucemia, câncer de pulmão, carcinoma pancreático
<i>CDKN2B</i>	Deleção, metilação	Leucemia/linfoma
<i>SSSCA1</i>	Níveis reduzidos/ degradação de proteínas	Tumores de cólon, mama, próstata e outros
<i>CDKN1C</i>	Mutação	Síndrome de Beekwith-Wiedemann
<i>CDC25A</i>	Superexpressão	Câncer de cabeça e pescoço, tumores de pulmão
<i>CDC25B</i>	Superexpressão	Câncer de mama, linfomas, câncer de cabeça e pescoço, tumores de pulmão
<i>RB1</i>	Deleção, mutação, metilação	Retinoblastoma, melanoma, carcinoma esofágico, carcinoma de cabeça e pescoço
<i>RBL2</i>	Deleção, mutação	Tumores de mama, cabeça e pescoço e melanoma
<i>PLK1</i>	Superexpressão, mutação	Tumores pulmonares, melanoma, carcinoma esofágico e de cabeça e pescoço
<i>AURKA & AURKB</i>	Superexpressão	Câncer de mama, gástrico e coloretal
<i>CABLES1</i>	Deleção	Tumores de cólon e cabeça e pescoço

As mutações em proto-oncogenes estão relacionadas a ganho de função, estimulando a proliferação celular. Os oncogenes agem de uma maneira dominante, uma vez que um evento único de mutação em um gene crítico pode ter um efeito dominante. (MALUMBRES & CARNERO, 2003). A ativação de um oncogene pode ocorrer por translocação cromossômica, microdeleções, amplificação gênica, inserção retroviral ou

mutação pontual. Raramente, essas mutações são herdadas da linhagem germinativa. Apenas um caso conhecido está relacionado com essa forma de herança, o gene *RET*, implicado na neoplasia endócrina múltipla e no câncer familiar da tireóide. A grande maioria ocorre como resultado de eventos somáticos (TAHARA, 2004; WARD, 2002).

O primeiro a ser descrito e um dos mais importantes exemplos de proto-oncogene é o gene *HRAS*, cujo produto é uma GTPase monomérica que auxilia na transmissão de sinais provenientes de fatores de crescimento existentes na superfície da célula. Quando mutado, a proteína resultante é mantida em um modo ativo de sinalização, levando a uma divisão celular descontrolada (MALUMBRES & CARNERO, 2003).

Outros exemplos importantes de proto-oncogenes são o *MYC*, *HRAS2*, *MST1R*, *FGFR2*, *ERBB2*, *PDGFA* e *CDK4* (PONDER, 2001; TAHARA, 2004).

1.2.3 Genes Supressores de Tumor

Os genes supressores tumorais são elementos genéticos cuja perda ou inativação permite à célula apresentar algum fenótipo neoplásico. Esses genes estão normalmente envolvidos na contenção da proliferação celular (FEARON & DANG, 1999; MALUMBRES & CARNERO, 2003; WEINBERG, 1991).

Como essa classe de genes está relacionada com perda de função, ela necessita de dois eventos mutacionais, um em cada um de seus alelos. Essa teoria dos dois eventos foi desenvolvida por Alfred Knudson em 1971, quando propôs uma explicação para ocorrência do retinoblastoma, um câncer de retina raro que atinge aproximadamente cinco em cada 100.000 crianças. A análise do heredograma indica que cerca de 40% dos casos envolvem uma mutação herdada que predispõe o indivíduo ao câncer. Os outros 60% dos casos não possuem uma relação com uma mutação herdada específica, considerados casos esporádicos. Nos casos herdados, existe uma predisposição ao retinoblastoma, uma vez que uma das mutações inativadoras do gene *RBI* é transmitida pela linhagem germinativa. Mas para o desenvolvimento da doença, outra mutação deve ocorrer durante o desenvolvimento somático do olho. Nos casos esporádicos, ambas as cópias do gene *RBI* devem ser inativadas durante o desenvolvimento do olho (MACLEOD, 2000; MALUMBRES & CARNERO, 2003).

Outras neoplasias como neurofibromatose, tumor de Wilms, síndrome de Bloom e câncer colorretal não-polipóide hereditário (HNPCC), estão relacionadas com a inativação de genes supressores de tumor (ASHTON *et al.*, 2005; PONDER, 2001).

Além do gene *RBI*, que tem um papel importante na regulação do ciclo celular, outros genes supressores tumorais críticos no câncer incluem o *TP53*, *APC*, *CDHI*, *BRCA1* e *BRCA2* (CÉSAR *et al.*, 2002; TAMURA, 2002).

1.3 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido por Conrad Waddington em 1939 para descrever as interações causais entre os genes com seus produtos e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo. Epigenética foi depois descrita como alterações reversíveis na expressão gênica, que não correspondem a alterações na sequência de DNA. Essas alterações podem ser transmitidas para as células filhas através de divisões mitóticas e meióticas (EGGER *et al.*, 2004; ESTELLER, 2008; ESTELLER & HERMAN, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2012; FEINBERG & TYCKO, 2004; JONES & BAYLIN, 2007; MURREL *et al.*, 2005).

Apesar de a estrutura do DNA codificar toda a informação necessária para o estabelecimento de um organismo, fenômenos epigenéticos podem contribuir para estabilidade da estrutura da cromatina, integridade do genoma, modulação da expressão de genes tecido-específicos, desenvolvimento embrionário, coordenação da replicação, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X em fêmeas (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009; TUREK-PLEWA & JAGODZINSKI, 2005).

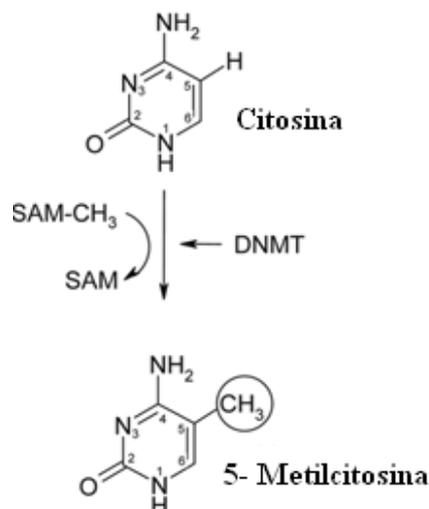
Modificações epigenéticas numa célula normal compreendem três tipos de mecanismos: metilação de DNA, modificações na cromatina e silenciamento associado a RNA (EGGER *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2012; HASSLER & EGGER, 2012; HUIDOBRO *et al.*, 2012; SANDOVAL & ESTELLER, 2012).

A metilação do DNA é uma modificação que ocorre comumente como resultado da atividade de uma família enzimática chamada DNA-metiltransferases (DNMT) que catalisa a adição de um grupamento metil, doado pela S-adenosil metionina (SAM), ao quinto carbono de citosina com a sequência dinucleotídica palindrômica 5'-CpG-3' (Figura 3) (FERNANDEZ *et al.*, 2012; HUIDOBRO *et al.*, 2012; ZHU & YAO, 2007). As ilhas CpGs, como são normalmente chamadas, são sequências de pelo menos 500pb com conteúdo G + C maior que 55%, localizadas em elementos repetitivos, incluindo centrômeros, sequências de microssatélites e região promotora de aproximadamente 40% dos genes de mamíferos (EGGER *et al.*, 2004; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Essa modificação no carbono 5 da citosina (5mC) é encontrada em aproximadamente 70 a

90% das ilhas CpGs nas células somáticas de mamíferos. Geralmente, metilação das regiões promotoras está correlacionada inversamente com expressão gênica. Se fatores de transcrição específicos estiverem disponíveis e as ilhas CpGs se encontrarem em estado não metilado, resultando em uma configuração aberta da cromatina, a transcrição desse determinado gene irá ocorrer. Normalmente, as ilhas CpGs encontram-se protegidas da metilação, mas são aberrantemente metiladas quando relacionadas ao envelhecimento ou ao câncer (BROWN & STRATHDEE, 2002; ESTELLER & HERMAN, 2002; HASSLER & EGGER, 2012; HUIDOBRO *et al.*, 2012; ZHU & YAO, 2007).

Pelo menos três DNMTs estão envolvidas nesse processo: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. Inicialmente, DNMT1 era descrita como uma metiltransferase de manutenção, responsável por manter o padrão de metilação nas novas fitas de DNA formadas durante a replicação, e as DNMT3A e DNMT3B eram descritas como metiltransferases *de novo*, introduzindo o radical metil em sítios nunca antes metilados. Recentes estudos, por outro lado, sugerem que todas elas trabalham de forma cooperada e são responsáveis por metilações tanto de manutenção quanto *de novo* (HUIDOBRO *et al.*, 2012).

Figura 3. Metilação da citosina.



Fonte: Zhu & Yao (2007). SAM = S-adenosil metionina; DNMT = DNA-metiltransferases

Padrões epigenéticos também controlam modificações histônicas, regulando genes que devem ser expressos em células específicas em tempo preciso. As células administram a expressão dos genes através do empacotamento do DNA ao redor de cada octâmero de histona que forma os nucleossomos organizados na cromatina (RODENHISER & MANN, 2006). Esse octâmero compreende duas cópias das proteínas altamente conservadas H2A, H2B, H3 e H4. As quatro histonas possuem uma cauda amino-terminal ricas em lisina e contêm cerca de metade dos resíduos carregados positivamente que compõem a cadeia polipeptídica. Essas caudas amino-terminais se estendem para fora do nucleossomo e são passíveis de modificações pós-transcricionais (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Existem pelo menos oito modificações histônicas conhecidas: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP, desaminação e isomerização de prolina (HUIDOBRO *et al.*, 2012). As histonas podem ser modificadas simultaneamente em diferentes resíduos com múltiplas modificações simultâneas e as combinações dessas modificações são denominadas “código de histonas”. Modificações histônicas estão associadas fortemente com mudanças na estrutura da cromatina e, conseqüentemente, com a expressão gênica de forma que os genes são inativados quando a cromatina se encontra condensada e são expressos quando a cromatina está aberta (LAIRD, 2005; RODENHISER & MANN, 2006). Essas modificações são geradas e mantidas por enzimas especializadas que fazem parte dos complexos de remodelamento da cromatina, como os complexos do grupo *Polycomb* (PcG), responsável pela tri-metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4m3), e do grupo *Trithorax* (TrxG), responsável pela tri-metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27m3). Acetilação e metilação são as modificações histônicas mais estudadas. Acetilação das histonas, catalisada pelas histonas acetiltransferases (HATs), geralmente está associada com ativação da transcrição gênica. A metilação, catalisada pelas histonas metiltransferases (HMTs) por outro lado, pode estar associada com ativação (por exemplo, H3K4, H3K36 e H3K79) ou repressão gênica (H3K9, H3K27 e H4K20) (HASSLER & EGGER, 2012; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que os RNAs não-codificantes (ncRNAs) são importantes moduladores da cromatina e da expressão gênica. Os ncRNAs mais estudados são os microRNAs (miRNAs), pequenos fragmentos de RNA não codificantes de tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos, envolvidos no silenciamento

gênico pós-traducional por controlar a tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs) em proteínas tanto em plantas quanto em animais (GEORGE & MITTAL, 2010; KIM, 2005; LEE & DUTTA, 2009; SUZUKI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Considerando que um único miRNA pode se ligar a mais de duzentos diferentes transcritos alvo, estima-se que os miRNAs são capazes de regular mais de 30% dos genes humanos, participando assim da regulação de todos os processos celulares, destacando seu potencial para manipulação biotecnológica (WANG *et al.*, 2013; ZIMMERMAN & WU, 2011).

Os miRNAs regulam negativamente seus genes de duas maneiras, dependendo do grau de complementaridade entre eles e os mRNAs alvo. Quando se ligam perfeitamente ou quase perfeitamente ao alvo, os miRNAs induzem a via do RNA de interferência (iRNA), na qual os transcritos de mRNA são clivados por um complexo de silenciamento induzido por um RNA associado a um miRNA (miRISC). Esse mecanismo é encontrado principalmente em plantas. Na maioria dos animais, os miRNAs possuem uma complementaridade imperfeita com os mRNAs alvo, ocorrendo a inibição da iniciação da tradução no complexo miRISC (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012; SUZUKI *et al.*, 2012).

1.3.1 Epigenética e câncer

A primeira anormalidade epigenética relacionada ao câncer foi descrita em 1983 por Andrew Feinberg e Bert Vogelstein que observaram uma redução global da metilação em células de câncer de cólon quando comparada com seu tecido normal (FEINBERG & TYCKO, 2004). Uma célula maligna pode ter de 20 a 60% menos 5-metilcitosina genômica do que uma célula normal (ESTELLER & HERMAN, 2002). A hipometilação do DNA tem implicações importantes para a célula. Primeiramente, pode levar a ativação de alguns oncogenes. Alguns tecidos somáticos possuem suas ilhas CpGs normalmente metiladas. Essas ilhas se encontram hipometiladas em câncer e genes próximos a elas podem ser ativados. A hipometilação também está associada com instabilidade cromossômica, sendo encontrada em sequências satélites pericentroméricas, o que pode levar à predisposição a quebras e recombinação nessas sequências. Vários cânceres, como tumor de Wilms e carcinomas de mama e ovário, frequentemente apresentam translocações cromossômicas não balanceadas com pontos de quebra no DNA pericentromérico dos cromossomos 1 e 16 (FEINBERG & TYCKO, 2004; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). Hipometilação também pode reativar DNA parasitário

intragenômico. Perda de metilação tem sido observada em repetições L1 e Alu em células cancerosas, permitindo que esses e outros elementos de transposição possam ser transcritos e mover para outras regiões genômicas, onde podem lesionar genes celulares normais. Por último, perda da metilação pode afetar genes imprintados. O caso melhor estudado afeta o locus H19/IGF-2 no cromossomo 11p15, onde a hipometilação pode aumentar a expressão do fator de crescimento anti-apoptótico (IGF-2) e perda do RNA de supressão da transformação (H19) em certos tumores infantis (ESTELLER & HERMAN, 2002).

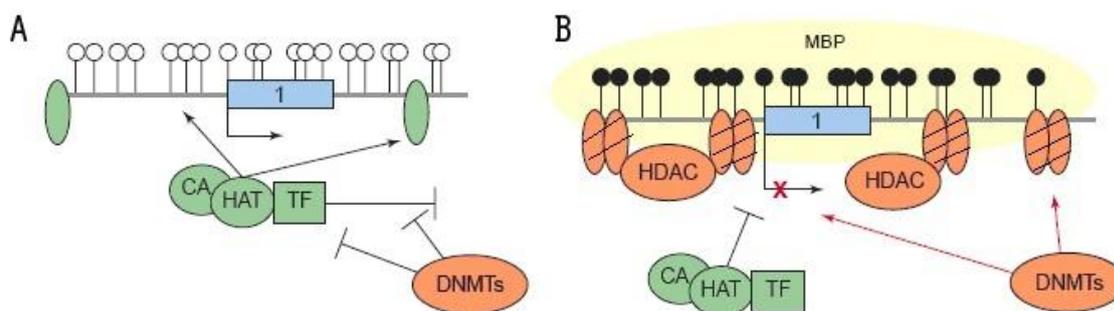
A hipermetilação também é muito bem estudada em câncer. Metilação aberrante tem sido associada com perda de função de genes, o que pode levar a vantagens seletivas para células neoplásicas. Hipermetilação no DNA recruta proteínas de ligação ao DNA metilado, e subsequentemente histonas desacetilases (HDAC). A desacetilação das histonas leva a uma reorganização da cromatina numa estrutura mais fechada, impedindo o acesso de fatores de transcrição à região promotora. Como resultado, muitas vezes, ocorre uma repressão transcricional (Figura 4) (BAYLIN & HERMAN, 2000; JONES & BAYLIN, 2002).

A primeira evidência de hipermetilação e perda de expressão foi relatada por Steve Baylin e Barry Nelkin em 1986 no gene da calcitonina. Mas a primeira hipermetilação num gene supressor tumoral relatada foi na região promotora do gene *RBI* (FEINBERG & TYCKO, 2004). Existem evidências de que a metilação do DNA pode ser um mecanismo pelo qual a função de genes supressores de tumor fica desregulada, predispondo à perda de função do segundo alelo protetor, como Knudson preconizou em sua teoria. Repressão da transcrição mediada por hipermetilação em diversos genes supressores tumorais, como *CDKN2A*, *MLH1*, *VHL*, *CDH1* e *BRCA1*, é um evento epigenético bem conhecido atualmente (ESTELLER & HERMAN, 2002; FEINBERG & TYCKO, 2004; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009; WARD, 2002).

O estudo da metilação na carcinogênese pode ter um grande potencial clínico. Primeiro, seu padrão pode ser utilizado como marcador tumoral, uma vez que mudanças no promotor potencialmente fornecem um sinal positivo para células cancerosas que podem ser reconhecidas por procedimentos avançados baseados na técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Tal padrão pode ser utilizado tanto para determinar o prognóstico do paciente como resposta à terapia. Segundo, existe a possibilidade de reativar genes silenciados epigeneticamente para benefícios terapêuticos. Alguns agentes

desmetilantes, como a 5-azacitidina e seus derivados, 5-fluoro-2'-deoxicitidina e zebularina, atuam como potentes inibidores da metilação do DNA, podendo reverter metilação tecido específica e re-expressar genes supressores tumorais (JONES & BAYLIN, 2007).

Figura 4. Efeito da metilação na transcrição. A) Representação de uma célula normal, com uma região promotora não-metilada (círculos brancos). A constituição da cromatina está transcricionalmente favorável, e caracterizada por nucleossomos espaçados e não compactados com histonas acetiladas (elipses lisas), permitindo o acesso de co-ativadores (CA), histonas acetilases (HAT) e fatores de transcrição (TF), mas não interagem com as DNA metil-transferases (DNMTs). B) Representação de uma célula cancerosa, metilada de forma aberrante (círculos pretos), apresentando nucleossomos compactados com histonas desacetiladas (elipse tracejada). O gene encontra-se reprimido transcricionalmente, pela interação com as DNMTs e o não acesso ao complexo transcricional



Fonte: BAYLIN & HERMAN (2000). CA = co-ativadores; HAT = histonas acetilases; TF = fatores de transcrição; DNMTs = DNA metil-transferases (DNMTs); HDAC = histonas desacetilases.

O papel do RNA na regulação pós-transcricional em diferentes doenças tem atraído muito interesse. Muitos estudos têm fornecido evidências de que expressão desregulada em miRNAs contribuem para a iniciação e progressão da carcinogênese (EGGER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2013). O primeiro estudo associando os miRNAs com o câncer foi publicado há mais de uma década, quando Calin *et al.* (2002) demonstraram que a região cromossômica 13q14, frequentemente deletada em leucemia linfocítica crônica, contém os *loci* gênicos dos miRNAs miR-15 e miR-16 e que os níveis de expressão desses miRNAs estão inversamente correlacionados com os níveis proteicos de seu alvo, BCL-2. Três anos depois, um estudo envolvendo um painel de 200 tumores

humanos analisou dados de expressão de 217 miRNAs, sendo mais eficiente do que quando comparado com o padrão de expressão de 16.000 mRNAs na classificação de malignidade, agressividade e de diferentes tipos histológicos de tumores (LU *et al.*, 2005).

Alterações no padrão de expressão de miRNAs têm sido associados com várias doenças, especialmente o câncer. A superexpressão e silenciamento de miRNAs específicos e seus alvos têm sido descritos em diferentes tipos de tumor (Tabela 2) (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012; WANG *et al.*, 2013; ZIMMERMAN & WU, 2011). miRNAs super expressos podem atuar como oncogenes, reprimindo genes supressores tumorais ou genes que controlam a diferenciação celular ou apoptose. Por outro lado, genes reprimidos atuam como genes supressores tumorais, regulando negativamente oncogenes e genes que controlam a diferenciação celular ou apoptose (Figura 5) (GEORGE & MITTAL, 2010; SUZUKI *et al.*, 2012; ZIMMERMAN & WU, 2011).

Uma das principais causas da perda dos miRNAs supressores tumorais em cânceres humanos é o silenciamento dos seus transcritos primários por hipermetilação da região promotora de suas ilhas CpG (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012; SAITO *et al.*, 2006). Um número crescente de miRNAs silenciados por metilação têm sido descrito desde o primeiro estudo em 2006 por Saito e colaboradores.

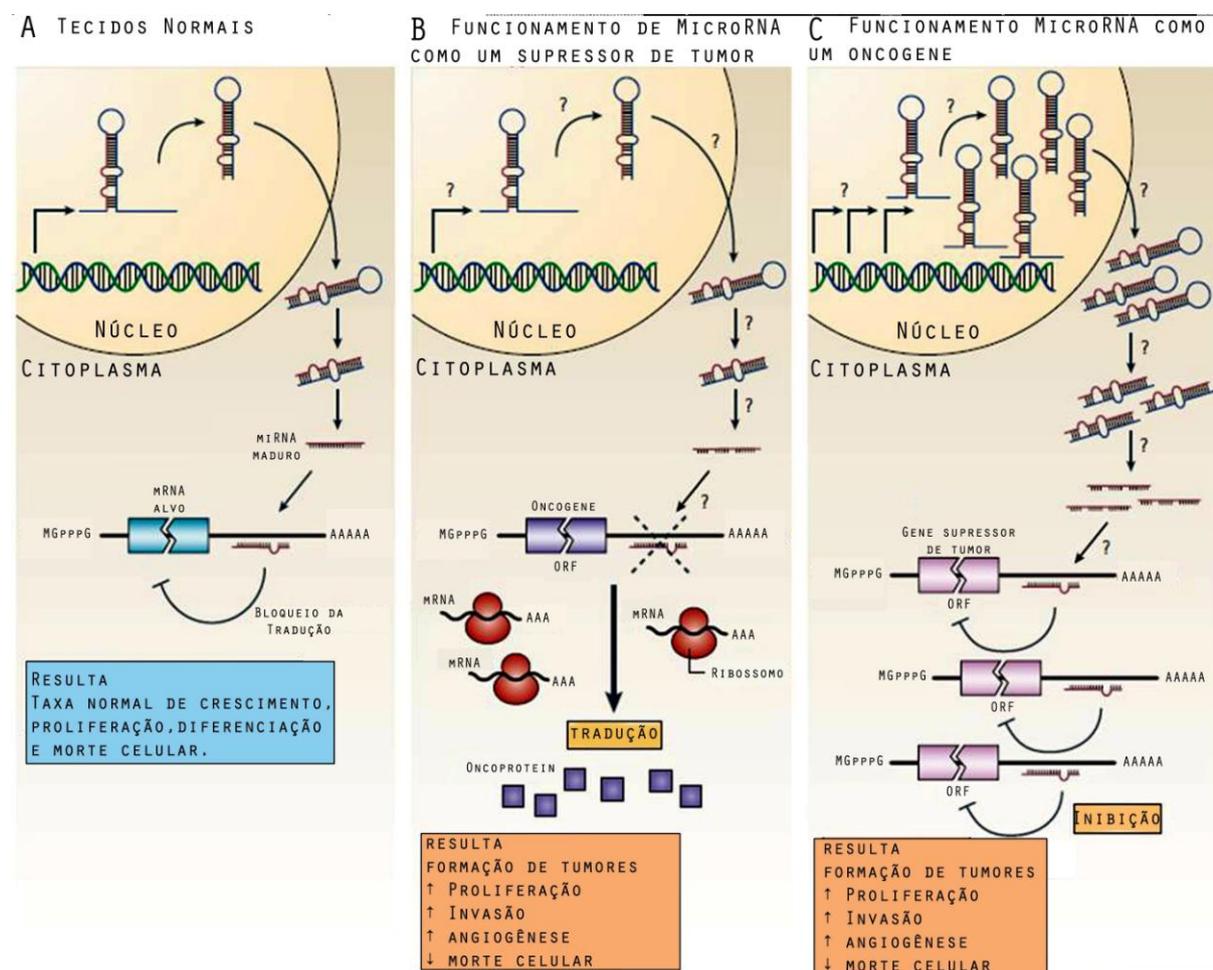
Estudos na linhagem celular de câncer colorretal HCT-116 demonstrou que a hipermetilação aberrante do supressor tumoral miR-124a levou à superexpressão de CDK6. Quando essas células foram transfectadas com miR-124a, ocorreu a diminuição do nível proteico de CDK6 e fosforilação de Rb, ambas envolvidas na progressão do ciclo celular (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012; LUJAMBIO *et al.*, 2007).

Hipermetilação desse miRNA também foi observada em glioblastoma multiforme (SILBER *et al.*, 2008), câncer gástrico (ANDO *et al.*, 2009), malignidades hematopoiéticas (AGIRRE *et al.*, 2009; ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2009); câncer cervical (WILTING *et al.*, 2010), câncer colorretal (DENG *et al.*, 2011) e carcinoma hepatocelular (FURUTA *et al.*, 2010).

Tabela 2. miRNAs hipermetilados em cânceres humanos e suas consequências funcionais (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012)

miRNA	Cromossomo	Alvos	Consequências funcionais	Tipo de câncer
miR-1	20	FoxP1 MET HDAC4	Ativação transcricional Proliferação celular, angiogênese, invasão celular tumoral	Hepatocarcinoma
miR-9-1	1	família FGF família Claudin	Alteração transcricional Proliferação celular Comunicação celular e crescimento	Mama, ovário, pâncreas, hematológicos, renal
miR-9-3	15	E-cadherin	Migração celular	Colorretal, melanoma, cabeça e pescoço
miR-34 ^a	1	CD44	Comunicação celular e transdução de sinal	Hematológicos, próstata, mama, renal, colorretal, ovário
miR-34b/c	11	Notch1 c-Myc Bcl2 SIRT1	Ativação transcricional Ativação transcricional Proliferação celular Silenciamento epigenético	Gástrico, ovário, pulmão, cólon, melanoma, cabeça e pescoço
miRNA-124a	20	CDK6	Desregulação do ciclo celular	Cólon, gástrico, hematológicos, cervical, fígado, glioblastoma
miR-127	14	BCL6	Reprime p53 e proliferação celular	Próstata, bexiga
miR-129-2	11	SOX4	Desdiferenciação celular e proliferação	Gástrico, endometrial, colorretal
miR-137	1	CDK6 E2F6 LSD-1	Desregulação do ciclo celular Desregulação do ciclo celular Alteração da transcrição gênica	Oral, colorretal, glioblastoma,
miR-145	5	OCT/SOX2/KLF4	Desdiferenciação celular	Próstata
miR-148a	7	TGIF2	Capacidade invasiva	Colorretal, melanoma, cabeça e pescoço, mama
miR-129-2	11	SOX4	Desdiferenciação celular e proliferação	Gástrico, endometrial
miR-181c	19	Notch4 K-Ras	Ativação transcricional Transdução de sinal	Gástrico
miRNA-199a	19	PODXL IKKb	Capacidade invasiva Secreção de moléculas pró- inflamatórias	Testicular, ovário
miR-200c	12	ZEB1/ZEB2	Transição epitélio-mesenquimal	Colorretal, mama, pulmão
miR-141	12	ZEB1/ZEB2	Transição epitélio-mesenquimal	Colorretal, mama, pulmão
miR-429	1	ZEB1/ZEB2	Transição epitélio-mesenquimal	Colorretal, mama, pulmão
miR-203	14	ABL1	Comunicação celular e transdução de sinal	Hematológicos, fígado
miR-205	1	ZEB1/ZEB2	Transição epitélio-mesenquimal	Bexiga
miRNA-335	7	SOX4/TNC	Desdiferenciação celular e proliferação	Mama
miR-342	14	PDGFRA RASA1	Proliferação celular Proliferação celular	Colorretal
let-7a-3	22	IGF-II	Comunicação celular e transdução de sinal	Ovário, mama

Figura 5. miRNA atuando como genes supressores tumorais e oncogenes. A) Tecido normal, transcrição correta do microRNA (miRNA), processamento e ligação para complementaridade de sequencias no RNAm-alvo resultando na repressão da expressão do gene-alvo através de bloqueio da tradução da proteína ou alteração da estabilidade do RNAm (não mostrado). Todos os resultados têm o nível normal de crescimento celular, proliferação, diferenciação e morte celular. B) MicroRNA atuando como supressor de tumor. Após mutação, ocorre redução ou deleção de um miRNA, que atua inibindo os transcritos oncogênicos. Todos os resultados podem envolver o aumento da proliferação, angiogênese, diminuição dos níveis de apoptose, não diferenciação ou desdiferenciação do tecido, conduzindo a formação do tumor. C) MicroRNA atuando como oncogene, resultaria na formação de um tumor. Após mutação, ocorre aumento na expressão do miRNA, que atuará inibindo transcritos de supressor de tumor.



Adaptado de ESQUELA-KERSCHER & SLACK (2006). ORF (*Open Reading Frame* – Quadro aberto de leitura)

1.2.4.2 Ciclo do Folato e carcinogênese

A dieta desempenha um fator crucial na carcinogênese, sendo que cerca de um terço das mortes causadas por câncer está associada com uma nutrição inapropriada. Apesar de não haver um consenso acerca dos fatores de risco associados com a dieta, em

mais de 80% dos estudos epidemiológicos, o consumo de frutas e vegetais está associado com a diminuição do risco do desenvolvimento do câncer. Dentre os agentes presentes que podem agir como citoprotetores nas frutas e vegetais, destaca-se o folato (CHOI & MASON, 2000; DUTHIE *et al.*, 2002).

O folato é um importante fator para várias vias metabólicas celulares envolvidas na transferência de grupos metil, tendo um papel fundamental na síntese, reparo, estabilidade, integridade e metilação do DNA. Conseqüentemente, uma deficiência de folato nos tecidos com células com alta replicação pode resultar numa síntese ineficaz de DNA, resultando numa redução da proliferação celular, irregularidades na morfologia e fisiologia celular (CHOI & MASON, 2000; GLYNN & ALBANES, 1994; KIM, 1999; SHRUBSOLE *et al.*, 2004; SIRACHAINAN *et al.*, 2008).

A possibilidade do envolvimento da deficiência de folato na carcinogênese foi considerada a partir dos experimentos de Heath em 1966 através da observação de anormalidades citogenéticas nas culturas de medula óssea de pacientes deficientes em folato (GLYNN & ALBANES, 1994). Desde então, a deficiência do folato está associada na etiologia de diversas neoplasias, como o câncer do sistema nervoso, de mama, pulmão, colo uterino, estômago, esôfago, pâncreas, cólon, cabeça e pescoço, leucemia, linfomas, bexiga, rins e dos órgãos genitais (IZMIRLI, 2013).

Dois mecanismos têm sido propostos para explicar como o folato pode aumentar o risco ao câncer. O primeiro é através da alteração do padrão de metilação. O folato, na forma de 5-metiltetrahydrofolato (5-metil THF) serve como doador do grupo metil na remetilação da homocisteína para a metionina, que é convertida para S-adenosilmetionina (SAM), que fornece o grupamento metil para metilação de citosinas específicas, regulando, assim, a transcrição gênica. A deficiência do folato leva a uma depleção da SAM, levando a uma hipometilação do DNA, o que, potencialmente, induz a expressão de oncogenes, levando ao câncer (CHOI & MASON, 2000; DUTHIE *et al.*, 2002; KIM, 1999; SIRACHAINAN *et al.*, 2008).

O segundo mecanismo através do qual o folato pode alterar a estabilidade do DNA é pela incorporação errada de uracila na síntese de DNA. Folato, na forma de 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-metileno THF), doa um grupo metil para uracila, convertendo-a em timina, que é usada na síntese e reparo do DNA. No entanto, em concentrações limitadas de folato, uma incorporação inadequada de uracila pode ocorrer. Como resultado, a célula ao tentar excisar a uracila, induz uma quebra de fita única na

molécula de DNA. Num ambiente deficiente em folato, a célula pode entrar num ciclo de reparo catastrófico, que pode levar à quebra de fita dupla, danos cromossômicos e câncer (CHOI & MASON, 2000; DUTHIE *et al.*, 2002; KIM, 1999; SIRACHAINAN *et al.*, 2008).

Metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima regulatória importante no metabolismo do folato. Ela catalisa a redução do 5,10-metileno THF em 5-metil THF, o doador de metil para remetilação da homocisteína em metionina. Mutações e polimorfismos no gene *MTHFR*, localizado no braço curto do cromossomo 1, levam a uma diminuição da atividade dessa enzima (FROSST *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*, 1994; KHAZAMIPOUR *et al.*, 2009; SHRUBSOLE *et al.*, 2004). O polimorfismo mais estudado está localizado no éxon 4 e resulta na substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 (C677T), levando a uma troca de uma valina por uma alanina no códon 222 (IZMIRLI, 2013). Esse polimorfismo está associado a uma maior termolabilidade e uma diminuição de 30% e 60% da atividade enzimática nos heterozigotos (CT) e nos homozigotos (TT), respectivamente. A redução enzimática do *MTHFR* está associada com o aumento do risco de diversas doenças, como Alzheimer, Síndrome de Down, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, isquemia, esquizofrenia, depressão, hipotonia, migrânea, complicações na gravidez, palato fendido, além de diferentes tipos de cânceres (FROSST *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*, 1994; IZMIRLI, 2013; KHAZAMIPOUR *et al.*, 2009; SHRUBSOLE *et al.*, 2004).

1.4 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do Sistema Nervoso Central constituem populações exclusivas e heterogêneas de neoplasias, variando em sua malignidade. Mesmo os tumores considerados benignos são comumente letais por sua capacidade infiltrativa, tendência de passar por transformação maligna e por afetar o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades vitais humanas, podendo levar à debilidade e paralisia (BEHIN *et al.*, 2003; NCI, 2000; OHGAKI & KLEIHUES, 2005).

O câncer do Sistema Nervoso Central representa cerca de 2% de todas as neoplasias malignas na população mundial, mas é necessário levar em conta sua alta taxa de mortalidade e morbidade. Apesar de mais da metade desses tumores serem considerados benignos, eles são a principal causa de morte devido a tumores sólidos em crianças e a terceira em adolescentes e adultos entre 15 e 34 anos (Buckner *et al.*, 2007).

Durante os últimos anos, a taxa de incidência e mortalidade desses tumores aumentou nos países desenvolvidos principalmente nas faixas etárias mais avançadas. Nos Estados Unidos, são estimados cerca de 43.800 novos casos desses tumores por ano, e destes, cerca de 12.760 vão a óbito. No Brasil, foram esperados 9.270 novos casos de tumores do Sistema Nervoso Central em 2012, 90 deles no estado do Pará (BUCKNER *et al.*, 2007; INCA, 2011).

A predisposição genética para os tumores do Sistema Nervoso Central parece ser incomum, apesar de que alguns tipos possam ser herdados como sintomas de algumas doenças hereditárias, como a neurofibromatose tipo 1 (mutação em *NF1*), síndrome de Turcot (mutação em *APC*), síndrome de Gorlin (mutação em *PTCH*) e síndrome de Li-Fraumeni (mutação em *TP53* ou *CHECK2*) (BUCKNER *et al.*, 2007).

A incidência dos tumores é ligeiramente maior em homens do que em mulheres numa proporção de 1,4:1. Devido à grande heterogeneidade desses tumores, torna-se difícil a identificação de fatores de risco para os tumores do Sistema Nervoso Central. No entanto, a exposição à radiação ionizante, traumas na cabeça, cigarro, consumo de álcool durante a gestação, exposição a alguns agentes químicos, dieta, infecção por vírus e uso de drogas e outros medicamentos parecem ser fatores de risco não herdáveis importantes em sua etiologia. Apesar de alguns estudos sugerirem um aumento de risco associado à exposição à radiação gerada por radiofrequência, por telefones celulares ou telecomunicações, nenhum deles foi conclusivo (INCA, 2011; MERREL, 2012; PRADOS *et al.*, 2008).

1.4.1 Meningiomas

Os meningiomas são os tumores intra-cranianos mais comuns, originados das meninges que revestem o cérebro e o cordão espinhal. Eles correspondem a cerca de 30% dos tumores intracranianos, com a incidência anual estimada em 6 em cada 100 mil indivíduos (AYDEMIR *et al.*, 2012; PÉREZ-MAGÁN *et al.*, 2012; RAIZER, 2010; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; WROBEL *et al.*, 2005).

A classificação dos tumores do Sistema Nervoso estabelecida pela Organização Mundial de Saúde distingue três graus de malignidade: meningiomas benignos de grau I, meningiomas atípicos de grau II e meningiomas anaplásicos de grau III. Cerca de 90% dos meningiomas são tumores de crescimento lento de grau I, subclassificados a partir de seus achados microscópicos (meningotelial, fibroso, transicional, psamomatoso,

angiomatoso, microcístico, secretório, rico em linfoplasmócitos ou metaplásico). Meningiomas atípicos correspondem de 6 a 8% dos casos e são histologicamente definidos pelo aumento da atividade mitótica, da celularidade, razão núcleo/citoplasma alta, nucléolo proeminente, crescimento ininterrupto sem um padrão e necrose. Esses tumores apresentam a tendência de recorrência local mesmo após ressecção total. Aproximadamente 2 a 3% dos meningiomas apresentam características de malignidade, incluindo uma alta atividade mitótica e aparência histológica similar a sarcoma, carcinoma ou melanoma. Esses tumores são classificados como anaplásicos e estão associados a um alto risco de recorrência e metástase (MERREL, 2012; RAIZER, 2010; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 1997; WROBEL *et al.*, 2005).

Os meningiomas atingem principalmente pacientes idosos, com pico na sexta e sétima década de vida. Diferentemente da maioria dos tumores do Sistema Nervoso Central, os meningiomas tem uma ocorrência maior no sexo feminino, numa razão de 3:2, quando comparada com o sexo masculino. Apesar disso, os meningiomas de grau II e III são mais frequentes no sexo masculino. Meningiomas são relativamente raros em crianças, correspondendo a menos de 2% dos tumores intracranianos em crianças, e parecem estar associados a um perfil mais agressivo e a síndromes hereditárias, como Neurofibromatose do Tipo 2, síndrome de Gorlin e de Cowden (DREVELEGAS, 2005; RAIZER, 2010; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006).

Procedimento cirúrgico é a modalidade primária para os pacientes que requerem tratamento. Quando possível, a ressecção total pode ser curativa, eliminando a necessidade de outros tratamentos como radiação. Radioterapia tem se tornado a base de tratamento de meningiomas nos diversos graus, permitindo controle local e melhoria ou estabilização dos sintomas neurológicos. Pouca eficácia foi observada na utilização de quimioterapia citotóxica no tratamento de meningiomas. Avanços na elucidação da patogênese molecular têm possibilitado estudos utilizando agentes biológicos, como interferon- α -2B, inibidores de PDGF, VEGF e c-kit no tratamento desse câncer (RAIZER, 2010).

1.4.2 Genética dos meningiomas

Os meningiomas estão entre os primeiros neoplasmas sólidos estudados por citogenética clássica. A ausência de um cromossomo do grupo G foi detectada como uma alteração consistente em 1967 (ZANG & SINGER, 1967) e identificada como um

cromossomo 22 em 1972 (MARK *et al.*, 1972; WEBER *et al.*, 1997). Diversos trabalhos citogenéticos e moleculares mais recentes confirmam os resultados desses primeiros estudos ao mostrar que a perda do cromossomo 22 ocorre em 40 a 70% de todos os meningiomas. Além disso, a inativação do gene *NF2* (22q12.2) em meningiomas de todos os graus indica que este evento é um dos primeiros na patogênese desses tumores (AYDEMIR *et al.*, 2012; BELLO *et al.*, 2004; BÖSTROM, *et al.*, 2001; CORDEIRO *et al.*, 2009; KRUPP *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2005; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; RUTTLEDGE *et al.*, 1994; WEBER *et al.*, 1997). Alguns estudos apontam que meningiomas com *NF2* intacto geralmente tem cariótipo normal, sem alterações genéticas ou epigenéticas óbvias e estão associados com o tipo meningotelial (VAN TILBORG *et al.*, 2006). Outros genes, como o *BAM22*, *LARGE*, *MNI* e *INI1*, localizados em outras regiões do braço longo do cromossomo 22 têm sido alvo de estudos, devido a presença de deleções intersticiais que não envolvem a região do *NF2* em alguns meningiomas (AYDEMIR *et al.*, 2012; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006).

A segunda alteração cromossômica mais comum é a deleção do braço curto do cromossomo 1, cuja frequência aumenta proporcionalmente ao grau de malignidade. Este evento é observado em mais de dois terços dos meningiomas atípicos e anaplásicos, sugerindo que a deleção do 1p está envolvida na progressão tumoral. Vários genes candidatos como o *TP73*, *CDKN2C*, *RAD54L* e *ALPL*, localizados nessa região, têm sido estudados, porém sem ainda resultados conclusivos. Além disso, alguns estudos mostram aumento de metilação aberrante na região promotora em meningiomas com deleção do 1p (AYDEMIR *et al.*, 2012; BELLO *et al.*, 2004; BÖSTROM, *et al.*, 2001; LAMSZUS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2005; LOMAS *et al.*, 2004; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; WROBEL *et al.*, 2005).

Outros genes candidatos localizados em outras regiões cromossômicas deletadas ou amplificadas em meningiomas, envolvidos na progressão tumoral, têm sido estudados nesses tumores. A perda do braço curto do cromossomo 9 é um dos poucos exemplos com clara associação com genes específicos: *CDKN2A*, *CDKN2B* e *ARF*. Deleções nesses genes são comuns na maioria dos meningiomas anaplásicos, o que indica que a inativação dos pontos de checagem é uma etapa essencial na progressão tumoral (AYDEMIR *et al.*, 2012; LAMSZUS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2005; PERRY *et al.*, 2004;

RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; TSE *et al.*, 1998; WROBEL *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2002).

Perdas de segmentos do cromossomo 10 têm sido uma alteração comum em meningiomas de graus avançados, o que levou aos estudos dos genes *PTEN* e *TP53*, mas mutações nesses genes têm se mostrado raras (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006).

Além de perdas no cromossomo 10 e no braço curto dos cromossomos 1 e 22, os meningiomas atípicos geralmente apresentam perda das regiões 6q, 14q e 18q, bem como ganhos em 1q, 9q, 12q, 15q, 17q e 20q. Meningiomas anaplásicos compartilham essas aberrações cromossômicas, mas também apresentam perdas mais frequentes em 6q, 10 e 14q, perdas adicionais em 9p e amplificação gênica em 17q23 (AYDEMIR *et al.*, 2012; WROBEL *et al.*, 2005).

A metilação aberrante da região promotora é um importante processo na progressão tumoral em cânceres do sistema nervoso. Entretanto, ainda são escassos os estudos do padrão de metilação em meningiomas (AMATYA *et al.*, 2004; AYDEMIR *et al.*, 2012; LOMAS *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Investigar alterações genéticas e epigenéticas em meningiomas na população paraense

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Associar o polimorfismo *MTHFR* C677T com o aumento do risco ao meningioma na população paraense;
- Avaliar o padrão de metilação dos miRNAs 124a2 e 124a3 em pacientes de meningioma na população paraense;
- Analisar o padrão de metilação na região promotora de genes supressores tumorais em meningiomas da população paraense;

3. CAPÍTULO I

Análise do polimorfismo *MTHFR* C677T em meningiomas na população paraense

Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos; Bárbara do Nascimento. Borges; Isabela Guerreiro Diniz; José Reginaldo Nascimento Brito; Julio Cesar Pieczarka; Nilson Praia Anselmo; Cleusa Yoshiko Nagamachi.

RESUMO

O metabolismo do folato desempenha um importante papel na carcinogênese. Metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), uma das enzimas mais estudadas dessa via, é responsável pela redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, doador do grupo metil na remetilação da hemocisteína em metionina. O polimorfismo *MTHFR* C677T leva a uma substituição de uma alanina por uma valina, causando uma redução da atividade dessa enzima, normalmente associada com alguns tumores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar uma possível associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T com o aumento do risco ao meningioma na população paraense. Material e Métodos: Foram genotipados 23 pacientes com meningioma e 96 indivíduos sem histórico de câncer para o polimorfismo *MTHFR* C677T utilizando PCR e sequenciamento direto. Resultados: As diferenças observadas entre os diferentes genótipos e entre os alelos dos grupos controle e de pacientes não foram estatisticamente significantes. No entanto, apesar de não estatisticamente significativa, o genótipo TT parece estar associado a um aumento do risco de desenvolver meningioma quando comparado ao genótipo CC (OR = 2,6494). Conclusão: Não foi observada associação entre o polimorfismo C677T do *MTHFR* e meningioma em pacientes da população paraense. Um estudo utilizando um número amostral maior de pacientes é necessário para confirmar que o genótipo TT não está associado com os pacientes de meningioma na população paraense.

Palavras-chave: meningioma, *MTHFR*, polimorfismo, C677T, metilenotetrahidrofolato redutase

INTRODUÇÃO

O folato é um importante fator para diversas vias metabólicas na célula, como a síntese, reparo e metilação do DNA (Izmirli, 2013; Kim *et al.*, 1999; Sirachainan *et al.*, 2008). Dentre as diversas enzimas que regulam seu metabolismo, destaca-se a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), responsável pela redução irreversível do 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno THF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-metil THF), doador do grupamento metil na remetilação da hemocisteína em metionina (Duthie *et al.*, 2002). Mutações e polimorfismos no gene *MTHFR* podem levar a uma diminuição da atividade dessa enzima. O polimorfismo mais comumente estudado está localizado no éxon 4 desse gene, resulta na substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 (C677T), levando à troca de uma valina por uma alanina no códon 222 (Izmirli, 2013). Esse polimorfismo está associado a uma maior termolabilidade e uma diminuição de 30% e 60% da atividade enzimática nos heterozigotos (CT) e nos homozigotos (TT), respectivamente (Fross *et al.*, 1995). O genótipo *MTHFR* 677 TT está associado com níveis mais baixos de folato circulante (5-metil THF), acúmulo de 5,10-metileno THF e níveis reduzidos de metilação global de DNA nos leucócitos de sangue periférico (Kim *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2010). A redução enzimática do *MTHFR* está associada com o aumento do risco de diversas doenças, como Alzheimer, Síndrome de Down, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, isquemia, esquizofrenia, depressão, hipotonia, migrânea, complicações na gravidez, palato fendido, além de diferentes tipos de cânceres (Izmirli, 2013).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma dieta deficiente em folato está associada na etiologia de diversas neoplasias, como cânceres do sistema nervoso, de mama, pulmão, colo uterino, estômago, esôfago, pâncreas, cólon, cabeça e pescoço, leucemia, linfomas, bexiga, rins e dos órgãos genitais (Izmirli, 2013; Li *et al.*, 2013).

Apesar de muitas publicações sugerirem a associação entre polimorfismos das enzimas do ciclo do folato com a tumorigênese em diferentes cânceres, ainda são escassos os trabalhos em tumores cerebrais (Bethke *et al.*, 2008; Da Costa *et al.*, 2012; Kafadar *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Sirachainan *et al.*, 2008).

Os meningiomas são tumores que se originam das meninges que revestem o cérebro e o cordão espinhal (Riemenschneider *et al.*, 2006). Apresentam-se como os mais frequentes entre os tumores intracranianos (Pérez-Mágan *et al.*, 2010; Zhi *et al.*, 2013), representando cerca de 20% dos tumores cerebrais, com uma incidência de 6 em cada 100

mil indivíduos e uma ocorrência maior no sexo feminino. Cerca de 90% possuem crescimento lento, considerado pela Organização Mundial da Saúde, como benignos do tipo I (Louis *et al.*, 2000; Riemenschneider *et al.*, 2006). O presente trabalho tem como objetivo investigar a associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e meningioma na população paraense.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

As amostras de tecidos tumorais frescos de meningiomas utilizadas no presente trabalho foram coletadas de 23 pacientes submetidos à craniotomia, sem qualquer tratamento terapêutico prévio, atendidos entre os anos de 2005 e 2009 no Hospital Ophir Loyola. O diagnóstico histopatológico foi realizado por histopatologista utilizando-se da classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (Louis *et al.*, 2000), como procedimento médico clínico normal.

Foram coletadas amostras de sangue de 96 indivíduos atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, sem histórico de lesões pré-neoplásicas, para ser utilizada como grupo controle.

Antes da coleta, todos os pacientes ou um responsável assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), permitindo a doação de amostras e acesso a anamnese. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Pará (Anexo 2) conforme os termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Extração do DNA genômico

Todas as amostras de meningioma foram submetidas à microdissecção. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método descrito por Sambrook *et al.* (1989) com modificações.

Reação em cadeia da Polimerase

Os fragmentos gênicos contendo o polimorfismo analisado foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foram utilizados tampão de reação 1X (10X=KCl 500mM, 100mM Tris-HCl), 1,25mM de cada dinucleotídeo, 0,7mM de

cloreto de magnésio, 100ng de DNA molde, 0,5 μ M de cada iniciador (F: 5'-AAGCAGAGGACTCTCTCTGCC-3' e R: 5'-CCCCCAGCCTGTGCGAGGACGGT-3') (Borges, 2010), 1,5U de *Taq* Platinum DNA polimerase. As condições da PCR utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 51°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A eficiência da amplificação foi verificada aplicando 4 μ L da reação de PCR juntamente com 2 μ L de *blue juice* (5mL de glicerol, 1mL de azul bromo fenol 1%, 1mL de xileno-cianol 0,1%, 2mL de EDTA 0,5M), e submetendo à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 3 μ L de Sybr® Safe (Invitrogen). A eletroforese ocorreu em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) a uma corrente de 100V por aproximadamente 30 minutos. A visualização foi realizada através da luz ultravioleta.

Sequenciamento do DNA

O DNA purificado foi sequenciado pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems)* e o mesmo iniciador *forward* da PCR. As reações foram submetidas a eletroforese em capilar utilizando o sequenciador automático ABI Prism® 3130 Genetic Analyser (*Applied Biosystem*). As sequências foram então submetidas na forma de cromatografia e posteriormente impressas e analisadas utilizando o programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999).

Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres, *et al.*, 2007). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado usando o teste do qui-quadrado (χ^2). O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar as diferenças alélicas e genotípicas dos grupos controle e pacientes. O teste de *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% foi aplicado para estimar o risco relativo do desenvolvimento do meningioma das variáveis histopatológicas (sexo, idade e grau do tumor) associadas aos genótipos *MTHFR* C677T. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

A média de idade foi de $47 \pm 16,16$ e $48,72 \pm 13,62$, com uma razão mulher/homem de 3,6 (18/5) e 2,2 (66/30) nos grupos de pacientes e controle, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa na idade e sexo entre os grupos ($p > 0,05$).

Uma banda de aproximadamente 320 pares de bases foi obtida através da amplificação por PCR e os genótipos foram identificados através da análise do sequenciamento (Figura 1).

A distribuição genotípica para *MTHFR* C677T, a frequência alélica, e o risco para o meningioma, assim como o intervalo de confiança (IC) de 95% estão apresentadas na Tabela 1. As frequências desse polimorfismo em ambos os grupos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos CC, CT e TT tiveram frequência de 53,13%, 39,58% e 7,29% no grupo controle, e 47,83%, 34,78% e 17,39% no grupo de pacientes, respectivamente. A frequência dos alelos C e T foi 72,92% e 27,08% no grupo controle e 65,21% e 34,78% nos pacientes, respectivamente. As diferenças observadas entre os diferentes genótipos e entre os alelos dos grupos controle e de pacientes não foram estatisticamente significantes.

Testes do *Odds Ratio* foram realizados para verificar a influência do homozigoto variante TT em relação ao risco de desenvolver meningioma. Os resultados indicam que os portadores do genótipo CT e TT possuem 0,98 e 2,65 mais chances de desenvolver meningioma quando comparados com os que apresentam genótipo CC, respectivamente. Os portadores do alelo T (CT + TT) possuem aproximadamente 1,2364 mais chances de desenvolver esse tumor quando comparados com o genótipo CC. Apesar de nenhuma variável histopatológica ter sido estatisticamente significativa, parece existir uma tendência maior de desenvolvimento de meningioma em portadores do alelo T no sexo feminino (OR = 1,5) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A dieta representa um importante fator na carcinogênese, sendo uma nutrição inapropriada responsável por cerca de um terço das mortes relacionadas ao câncer. A deficiência do folato, agente citoprotetor encontrado em frutas e verduras, comum inclusive nos países desenvolvidos e pode afetar uma grande porcentagem da população, principalmente em grupos com baixo poder socioeconômico (Duthie *et al.*, 2002). A

enzima MTHFR tem um papel muito importante no metabolismo do folato, e mutações e polimorfismos têm sido descritos no gene que codifica essa enzima (Izmirli, 2013).

As frequências genóticas e alélicas do grupo controle encontradas no presente trabalho não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas com as encontradas por Yoshioka *et al.* (2006) em um estudo com 127 indivíduos da população paraense.

No presente estudo, não foi observada associação entre o polimorfismo C677T do *MTHFR* e meningioma. Apesar de não ter mostrado estatisticamente significativo, os dados encontrados nesse trabalho sugerem que o genótipo TT tende a aumentar o risco de desenvolver meningioma quando comparado ao genótipo CC (OR = 2,6494). A literatura é controversa sobre a correlação entre os polimorfismos do *MTHFR* e o desenvolvimento do câncer. O polimorfismo *MTHFR* 677CT modula o risco de câncer de uma maneira sítio-específica, uma vez que a necessidade e a susceptibilidade à deficiência de folato são específicas para cada tecido. Esse polimorfismo parece aumentar o risco de câncer de mama, do endométrio, colo do útero, estômago, esôfago e bexiga. Outros estudos relatam uma diminuição do risco para câncer colorretal, carcinoma hepatocelular, leucemias e linfomas (Izmirli, 2013; Kim, 1999).

Nossos dados corroboram os estudo de Kafadar *et al.* (2006) que não encontraram diferenças estatisticamente significativas na frequência do genótipo TT entre os pacientes de meningioma e o grupo controle, nem no aumento do risco associado a esse genótipo na população turca. No entanto, estudos em outras populações, no entanto, o polimorfismo *MTHFR* 677CT mostrou estar associado com meningioma. Bethke *et al.* (2008) encontraram um aumento estatisticamente significativo do risco de desenvolver meningioma associado com o genótipo CT (OR= 1,35) em cinco regiões europeias (sul da Inglaterra, nordeste do Reino Unido, Dinamarca, Finlândia e Suécia). Já em uma investigação desse polimorfismo no norte da China, Li *et al.* (2013) encontraram uma associação do genótipo TT com o aumento do risco ao meningioma.

Considerando que a amostra do presente trabalho, assim como o de Kafadar *et al.* (2006), inclui um número relativamente pequeno de pacientes de meningioma, esses resultados devem ser testados utilizando um número amostral maior de pacientes para confirmar se o genótipo TT não está associado com os pacientes de meningioma na população paraense.

BIBLIOGRAFIA

Ayres, M.; Ayres Jr, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. (2007) BioEstat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 5 ed. 290pp.

Bethke, L.; Webb, E.; Murray, A.; Schoemaker, M.; Feychting, M.; Lönn, S.; Ahlbom, A.; Malmer, B.; Henriksson, R.; Auvinen, A.; Kiuru, A.; Salminen, T.; Johansen, C.; Christensen, H.C.; Muir, K.; McKinney, P.; Hepworth, S.; Dimitropoulou, P.; Lophatananon, A.; Swerdlow, A. & Houlston, R. (2008) Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 17(5):1195-1202.

Borges, B.N. (2010) Análise de polimorfismos genéticos e do padrão de hipermetilação como marcadores de tumores gástricos na população paraense. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, 219 pp.

Chung, C.J.; Pu, Y.S.; Su, C.T.; Chen, H.W.; Huang, Y.K.; Shiue, H.S. & Hsueh, Y.M. (2010) Polymorphisms in one-carbon metabolism pathways genes, urinary arsenic profile, and urothelial carcinoma. *Cancer Causes & Control* 21(10):1605-1613.

Da Costa, D.M.; de Lima, G.P.; Faria, M.H. & Rabenhorst, S.H. (2012) Polymorphisms of folate pathway enzymes (methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase) and their relationship with thymidylate synthase expression in human astrocytic tumors. *DNA and Cell Biology* 31(1):57-66.

Duthie, S.J.; Narayanan, S.; Brand, G.M.; Pirie, L. & Grant, G. (2002) Impact of folate deficiency on DNA stability. *The Journal of Nutrition* 132(8):2444S-2449S.

Frosst, P.; Blom, H.J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A.; Matthews, R.G.; Boers, G.J.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L.A.J.; van den Heuvel, L.P. & Rozen, R. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10(1):111-113.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Izmirli, M. (2013) A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular Biology Reports* 40(1):625-637.

Kafadar, A.M.; Yilmaz, H.; Kafadar, D.; Ergen, A.; Zeybek, U.; Bozkurt, N.; Kaday, C. & Isbir, T. (2006) C677T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in meningiomas and high-grade gliomas. *Anticancer Research* 26(3B):2445-2450.

Kim, Y.I. (1999) Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10(2):66-88.

Li, R.; Wang, R.; Li, Y.; Xianfeng, L.; Feng, Y.; Li, Y. & Jiang, C. (2013) Association study on MTHFR polymorphisms and meningioma in northern China. *Gene* 516(2):291-293

Louis, D.N.; Scheithauer, B.W.; Budka, H.; von Deimling, A.; Kepes, J.J. (2000) Meningiomas. In: Kleihues, P.; Cavenee, W.K.(ed). *Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System, WHO Classification of Tumors Lyon: IARC Press: 176-184.*

Pérez-Magán, E.; Campos-Martín, Y.; Mur, P.; Fiaño, C.; Ribalta, T.; García, J.F.; Rey, J.A.; de Lope, A.R.; Mollejo, M. & Meléndez, B. (2012) Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(10):882-893.

Riemenschneider, M.J.; Perry, A. & Reifenberger, G. (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology* 5(12):1045-1054.

Rosenberg, N.; Murata, M.; Ikeda, Y.; Opare-Sem, O.; Zivelin, A.; Geffen, E. & Seligsohn, U. (2002) The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *The American Journal of Human Genetics* 70(3):758-762.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sanger, F.; Nichlen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5468.

Schneider, J.A.; Rees, D.C.; Liu, Y.T. & Clegg, J.B. (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *The American Journal of Human Genetics* 62(5):1258-1260.

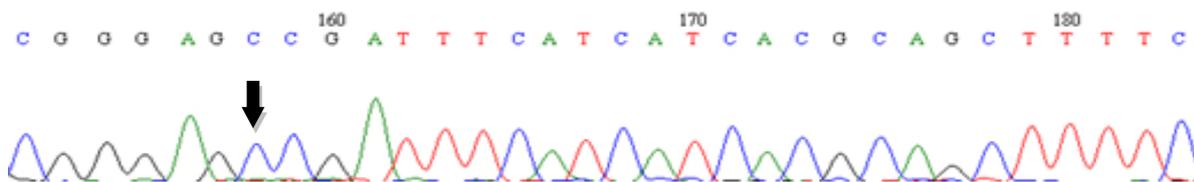
Sirachainan, N.; Wongruangsri, S.; Kajanachumpol, S.; Pakakasama, S.; Visudtibhan, A.; Nuchprayoon, I.; Lusawat, A.; Phudhicharoenrat, S.; Shuangshoti, S.; Hongeng, S. (2008) Folate pathway genetic polymorphisms and susceptibility of central nervous system tumors in Thai children. *Cancer Detection and Prevention* 32:72-78.

Yoshika, F.K.N.; Araújo, A.G.; Tavella, M.H.; Hamoy, I.G. & Guerreiro, J.F. (2006) Prevalence of hereditary risk factors for thrombophilia in Belém, Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology* 29(1):38-40.

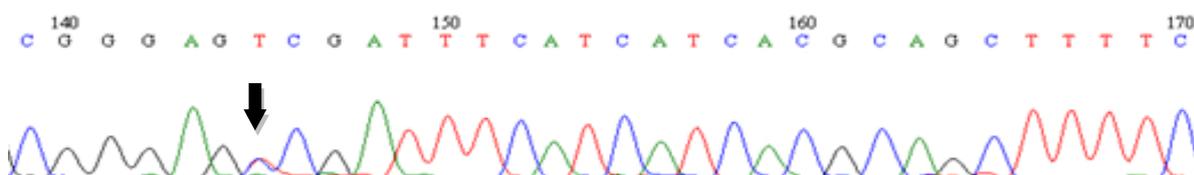
Zhi, F.; Zhou, G.; Wang, S.; Shi, Y.; Peng, Y.; Shao, N.; Guan, W.; Qu, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Yang, C.; Wang, R.; Wu, S.; Xia, X. & Yang, Y. (2013) A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. *International Journal of Cancer* 132(1):128-136.

Figura 1 – Eletroferogramas representando os genótipos relativos ao polimorfismo C>T do gene *MTHFR*. A) genótipo CC. B) genótipo CT. C) genótipo TT

A)



B)



C)

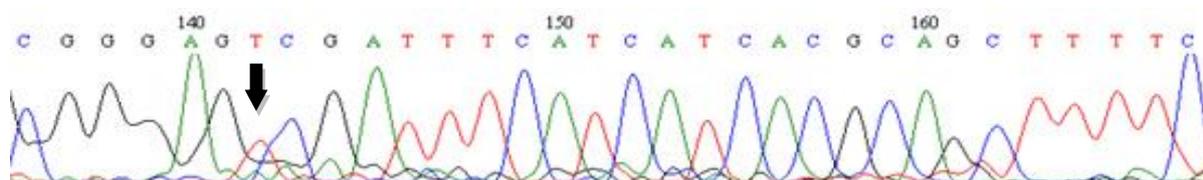


Tabela 1 – Riscos do meningioma associado com o polimorfismo *MTHFR* C677T

Genótipos	Casos (%)	Controles (%)	OR (IC 95%)	p-valor
CC ^a	11 (47,83)	51 (53,13)	1,0	
CT	8 (34,78)	38 (39,58)	0,9761 (0,358 – 2,6610)	0,5853
TT	4 (17,39)	7 (7,29)	2,6494 (0,6595 – 10,6431)	0,1568
CT + TT	12 (48)	45 (46,87)	1,2364 (0,4971 – 3,0748)	0,4106
C ^a	31 (62)	140 (72,92)	1,0	
T	19 (38)	52 (27,08)	1,4359 (0,7237 – 2,8490)	0,1947

^aAlelo de referência. OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Tabela 2 – Associação entre os genótipos do gene *MTHFR* e características histopatológicas dos pacientes

	CC (%)	CT + TT (%)	OR (IC 95%)	p-valor
Idade				
<50 anos	6 (26,08)	7 (30,44)	1,1667 (0,224 -6,081)	0,5933
>50 anos	5 (21,74)	5 (21,74)		
Sexo				
Feminino	9 (39,14)	9 (39,14)	1,5 (0,2 – 11,2366)	0,5449
Masculino	2 (8,69)	3 (13,03)		
Grau				
I	10 (43,48)	11 (47,82)	1,10 (-)	0,7391
II	1(4,35)	1 (4,35)		

4. CAPÍTULO II

Padrão de metilação dos miRNA124a2 e miRNA124a3 em meningiomas na população paraense

Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos; Bárbara do Nascimento Borges; José Reginaldo Nascimento Brito; Julio Cesar Pieczarka; Nilson Praia Anselmo; Cleusa Yoshiko Nagamachi

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes com um importante papel em muitos processos biológicos por regular a expressão de diversos genes. Diversos estudos revelaram que alterações da expressão de miRNAs têm sido associadas com a tumorigênese. Hipermetilação aberrante da região promotora da família miRNA124 tem sido observada em diferentes tumores, incluindo glioblastomas multiforme, câncer gástrico, câncer cervical, câncer colorretal, carcinoma hepatocelular e malignidades hematopoiéticas. O presente trabalho tem como objetivo investigar o padrão de metilação da região promotora do miRNA124a2 e miRNA124a3 em pacientes com meningioma na população paraense. Material e métodos: O padrão de metilação dos miRNA124a2 e miRNA124a3 foi avaliado em 23 pacientes com meningioma na população paraense através de PCR-MSP e visualizada em gel de agarose 3%. Resultados: A região promotora do miRNA124a2 e miRNA124a3 se encontrou metilada em 73,9% e 69,56% das amostras analisadas, respectivamente. Conclusão: A hipermetilação da família do miRNA124 parece ser um evento importante em meningiomas.

Palavras-chave: miRNA124, meningioma, hipermetilação, microRNA

INTRODUÇÃO

Um número crescente de estudos tem utilizado uma nova classe de pequenas moléculas regulatórias de RNA, denominadas microRNAs (miRNAs) tanto no diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores (Calin & Croce, 2006; Esquela-Kercher & Slack, 2006; Mirnezami *et al.*, 2009). Esses miRNAs são fragmentos de RNA não codificantes de tamanho aproximado de 22 nucleotídeos, que regulam genes pós transcricionalmente através da degradação do RNA mensageiro alvo ou inibição da tradução (Wang *et al.*, 2013). Alterações no padrão de expressão dos miRNAs podem levar à perda ou ganho de função de genes alvo, podendo atuar na carcinogênese como genes supressores tumorais ou oncogenes, respectivamente (Esquela-Kercher & Slack, 2006). Uma das principais causas de perda da expressão dos miRNAs supressores tumorais em cânceres humanos ocorre por hipermetilação da região promotora de suas ilhas CpGs (Lopez-Serra & Esteller, 2012; Saito *et al.*, 2006).

Um dos microRNAs mais conservados e abundantemente expressos no sistema nervoso é o miRNA 124 (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Esse microRNA possui 3 diferentes isoformas: miRNA124a1, miRNA124a2 e miRNA124a3 (Agirre *et al.*, 2009; Ando *et al.*, 2009), e tem como um de seus principais alvo a proteína cinase dependente de ciclina 6 (CDK6), envolvida na progressão do ciclo celular (Lopez-Serra & Esteller, 2012). Hipermetilação aberrante dessa família de miRNA foi observada em estudos com glioblastoma multiforme (Silber *et al.*, 2008), câncer gástrico (Ando *et al.*, 2009), malignidades hematopoiéticas (Agirre *et al.*, 2009; Roman-Gomez *et al.*, 2009), câncer cervical (Wilting *et al.*, 2010), câncer colorretal (Deng *et al.*, 2011) e carcinoma hepatocelular (Furuta *et al.*, 2010).

Os meningiomas são os tumores intra-cranianos mais comuns, correspondendo de 20 a 30% de todos os tumores do sistema nervoso central (Pérez-Mágan *et al.*, 2010; Zhi *et al.*, 2013), com incidência anual estimada em 6 em cada 100 mil indivíduos (Louis *et al.*, 2000). Esses tumores são mais comuns na sexta e sétima década, com ocorrência maior no sexo feminino do que no masculino, numa razão de 3:2 (Perry *et al.*, 2004; Riemenschneider *et al.*, 2006).

A Organização Mundial da Saúde classifica os meningiomas em três graus baseando-se em critérios histopatológicos: benignos (tipo I), atípicos (tipo II) e anaplásicos (grau III), correspondendo a 80%, 15-20% e 1-3% dos casos, respectivamente (Riemenschneider *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o padrão de metilação dos miRNAs 124a2 e 124a3 em pacientes de meningioma na população paraense.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tecidos tumorais frescos de meningioma utilizadas no presente trabalho foram coletadas de 23 pacientes submetidos à craniotomia, sem qualquer tratamento terapêutico prévio, realizado no Hospital Ophir Loyola entre os anos de 2005 e 2009. Antes da coleta, o paciente ou seu parente mais próximo assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme os termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que permitiu a doação de amostras e acesso à anamnese. O diagnóstico histopatológico foi realizado pelo histopatologista do hospital utilizando-se da classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (Louis *et al.*, 2007), como procedimento médico clínico normal.

Para a extração do DNA genômico seguiu-se a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). O DNA foi então diluído em tampão de eluição e mantido a -20°C até o momento de uso.

Para análise do padrão de metilação, seguiu-se o protocolo de modificação do DNA por ação do bissulfito utilizando o *MethylCode* Kit de conversão de bissulfito (*Life Technologies*), seguindo protocolo do fabricante.

O DNA modificado foi amplificado por reação em cadeia da polimerase metilação específica (MSP). Para a reação de amplificação da região promotora do miRNA124a2, foram utilizados 4 μL de dNTP, 2 μL de MgCl_2 , 2 μL de BSA, 2 μL de DNA molde, 0,5 μL de cada iniciador e 0,5 μL de Platinum *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). Os iniciadores usados para a amplificação do miRNA124a2 foram 5'-TAGGTTTATGTATGTTTTTAGGTG-3' (*forward*) e 5'-CTATTCATAAAAATATAACAATACA-3' (*reverse*) para o alelo não-metilado e 5'-GGTTTATGTATGTTTTTAGGCG-3' (*forward*) e 5'-TCCGTAAAAATATAACGATAG-3' (*reverse*) para o alelo metilado (Ando *et al.*, 2009).

Para a reação de amplificação da região promotora do miRNA124a3, foram utilizados 4 μL de dNTP, 1,5 μL de MgCl_2 , 1 μL de DMSO, 1 μL de betaína, 3 μL de DNA molde, 0,5 μL de cada iniciador e 0,5 μL de Platinum *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). Os iniciadores usados para a amplificação do miRNA124a2 foram 5'-

TAGTTGGTTGAGTGTAGTGTTTTTG-3' (*forward*) e 5'-
 CAAAACATAAAACAAACAACAAACATC-3' (*reverse*) para o alelo não-metilado e 5'-
 GATAGTATAGTCGGTTGAGCGTAGC-3' (*forward*) e 5'-
 CCTCAAAACTAAAACGAACGACG-3' (*reverse*) para o alelo metilado (Ando *et al.*,
 2009).

A eficiência da amplificação foi verificada aplicando 10µL da reação de PCR juntamente com 5µL de *blue juice* (5mL de glicerol, 1mL de azul bromo fenol 1%, 1mL de xileno-cianol 0,1%, 2mL de EDTA 0,5M), e submetendo à eletroforese em gel de agarose 3% corado com 3µL de Sybr® Safe (Invitrogen). A eletroforese ocorreu em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) a uma corrente de 100V por aproximadamente 30 minutos. A visualização foi realizada através da luz ultravioleta.

RESULTADOS

A média de idade dos pacientes de meningioma desse estudo foi $46,23 \pm 16,1074$, com uma proporção de mulheres/homem de 3,6. Das 23 amostras analisadas, 21 (91,3%) eram meningioma benignos de grau I e apenas 2 (8,7%) atípicos de grau II.

Para a análise do padrão de metilação da região promotora do miRNA 124a2, foi obtida uma banda de aproximadamente 100pb, onde 17 (73,9%) das amostras encontravam-se metiladas e 6 (26,09%) não metiladas.

Para investigar a influência das variáveis histopatológicas (idade, sexo e grau do tumor), foi calculado o *Odds Ratio* (Tabela 1). Apesar de não estatisticamente significante, houve um aumento do risco no sexo feminino (OR=2,333) e nos pacientes com idade acima de 50 anos (OR=4,444) associado com a metilação do miRNA 124a2 em meningiomas nessa população. Ambos meningiomas de grau II apresentaram metilação na região promotora desse microRNA.

Para a análise do padrão de metilação da região promotora do miRNA 124a3, foi obtida uma banda de aproximadamente 140pb (Figura 1), onde 16 (69,56%) das amostras encontravam-se metiladas e 7 (30,44%) não metiladas.

Assim como no miRNA124a2, não houve diferença estatisticamente significante no padrão de metilação do miRNA 124a3 entre as variáveis histopatológicas (Tabela 2). Também foi observado um aumento do risco no sexo feminino (OR=5,25) e nos pacientes com idade acima de 50 anos (OR=6) associado com a metilação desse microRNA em

meningiomas nessa população. A região promotora do miRNA 124a3 apresentou-se metilada nas duas amostras de meningioma de grau II.

DISCUSSÃO

Evidências apontam que alterações na expressão dos miRNAs podem estar diretamente relacionadas com a carcinogênese. Tem se demonstrado a existência de miRNAs que tanto promovem quanto inibem a proliferação e sobrevivência celular, atuando dessa forma como oncogenes ou genes supressores de tumor, respectivamente (Cowland *et al.*, 2007).

O miR-124 atua como um gene supressor de tumor, degradando a CDK6, uma importante proteína envolvida na progressão do ciclo celular. Silenciamento epigenético desse microRNA leva à ativação da CDK6 e fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), um dos alvos da cinase (Agirre *et al.*, 2009; Lujambio *et al.*, 2007), diminuindo assim sua atividade antiproliferativa (Grossel & Hinds, 2006) . Wang *et al.* (2012) mostraram um aumento da expressão de CDK6 em mais de 6 vezes em meningiomas benignos.

Hipermetilação na região promotora dos diferentes *loci* que codificam o miR-124 tem sido observado em diferentes tumores. No presente trabalho, 73,91% e 69,56% das amostras apresentaram metilação na região promotora de miRNA 124a2 e miRNA 124a3, respectivamente. Esse resultado é compatível com o trabalho de Zhi *et al.* (2013) que encontraram uma redução na expressão de miR-124 em mais de 3 vezes em meningioma quando comparada com o tecido normal. Padrão de metilação semelhante foi encontrado no trabalho de Lujambio *et al.* (2007), que observaram metilação nos genes da família de miR-124 em 75% das amostras de tumores colorretais. No mesmo trabalho, os autores encontraram diferentes frequências de hipermetilação em linhagens celulares de câncer e tumores primários de outros tecidos: pulmão (48%), linfoma (41%), leucemia (36%), mama (32%), enquanto não observaram hipermetilação em neuroblastomas e sarcomas.

Metilação do miR-124 também tem sido associada com maior taxa de recorrência e mortalidade em leucemia linfoblástica aguda, podendo ser utilizada como um fator prognóstico independente no tratamento desse tumor e abrindo a possibilidade para novas estratégias terapêuticas (Agirre *et al.*, 2009).

Estudo em glioblastoma multiforme, onde a expressão de miR-124, responsável por promover a parada em G0/G1 do ciclo celular, inibir a expressão do RNA de CDK6, da proteína CDK6 e fosforilar Rb, se encontra em níveis mais baixos quando comparada com

o tecido normal, aponta um potencial do miR-124 pra fins terapêuticos em glioblastoma multiforme (Silber *et al.*, 2008).

Alguns microRNAs tem sido alvo de estudo para utilização como ferramenta no prognóstico de meningiomas. Aumento no nível de expressão de miR-190a tem sido considerado um importante preditor diagnóstico independente de outros fatores clinico patológicos. Diminuição na expressão de miR-29c-3p e miR-219-5p têm sido associada com estágios clínicos avançados de meningioma e altas taxa de recorrência (Zhi *et al.*, 2013).

Com os resultados obtidos, podemos concluir que a hipermetilação da família do miR-124 parece ser um evento frequente e importante em meningiomas . Estudos posteriores são necessários para avaliar a sua importância como fator prognóstico e como instrumento no tratamento desses tumores.

BIBLIOGRAFIA

Agirre, X.; Vilas, Zornoza, A.; Jimenez-Velasco, A.; Martin-Subero, J.I.; Cordeu, L.; Garate, L.; San Jose-Eneriz, E.; Abizanda, G.; Rodriguez-Otero, P.; Fortes, P.; Rifon, J.; Bandres, E.; Calasanz, M.J.; Martin, V.; Heiniger, A.; Torres, A.; Siebert, R.; Roman-Gomez, J. & Prosper, F. (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 69(10):4443-4453.

Ando, T.; Yoshida, T.; Enomoto, S.; Asada, K.; Tatematsu, M.; Ichinose, M.; Sugiyama, T.; Ushijima, T. (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *International Journal of Cancer* 124(10):2367-2374.

Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews | Cancer* 6(11):857-866.

Cowland, J.B.; Hother, C. & Grønbaek, K. (2007) MicroRNAs and cancer. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica* 115(10):1090-1106.

Deng, G.; Kakar, S. & Kim, Y.S. (2011) MicroRNA-124a and microRNA-34b/c are frequently methylated in all histological types of colorectal cancer and polyps, and in the adjacent normal mucosa. *Oncology Letters* 2(1):175-180.

Esquela-Kercher, A. & Slack, F.J. (2006) Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6:259-269.

Furuta, M.; Kozaki, K.I.; Tanaka, S.; Arii, S.; Imoto, I.; Inazawa, J. (2010) miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31(5):766-776.

Grossel, M.J. & Hinds, P.W. (2006) From cell cycle to differentiation: an expanding role for cdk6. *Cell Cycle* 5(3):266-270.

Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Yalcin, A.; Meyer, J.; Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 12(9):735-739.

Lopez-Serra, P. & Esteller, M. (2012) DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 31:1609-1622.

Louis, D.N.; Scheithauer, B.W.; Budka, H.; von Deimling, A.; Kepes, J.J. (2000) Meningiomas. In: Kleihues, P.; Cavenee, W.K.(ed). *Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System, WHO Classification of Tumors* Lyon: IARC Press: 176-184.

Lujambio, A.; Ropero, S.; Ballestar, E.; Fraga, M.F.; Cerrato, C.; Setien, F.; Casado, S.; Suarez-Gauthier, A.; Sanchez-Cespedes, M.; Git, A.; Spiteri, I.; Das, P.P.; Caldas, C.; Miska, E.; Esteller, M. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research* 67(4):1424-1429.

Mirnezami, A.H.; Pickard, Z.; Zhang, L.; Primrose, J.N. & Packham, G. (2009) MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *European Journal of Surgical Oncology* 35(4):339-347.

Pérez-Magán, E.; Campos-Martín, Y.; Mur, P.; Fiaño, C.; Ribalta, T.; García, J.F.; Rey, J.A.; de Lope, A.R.; Mollejo, M. & Meléndez, B. (2012) Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(10):882-893.

Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. Review. *Journal of Neuro-Oncology*. 70: 183–202.

Prosper, F. (2009) Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 27(8):1316-1322.

Riemenschneider, M.J.; Perry, A. & Reifenberger, G. (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology* 5(12):1045-1054.

Roman-Gomez, J.; Agirre, X.; Jimenez-Velasco, A.; Arqueros, V.; Vilas-Zornoza, A.; Rodriguez-Otero, P.; Martin-Subero, I.; Garate, L.; Cordeu, L.; San Jose-Eneriz, E.; Martin, V.; Castillejo, J.A.; Bandres, E.; Calasanz, M.J.; Siebert, R.; Heiniger, A.; Torres, A. & Saito, Y.; Liang, G.; Egger, G.; Friedman, J.M.; Chuang, J.C.; Coetzee, G.A.; Jones, P.A. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9(6):435-443.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Silber, J.; Lim, D.A.; Petritsch, C.; Persson, A.I.; Maunakea, A.K.; Yu, M.; Vandenberg, S.R.; Ginzinger, D.G.; James, C.D.; Costello, J.F.; Bergers, G.; Weiss, W.A.; Alvarez-Buylla, A. & Hodgson, J.G. (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BioMed Central Medicine* 6:14.

Zhi, F.; Zhou, G.; Wang, S.; Shi, Y.; Peng, Y.; Shao, N.; Guan, W.; Qu, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Yang, C.; Wang, R.; Wu, S.; Xia, X. & Yang, Y. (2013) A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. *International Journal of Cancer* 132(1):128-136.

Wang, Z.; Yao, H.; Lin, S.; Zhu, X.; Shen, Z.; Lu, G.; Poon, W.S.; Xie, D.; Lin, M.C. & Kung, H. (2013) *Cancer Letters* 331(1):1-10.

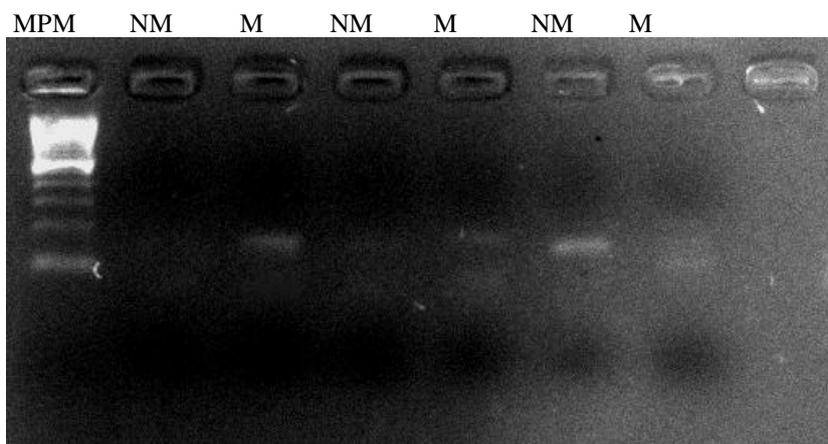
Wilting, S.M.; van Boerdonk, R.A.; Henken, F.E.; Meijer, C.J.; Diosdado, B.; Meijer, G.A.; le Sage, C.; Agami, R.; Snijders, P.J. & Steenbergen, R.D. (2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of has-miR-124 in cervical cancer. *Molecular Cancer* 9:167.

Tabela 1 - Associação entre o padrão de metilação do miRNA 124a2 e características histopatológicas dos pacientes

	M	NM	OR (IC 95%)	p-valor
Sexo				
Feminino	14	4	2,333 (0,2840 – 19,1732)	0,3915
Masculino	3	2		
Idade				
<50 anos	9	5	4,444 (0,4244 – 46,5477)	0,2082
>50 anos	8	1		
Grau				
I	15	6	-	0,5375
II	2	0		

M: metilado; NM: não metilado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

Figura 1 Padrão eletroforético de miRNA124a3 em meningiomas



MPM: marcador de peso molecular; NM: não-metilado; M: metilado

Tabela 2 - Associação entre o padrão de metilação do miRNA 124a3 e características histopatológicas dos pacientes

	M	NM	OR (IC 95%)	p-valor
Sexo				
Feminino	14	4	5,25 (0,6389 – 43,1396)	0,1421
Masculino	2	3		
Idade				
<50 anos	8	6	6 (0,5821 – 6,184)	0,1242
>50 anos	8	1		
Grau				
I	14	7	-	0,4743
II	2	0		

M: metilado; NM: não metilado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

5. CAPÍTULO III

Análise do padrão de metilação de genes supressores tumorais em meningioma

Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos, Bárbara do Nascimento Borges, José Reginaldo Nascimento Brito, Julio Cesar Pieczarka, Eduardo José Melo dos Santos, Nilson Praia Anselmo, Cleusa Yoshiko Nagamachi.

RESUMO

Meningiomas estão entre as neoplasias mais comuns do sistema nervoso central, sendo o tumor intracraniano mais frequente. Os mecanismos moleculares fundamentais que levam à progressão e recorrência dos meningiomas ainda não estão muito claros. Estudos recentes têm demonstrado a importância das alterações epigenéticas no processo da tumorigênese, com ênfase na metilação aberrante das ilhas CpG na região promotora dos genes. A hipermetilação dessas regiões mostrou estar associada com o controle da transcrição gênica, resultando na inativação de importantes genes supressores tumorais, geralmente envolvidos na contenção da progressão tumoral. O presente trabalho tem como objetivo investigar o padrão de metilação da região promotora de genes supressores de tumor em meningiomas na população paraense. Material e métodos: Foram analisados o padrão de metilação dos genes *APC*, *BRCA1*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *ESR1*, *FHIT*, *GSTP1*, *MGMT*, *MLH1*, *NEUROG1*, *PDLIM4*, *PTEN*, *RARB*, *RASSF1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73*, *VHL* e *WIF1* em um meningioma de grau I e um de grau II através de uma placa comercial desenvolvida através da tecnologia MethylScreen. O padrão de metilação do gene *CDKN2B* também foi analisado na amostra coletada em 25 pacientes com meningioma através da conversão por bissulfito, PCR e sequenciamento direto. Resultados: O gene *RASSF1A* apresentou-se metilado em 16,73% e 63,66% dos sítios CpGs analisados na amostra de meningioma de grau I e grau II, respectivamente. O gene *RUNX3* se apresentou metilado apenas na amostra de grau II em 52,88% dos sítios CpG analisados. Nenhum sítio CpG analisado na região promotora de *CDKN2B* encontrou-se metilado. Conclusão: A hipermetilação de *RASSF1A* e *RUNX3* parece ser um evento importante na progressão tumoral em meningiomas. Estudos posteriores do padrão de metilação dos genes *RASSF1A* e *RUNX3* serão de grande importância para validação do papel dessas alterações nesses genes na iniciação e progressão dos meningiomas

Palavras chave: meningioma, genes supressor de tumor, metilação, *RASSF1A*, *RUNX3*, *CDKN2B*.

INTRODUÇÃO

Epigenética compreende mecanismos que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA (Bird, 2007). As principais alterações epigenéticas englobam a metilação de DNA, modificações na cromatina e os RNAs não codificantes (Huidobro *et al.*, 2012; Sandoval & Esteller, 2012). Considerando que as modificações epigenéticas estão envolvidas na regulação gênica durante a diferenciação e manutenção da homeostase, não é surpreendente o envolvimento de padrões epigenéticos aberrantes encontrados em diferenças doenças (Arimondo *et al.*, 2012; Esteller, 2005).

Estudos recentes têm demonstrado a importância das alterações epigenéticas no processo da tumorigênese, com ênfase na metilação aberrante das ilhas CpG na região promotora dos genes (Baylin & Herman, 2000). A hipermetilação dessas regiões mostrou estar associada com a repressão da transcrição gênica, resultando na inativação de importantes genes supressores tumorais envolvidos no ciclo celular, reparo de DNA, metabolismo de carcinógenos, interação celular, apoptose e angiogênese (Esteller, 2008).

Na última década, muitos grupos focaram em mapear o padrão único de metilação das ilhas CpG que define cada neoplasia, os chamados “metilótipos” (Esteller, 2002; 2005). Para isso, muitas técnicas evoluíram para investigar o padrão de metilação de diversos genes em um tumor. Enquanto a metilação de sítios específicos fornece informação de um determinado gene, ferramentas como o MethylScreen podem investigar quantitativamente o padrão de metilação de vários genes ao mesmo tempo (Holemon *et al.*, 2007).

A metilação aberrante da região promotora é um importante processo na progressão tumoral em cânceres do sistema nervoso. Entretanto, ainda são escassos os estudos do padrão de metilação em meningiomas, tumor intracraniano do sistema nervoso mais frequente (Amatya *et al.*, 2002; ; Lomas *et al.*, 2004; Pérez-Mágan *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2002). A maioria dos meningiomas tem perfil benigno e crescimento lento, caracterizados como típico (grau I) pela Organização Mundial da Saúde. Aproximadamente 20% dos meningiomas apresentam um comportamento clínico mais agressivo e um maior risco de recorrência, sendo classificado como atípico (grau II) ou anaplástico (grau III) (Louis *et al.*, 2000; Riemenschneider *et al.*, 2006). O presente trabalho tem como objetivo investigar o padrão de metilação da região promotora de genes supressores de tumor em meningiomas na população paraense.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

As amostras de tecidos tumorais frescos de meningioma utilizadas no presente trabalho foram coletadas de 25 pacientes submetidos à craniotomia, sem qualquer tratamento terapêutico prévio, realizado no Hospital Ophir Loyola entre os anos de 2005 e 2009. Antes da coleta, o paciente ou seu parente mais próximo assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que permitiu a doação de amostras e acesso à anamnese, conforme os termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O diagnóstico histopatológico foi realizado pela equipe médica do hospital utilizando-se da classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (Louis *et al.*, 2000), como procedimento médico clínico normal.

Para a extração do DNA genômico seguiu-se a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). O DNA foi então diluído em tampão de eluição e mantido a -20°C até o momento de uso.

Ensaio de PCR de Metilação de DNA

Para análise do padrão de metilação na região promotora de diferentes genes supressores tumorais, foi realizado ensaio de PCR de metilação de DNA, baseada na tecnologia MethylScreen (Holemon *et al.*, 2007) em duas amostras de meningioma, uma de grau I e outra de grau II, utilizando a placa Human Tumor Suppressor Genes Methylation PCR Assay desenvolvida pela QIAGEN seguindo protocolo do fabricante. Essa placa avalia o padrão de metilação da região promotora dos genes *APC*, *BRCA1*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *ESR1*, *FHIT*, *GSTP1*, *MGMT*, *MLH1*, *NEUROG1*, *PDLIM4*, *PTEN*, *RARB*, *RASSF1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73*, *VHL* e *WIF1*.

Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento

Para análise do padrão de metilação do gene *CDKN2B*, não presente na placa, seguiu-se o protocolo de modificação do DNA por ação do bissulfito utilizando o kit *MethylCode Kit* de Conversão de bissulfito (Life Technologies), seguindo protocolo do fabricante. O DNA modificado foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi composta por 0,05mM de dNTP (dinucleotídeos), tampão de reação 1X (10X=KCl 500mM, 100mM tris-HCl); 1,5mM de MgCl₂; 100ng de DNA molde previamente modificado, 0,4mM de cada iniciador; 1,5u de *Taq* DNA polimerase

e 0,1µg/µl de BSA. Para a amplificação do *CDKN2B*, os iniciadores F1: 5'-GGTTGGTTTTTTATTTTGTAGAG-3', R1: 5'-CCTTCCTAAAAACCTAAACTCAA-3', F2: 5'-GGGGTTAGGGTTAGGTAGG-3' e R2: 5'-AACTACACCAATACAACCACATA-3' foram utilizados com uma temperatura de anelamento de 55°C (Kawamata *et al.*, 2005).

A eficiência da amplificação foi verificada aplicando 10µL da reação de PCR juntamente com 5µL de *blue juice* (5mL de glicerol, 1mL de azul bromo fenol 1%, 1mL de xileno-cianol 0,1%, 2mL de EDTA 0,5M), e submetendo à eletroforese em gel de agarose 3% corado com 3µL de Sybr® Safe (Invitrogen). A eletroforese ocorreu em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) a uma corrente de 100V por aproximadamente 30 minutos. A visualização foi realizada através da luz ultravioleta.

O produto da PCR foi sequenciado pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard* (Applied Biosystems) e o mesmo iniciador reverso da PCR. As reações foram submetidas à eletroforese em capilar utilizando o sequenciador automático ABI Prism® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem). As sequências foram então submetidas na forma de cromatografia e posteriormente e analisadas utilizando o programa BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999).

RESULTADOS

A média de idade dos pacientes de meningioma desse estudo foi $47,88 \pm 16,3511$, com uma proporção de mulheres:homens de 4:1. Das 25 amostras analisadas, 23 (92%) eram meningioma benignos de grau I e apenas 2 (8%) atípicos de grau II.

A porcentagem de sítios CpG metilados e não metilados para cada um dos 22 genes nas duas amostras analisadas pelo ensaio de PCR de metilação de DNA são mostradas na Tabela 1. O gene *RASSF1A* apresentou-se metilado em 16,73% e 63,66% dos sítios CpGs analisados na amostra de meningioma de grau I e grau II, respectivamente. O gene *RUNX3* se apresentou metilado apenas na amostra de grau II em 52,88% dos sítios CpG analisados. Os outros genes apresentaram uma baixa porcentagem de metilação dos seus sítios CpG.

Por sequenciamento direto, foram analisados 17 sítios CpG na região promotora do gene *CDKN2B* e nenhum deles apresentava-se metilado (Figura 1).

DISCUSSÃO

Na busca de novos genes candidatos cuja inativação por metilação possa estar envolvida na tumorigênese em meningiomas, encontramos dois genes hipermetilados na amostra do presente trabalho, *RASSF1A* e *RUNX3*.

O gene *RUNX3* está associado com a via de sinalização TGF- β . No entanto, o papel desse gene na parada do ciclo celular e na apoptose permanece desconhecido. Metilação desse gene foi descrita em diversos tumores, como câncer gástrico, fígado, laringe, pulmão, mama, próstata e do endométrio (Bae & Choi, 2004; Kim *et al.*, 2004). *RUNX3* se apresentou metilado em 16,73% dos sítios CpG do meningioma de grau I analisado e em 63,66% dos sítios metilados do meningioma de grau II no presente estudo, sendo este o primeiro a sugerir metilação do *RUNX3* em meningiomas de graus I e II. Em um estudo com 98 tumores cerebrais de grau III (19 meningiomas), Avci *et al.* (2011) observaram metilação em 90,72% dos sítios CpG analisados, o que sugere um aumento da metilação de *RUNX3* com o aumento da malignidade desses tumores.

O gene *RASSF1A* é um gene supressor tumoral cuja proteína não possui atividade enzimática aparente, mas está envolvida em diversos processos biológicos, como regulação mitótica (Máthé, 2004), progressão no ciclo celular (Shivakumar *et al.*, 2002; Whitehurst *et al.*, 2008), apoptose (Matallanas *et al.*, 2007) e estabilidade genética (Vos *et al.*, 2004). Inativação de *RASSF1* por metilação tem sido associada à uma variedade de tumores esporádicos, como de pulmão, mama, renal, próstata, glioma, neuroblastoma e meduloblastoma (Agathangelou *et al.*, 2005; Donniger *et al.*, 2007).

RASSF1A se apresentou metilado em 52,88% dos sítios CpG metilados apenas na amostra de meningioma de grau II. Metilação aberrante desse gene em meningiomas foi documentado em dois trabalhos. Horiguchi *et al.* (2003) a encontraram em dois dos 12 meningiomas analisados, enquanto Nakane *et al.* (2007) encontraram em 14 das 40 amostras analisadas, com frequência estatisticamente significativa maior nos graus II e III, sugerindo que esse gene esteja envolvido na progressão tumoral.

Apesar de ser um fenômeno importante na tumorigênese em alguns tipos tumorais, como leucemias, tumores ependimais e carcinoma hepatocelular e de células escamosas de cabeça e pescoço, nenhum sítio CpG na região promotora do *CDKN2B* apresentou-se metilado na amostra estudada. Embora tenhamos utilizado uma metodologia diferente, uma vez que esse gene não constava no ensaio de PCR de metilação de DNA, nossos resultados

são apoiados pelos dados da literatura que relataram uma baixa frequência de hipermetilação desse gene em meningiomas em outras populações, variando de, 2% na população alemã (Boström *et al.*, 2001) a 4% na população chinesa (Liu *et al.*, 2005) e 5% na americana (Yin *et al.*, 2002). Assim, a inativação do gene *CDKN2B* pelo processo de hipermetilação parece não ser um evento essencial na tumorigênese ou progressão tumoral em meningiomas na população paraense.

A ausência de metilação na região promotora do *CDKN2B* encontradas no presente trabalho também foi encontrada por van Tilborg *et al.* (2008) em um estudo que investigava o padrão de metilação de 16 genes em 21 pacientes de meningioma anaplásico (grau III). A frequência de metilação nos genes alterados em seu trabalho foi *NF2* (5%), *CDNK2NC* (19%), *CDHI* (33%), *BRCA1* (29%) e *RBI* (29%). No nosso trabalho, os genes *CDHI* e *BRCA1*, presentes na placa utilizada, não se apresentaram metilados, sugerindo que a inativação por hipermetilação desses genes esteja associada a graus mais elevados de malignidade.

Estudos posteriores do padrão de metilação dos genes *RASSF1A* e *RUNX3* serão de grande importância para validação do papel dessas alterações nesses genes na iniciação e progressão dos meningiomas.

BIBLIOGRAFIA

Agathangelou, A.; Cooper, W.N. & Latif, F. (2005) Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research* 65(9):3497-3508.

Amatya, V.J.; Takeshima, Y. & Inai, K.(2004) Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Modern Pathology* 17(6):705-710.

Avci, Ç.B.; Susluer, S.Y.; Dodurga, Y.; Akalin, T.; Cogulu, O.; Dalbasti, T.; Oktar, N. & Gunduz. (2011) The emphasis of tumor suppressor genes and oncogenes in diagnosis and prognosis anaplastic brain tumors. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)* 28(4):563-580.

Arimondo, P.B.; Egger, G. & Tost, J. (2012) Epigenetics. *Biochimie* 94(11):2191-2192.

Bae, S.C. & Choi, J.K. (2004) Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 23(24):4336-4440.

Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics* 16(4):168-174.

Bird, A. (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447(24):396-398.

Borges, B.N.; Burbano, R.M.R. & Harada, M.L. (2013) Analysis of the methylation patterns of the *p16^{INK4A}*, *p15^{INK4B}*, and *APC* genes in gastric adenocarcinoma patients from a Brazilian population. *Tumor Biology*.

Böstrom, J.; Meyer-Puttlitz, B.; Wolter, M.; Blaschke, B.; Weber, R.G.; Lichter, P.; Ichimura, K.; Collins, V.P. & Reifenberger, G. (2001) Alterations of the tumor suppressor genes *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*), *P14^{ARF}*, *CDKN2B* (*p15^{INK4b}*), and *CDKN2C* (*p18^{INK4c}*) in atypical and anaplastic meningiomas. *American Journal of Pathology* 159(2):661-669.

Donninger, H.; Vos, M.D. & Clark, G.J. (2007) The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science* 120(18):3163-3172.

Esteller, M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427-5440.

Esteller, M. (2005) Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *Journal of Pathology* 205(2):172-180

Esteller, M. (2008) Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine* 358:1148-1159.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Holemon, H.; Korshunova, Y.; Ordway, J.M.; Bedell, J.A.; Citek, RW; Lakey, N.; Leon, J.; Finney, M.; McPherson, J.D. & Jeddloh, J.A. (2007) MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR. *Biotechniques* 43(5):683-693.

Horiguchi, K.; Tomizawa, Y.; Tosaka, M.; Ishiuchi, S.; Kurihara, H.; Mori, M. & Saito, N. (2003) Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 22(49):7862-7865.

Huidobro, C.; Fernandez, A.F. & Fraga, M.F. (2012) Aging epigenetics: Causes and consequences. *Molecular Aspects of Medicine*.

Kawamata, N.; Inagaki, N.; Mizumura, S.; Sugimoto, K.J.; Sakajiri, S.; Ohyanagi-Hara, M. & Oshimi, K. (2005) Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders. *European Journal of Haematology* 74:424-429.

Kim, T.Y.; Lee, H.J.; Hwang, K.S.; Lee, M.; Kim, J.W.; Bang, Y.J. & Kang, G.H. (2004) Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Laboratory Investigation* 84(4):479-484.

Liu, Y.; Pang, J.C.; Dong, S.; Mao, B.; Poon W.S. & Ng H. (2005) Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Human Pathology* 36:416-425.

Lomas, J.; Amiñoso, C.; Gonzalez-Gomez, P.; Alonso, M.E.; Arjona, D.; Lopez-Marin, I.; de Campos, J.M.; Isla, A.; Vaquero, J.; Gutierrez, M.; Sarasa, J.L.; Bello, M.J. & Rey, J.A. (2004) Methylation status of *TP73* in meningiomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148:148-151.

Louis, D.N.; Scheithauer, B.W.; Budka, H.; von Deimling, A.; Kepes, J.J. (2000) Meningiomas. In: Kleihues, P.; Cavenee, W.K.(ed). *Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System, WHO Classification of Tumors* Lyon: IARC Press: 176-184.

Matallanas, D.; Romano, D.; Yee, K.; Meissl, K.; Kucerova, L.; Piazzolla, D.; Baccarini, M.; Vass, J.K.; Kolch, W. & O'neill, E. (2007) RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Molecular Cell* 27(6):962-975.

Máthé, E. (2004) RASSF1A, the new guardian of mitosis. *Nature Genetics* 36(2):117-118.

Nakane, Y.; Natsume, A.; Wakabayashi, T.; Oi, S.; Ito, M.; Inao, S.; Saito, K & Yoshida, J. (2007) Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *Journal of Neurosurgery* 107(2):398-404.

Pérez-Magán, E.; Campos-Martín, Y.; Mur, P.; Fiaño, C.; Ribalta, T.; García, J.F.; Rey, J.A.; de Lope, A.R.; Mollejo, M. & Meléndez, B. (2012) Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(10):882-893.

Riemenschneider, M.J.; Perry, A. & Reifenberger, G. (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology* 5(12):1045-1054.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sandoval, J. & Esteller, M. (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development* 22(1):50-55.

Shivakumar, L.; Minna, J.; Sakamaki, T.; Pestell, R. & White, M.A. (2002) *Molecular and Cellular Biology* 22(12):4309-4018.

Van Tilborg, A.A.G.; Morolli, B.; Giphart-Gassler, M.; de Vries, A.; van Geenen, D.A.N.; Lurkin, I.; Kros, J.M. & Zwarthoff, E.C. (2006) Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *Journal of Pathology* 208:564-573.

Vos, M.D.; Martinez, A.; Elam, C.; Dallol, A.; Taylor, B.J.; Latif, F. & Clark, G.J. (2004) *Cancer Research* 64(12):4244-4250.

Whitehurst, A.W.; Ram, R.; Shivakumar, L.; Gao, B.; Minna, J.D. & White, M.A. (2008) The RASSF1A tumor suppressor restrains anaphase-promoting complex/cyclosome activity during the G1/S phase transition to promote cell cycle progression in human epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 28(10):3190-3197.

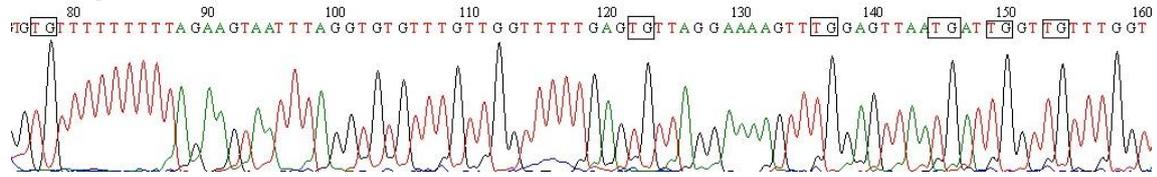
Yin, D.; Xie, D.; Hofmann, W.K.; Miller, C.W.; Black, K.L. & Koeffler, H.P. (2002) Methylation, expression, and mutation analysis of cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene* 21:8372-8378.

Tabela 1 – Porcentagem de sítios CpG não metilados e metilados em duas amostras de meningioma

Genes	Grau I		Grau II	
	N M	M	NM	M
<i>APC</i>	99.84%	0.16%	99.82%	0.18%
<i>BRCA1</i>	98.89%	1.11%	98.19%	1.81%
<i>CDH1</i>	99.71%	0.29%	97.26%	2.74%
<i>CDH13</i>	99.72%	0.28%	99.47%	0.53%
<i>CDKN2A</i>	99.87%	0.13%	98.62%	1.38%
<i>DAPK1</i>	99.95%	0.05%	99.99%	0.01%
<i>ESR1</i>	99.18%	0.82%	98.72%	1.28%
<i>FHIT</i>	99.94%	0.06%	99.93%	0.07%
<i>GSTP1</i>	99.91%	0.09%	99.67%	0.33%
<i>MGMT</i>	99.63%	0.37%	98.36%	1.64%
<i>MLH1</i>	99.98%	0.02%	99.88%	0.12%
<i>NEUROG1</i>	99.85%	0.15%	99.76%	0.24%
<i>PDLIM4</i>	99.43%	0.57%	98.74%	1.26%
<i>PTEN</i>	99.85%	0.15%	99.82%	0.18%
<i>RARB</i>	99.77%	0.23%	99.08%	0.92%
<i>RASSF1</i>	99.90%	0.10%	47.12%	52.88%
<i>RUNX3</i>	83.27%	16.73%	36.34%	63.66%
<i>SOCS1</i>	95.25%	4.75%	98.25%	1.75%
<i>TIMP3</i>	99.82%	0.18%	99.81%	0.19%
<i>TP73</i>	99.83%	0.17%	99.82%	0.18%
<i>VHL</i>	99.92%	0.08%	99.90%	0.10%
<i>WIF1</i>	99.92%	0.08%	99.76%	0.24%

NM: Não metilados, M: metilados

Figura 1- Eletroferograma mostrando a ausência de metilação nos sítios CpG (destacados na figura) analisados na região promotora do gene *CDKN2B* em pacientes com meningioma.



6. CONCLUSÕES GERAIS

- Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e meningioma. Esses resultados devem ser testados utilizando um número amostral maior de pacientes para confirmar se o genótipo TT não está associado com os pacientes de meningioma na população paraense.

- A hipermetilação da região promotora de miRNA124a2 e miRNA124a3 parece ser um evento frequente em meningiomas. Estudos posteriores são necessários para avaliar a sua importância como fator prognóstico e diagnóstico e como instrumento no tratamento desses tumores.

- Hipermetilação na região promotora dos genes *RUNX3* e *RASSF1A* parece ser um evento epigenético importante em meningiomas. Estudos posteriores do padrão de metilação desses genes serão de grande importância para validação do papel dessas alterações nesses genes na iniciação e progressão desses tumores.

- Nossos resultados apontam a importância das alterações epigenéticas na tumorigênese e progressão tumoral em meningiomas.

7. BIBLIOGRAFIA

Agathangelou, A.; Cooper, W.N. & Latif, F. (2005) Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research* 65(9):3497-3508.

Agirre, X.; Vilas, Zornoza, A.; Jimenez-Velasco, A.; Martin-Subero, J.I.; Cordeu, L.; Garate, L.; San Jose-Eneriz, E.; Abizanda, G.; Rodriguez-Otero, P.; Fortes, P.; Rifon, J.; Bandres, E.; Calasanz, M.J.; Martin, V.; Heiniger, A.; Torres, A.; Siebert, R.; Roman-Gomez, J. & Prosper, F. (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 69(10):4443-4453.

Amatya, V.J.; Takeshima, Y. & Inai, K. (2004) Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Modern Pathology* 17(6):705-710.

Ando, T.; Yoshida, T.; Enomoto, S.; Asada, K.; Tatematsu, M.; Ichinose, M.; Sugiyama, T.; Ushijima, T. (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *International Journal of Cancer* 124(10):2367-2374.

Arimondo, P.B.; Egger, G. & Tost, J. (2012) Epigenetics. *Biochimie* 94(11):2191-2192.

Ashton, K.A.; Meldrum, C.J.; McPhillips, M.L.; Kairupan, C.F. & Scott R.J. (2005) Frequency of the common MYH mutations (G382D and Y165C) in MMR mutation positive and negative HNPCC patients. *Hereditary Cancer In Clinical Practice* 3: 65-70.

Avci, Ç.B.; Susluer, S.Y.; Dodurga, Y.; Akalin, T.; Cogulu, O.; Dalbasti, T.; Oktar, N. & Gunduz. (2011) The emphasis of tumor suppressor genes and oncogenes in diagnosis and prognosis anaplastic brain tumors. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)* 28(4):563-580.

Aydemir, F.; Yurtcu, E.; Balci, T.B.; Sahin, F.I.; Gulsen, S. & Altinors, N. (2012) Identification of promoter region methylation patterns of *MGMT*, *CDKN2A*, *GSTP1*, and *THBS1* genes in intracranial meningiomas patients.

Ayres, M.; Ayres Jr, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. (2007) BioEstat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 5 ed. 290pp

Bae, S.C. & Choi, J.K. (2004) Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 23(24):4336-4440.

Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics* 16(4):168-174.

Beckman, R.A. & Loeb, L.A. (2005) Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Seminars in Cancer Biology* 15(6):423-435.

Behin, A.; Hoang-Xuan, K.; Carpentier, A.F. & Delattre, J.Y. (2003) Primary brain tumours in adults. *The Lancet* 361:323-331.

Bello, M.J.; Amiñoto, C.; Lopez-Marin, I.; Arjona, D.; Gonzalez-Gomez, P.; Alonso, E.; Lomas, J.; de Campos, J.M.; Kusak, M.E.; Vaquero, J.; Isla, A.; Gutierrez, M.; Sarasa, J.L. & Rey, J.A. (2004) DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathologica* 108:413-421.

Bethke, L.; Webb, E.; Murray, A.; Schoemaker, M.; Feychting, M.; Lönn, S.; Ahlbom, A.; Malmer, B.; Henriksson, R.; Auvinen, A.; Kiuru, A.; Salminen, T.; Johansen, C.; Christensen, H.C.; Muir, K.; McKinney, P.; Hepworth, S.; Dimitropoulou, P.; Lophatananon, A.; Swerdlow, A. & Houlston, R. (2008) Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 17(5):1195-

Bird, A. (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447(24):396-398.

Borges, B.N. (2010) Análise de polimorfismos genéticos e do padrão de hipermetilação como marcadores de tumores gástricos na população paraense. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, 219 pp.

Böstrom, J.; Meyer-Puttlitz, B.; Wolter, M.; Blaschke, B.; Weber, R.G.; Lichter, P.; Ichimura, K.; Collins, V.P. & Reifenberger, G. (2001) Alterations of the tumor suppressor genes *CDKN2A* (p16^{INK4A}), P14^{ARF}, *CDKN2B* (p15^{INK4b}), and *CDKN2C* (p18^{INK4c}) in atypical and anaplastic meningiomas. *American Journal of Pathology* 159(2):661-669.

Brown, R. & Strathdee, G. (2002) Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends in Molecular Medicine* 8(4): 43-48.

Buckner, J.C.; Brown, P.D.; O'Neill, B.P.; Meyer, F.B.; Wetmore, C.J. & Uhm, J.H. (2007) Central nervous system tumors. *Mayo Clinic Proceedings* 82(10): 1271-1286

Cahill, D.P.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. & Lengauer, C. (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in Cell Biology* 9(12):M57-60.

Calin, G.A.; Dumitru, C.D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Negrini, M.; Bullrich, F. & Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99(24):15524-15529.

Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews | Cancer* 6(11):857-866.

César, A.C.G.; Silva, A.E. & Tajara, E.H. (2002) Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arquivos de Gastroenterologia* 39:253-259.

Choi, S.W. & Mason, J.B. (2000) Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *The Journal of Nutrition* 130(2):129-132.

Chung, C.J.; Pu, Y.S.; Su, C.T.; Chen, H.W.; Huang, Y.K.; Shiue, H.S. & Hsueh, Y.M. (2010) Polymorphisms in one-carbon metabolism pathways genes, urinary arsenic profile, and urothelial carcinoma. *Cancer Causes & Control* 21(10):1605-1613.

Clément, G.; Bosman, F.T.; Fontolliet, C. & Benhattar, J. (2002) Monoallelic methylation of the APC promoter is altered in normal gastric mucosa associated with neoplastic lesions. *Cancer Research* 64:6867-6873.

Cordeiro, A.P.B.; Silva, F.P.E.; Pieczarka, J.C.; Nagamachi, C.Y.; Anselmo, N.P.; Brito, J.R.; Vasconcelos, D.S.; Liehr, T.; Weiser, A. & Oliveira, E.H.C. (2009) Comparative analysis of proliferative and genetic alterations in a primary chordoid meningioma and its recurrence using locus-specific probes and AgNOR. *Molecular Medicine Reports* 2:449-454.

Cowland, J.B.; Hother, C. & Grønbaek, K. (2007) MicroRNAs and cancer. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica* 115(10):1090-1106.

Da Costa, D.M.; de Lima, G.P.; Faria, M.H. & Rabenhorst, S.H. (2012) Polymorphisms of folate pathway enzymes (methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase) and their relationship with thymidylate synthase expression in human astrocytic tumors. *DNA and Cell Biology* 31(1):57-66.

Deng, G.; Kakar, S. & Kim, Y.S. (2011) MicroRNA-124a and microRNA-34b/c are frequently methylated in all histological types of colorectal cancer and polyps, and in the adjacent normal mucosa. *Oncology Letters* 2(1):175-180.

Donninger, H.; Vos, M.D. & Clark, G.J. (2007) The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science* 120(18):3163-3172.

Drevelgas, A. (2005) Extra-axial brain tumors. *European Radiology* 15:453-467.

Duthie, S.J.; Narayanan, S.; Brand, G.M.; Pirie, L. & Grant, G. (2002) Impact of folate deficiency on DNA stability. *The Journal of Nutrition* 132(8):2444S-2449S.

Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A. & Jones, P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990): 457-463.

Esquela-Kercher, A. & Slack, F.J. (2006) Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6:259-269.

Esteller, M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427-5440.

Esteller, M. (2005) Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *Journal of Pathology* 205(2):172-180

Esteller, M. (2008) Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine* 358:1148-1159.

Esteller, M. & Herman, J.G. (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology* 196:1-7.

Fearon, E.R. & Dang, C.V. (1999) Cancer genetics: tumor suppressor meets oncogene. *Current Biology: CB* 9(2):R62-65.

Feinberg, A.P.; Ohisson, R. & Henikoff, S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics* 7:21-33.

Feinberg, A.P. & Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer* 4(2):143-153.

Fernandez, A.F.; Huidobro, C.; Fraga, M.F. (2012) *De novo* DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both? *Trends in Genetics* 28(10):474-479.

Ford, C.E. & Hamerton, J.L. (1956) The chromosomes of man. *Nature* 178:1020-1026.

Frosst, P.; Blom, H.J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A.; Matthews, R.G.; Boers, G.J.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L.A.J.; van den Heuvel, L.P. & Rozen, R. (1995) A

candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10(1):111-113.

Furuta, M.; Kozaki, K.I.; Tanaka, S.; Arii, S.; Imoto, I.; Inazawa, J. (2010) miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31(5):766-776.

George, G.P. & Mittal, R.D. (2010) MicroRNAs: Potential biomarkers in cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 25(1):4-14.

Glynn, S.A. & Albanes, D. (1994) Folate and cancer: a review of the literature. *Nutrition and cancer* 22(2):101-119.

Goyette, P.; Sumner, J.S.; Milos, R.; Duncan, A.M.; Rosenblatt, D.S.; Matthews, R.G. & Rozen, R. (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics* 7:195-200.

Greaves, M & Maley, C.C. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381):306-313.

Grossel, M.J. & Hinds, P.W. (2006) From cell cycle to differentiation: an expanding role for cdk6. *Cell Cycle* 5(3):266-270.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Hanahan, D. & Coussens, L.M. (2012) Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3):309-322.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) Hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5):646-674.

Hassler, M.R. & Egger, G. (2012) Epigenomics of cancer – emerging new concepts. *Biochimie* 94(11):2219-2230.

Herman, J.G.; Graff, J.R.; Myöhänen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9821-9826.

Holemon, H.; Korshunova, Y.; Ordway, J.M.; Bedell, J.A.; Citek, RW; Lakey, N.; Leon, J.; Finney, M.; McPherson, J.D. & Jeddloh, J.A. (2007) MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR. *Biotechniques* 43(5):683-693.

Horiguchi, K.; Tomizawa, Y.; Tosaka, M.; Ishiuchi, S.; Kurihara, H.; Mori, M. & Saito, N. (2003) Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 22(49):7862-7865.

Hsu, T.C. (1952) Tissue culture studied on human skin. Some cytological features of the outgrowth of epithelial cells. *Texas Reports on. Biology and Medicine* 10:336.

Huidobro, C.; Fernandez, A.F. & Fraga, M.F. (2012) Aging epigenetics: Causes and consequences. *Molecular Aspects of Medicine*

Iacobuzio-Donahue, C.A. (2009) Epigenetic changes in cancer. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Diseases* 4:229-249.

INCA (2011) Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 98pp.

Izmirli, M. (2013) A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular Biology Reports* 40(1):625-637.

Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E. & Forman, D. (2011) Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal of Clinicians* 61(2):69-90.

Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review Genetic* 3(6):415-428.

Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128(4):683-692.

Kafadar, A.M.; Yilmaz, H.; Kafadar, D.; Ergen, A.; Zeybek, U.; Bozkurt, N.; Kaday, C. & Isbir, T. (2006) C677T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in meningiomas and high-grade gliomas. *Anticancer Research* 26(3B):2445-2450.

Karran, P. (1996) Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Seminars in Cancer Biology* 7(1):15-24.

Kawamata, N.; Inagaki, N.; Mizumura, S.; Sugimoto, K.J.; Sakajiri, S.; Ohyanagi-Hara, M. & Oshimi, K. (2005) Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders. *European Journal of Haematology* 74:424-429.

Khazamipour, N.; Noruzinia, M.; Fatehmanesh, P.; Keyhaneh, M. & Pujol, P. (2009) *MTHFR* promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Human Reproduction* 24(9):2361-2364.

Kim, T.Y.; Lee, H.J.; Hwang, K.S.; Lee, M.; Kim, J.W.; Bang, Y.J. & Kang, G.H. (2004) Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Laboratory Investigation* 84(4):479-484.

Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Molecular Cell Biology* 6:376-385.

Kim, Y.I. (1999) Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10(2):66-88.

Krupp, W.; Holland, H.; Koschny, R.; Bauer, M.; Schober, R.; Kirsten, H.; Livrea, M.; Meixensberger, J. & Ahnert, P. (2008) Genome-wide genetic characterization of an atypical meningioma by single-nucleotide array-based mapping and classical cytogenetics. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 184:87-93.

Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Yalcin, A.; Meyer, J.; Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 12(9):735-739.

Laird, P.W. (2005) Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics* 14:R65-76.

Lamszus, K.; Kluwe, L.; Matschke, J.; Meissner, H.; Laas, R. & Westphal, M. (1999) Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 110(2):103-110.

Lee, Y.S.; Dutta, A. (2009) MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology* 4:199-227.

Li, R.; Wang, R.; Li, Y.; Xianfeng, L.; Feng, Y.; Li, Y. & Jiang, C. (2013) Association study on MTHFR polymorphisms and meningioma in northern China. *Gene* 516(2):291-293

Liu, Y.; Pang, J.C.; Dong, S.; Mao, B.; Poon W.S. & Ng H. (2005) Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Human Pathology* 36:416-425.

Lomas, J.; Amiñoso, C.; Gonzalez-Gomez, P.; Alonso, M.E.; Arjona, D.; Lopez-Marin, I.; de Campos, J.M.; Isla, A.; Vaquero, J.; Gutierrez, M.; Sarasa, J.L.; Bello, M.J. & Rey, J.A. (2004) Methylation status of *TP73* in meningiomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148:148-151.

Lopez-Serra, P. & Esteller, M. (2012) DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 31:1609-1622.

Louis, D.N.; Scheithauer, B.W.; Budka, H.; von Deimling, A.; Kepes, J.J. (2000) Meningiomas. In: Kleihues, P.; Cavenee, W.K.(ed). Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System, WHO Classification of Tumors Lyon: IARC Press: 176-184.

Lu, J.; Getz, G.; Miska, E.A.; Alvarez-Saavedra, E.; Lamb, J.; Peck, D.; Sweet-Cordero, A.; Ebert, B.L.; Mak, R.H.; Ferrando, A.A.; Downing, J.R.; Jacks, T.; Horvitz, H.R.; Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043):834-838.

Lujambio, A.; Ropero, S.; Ballestar, E.; Fraga, M.F.; Cerrato, C.; Setien, F.; Casado, S.; Suarez-Gauthier, A.; Sanchez-Cespedes, M.; Git, A.; Spiteri, I.; Das, P.P.; Caldas, C.; Miska, E.; Esteller, M. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research* 67(4):1424-1429.

Macleod, K. (2000) Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:81-93.

Malumbres, M. & Carnero, A. (2003) Cell cycle desregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research*. 5:5-18.

Mark, K.; Levan, G. & Mitelman, F. (1972) Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 71:163-168.

Matallanas, D.; Romano, D.; Yee, K.; Meissl, K.; Kucerova, L.; Piazzolla, D.; Baccarini, M.; Vass, J.K.; Kolch, W. & O'Neill, E. (2007) RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Molecular Cell* 27(6):962-975.

Máthé, E. (2004) RASSF1A, the new guardian of mitosis. *Nature Genetics* 36(2):117-118.

Merrel, R.T. (2012) Brain Tumors. In *Conn's Current Therapy 2013*. Bope, E. & Kellerman, R. (eds) Saunders Elsevier, pp. 678-689.

Mirnezami, A.H.; Pickard, Z.; Zhang, L.; Primrose, J.N. & Packham, G. (2009) MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *European Journal of Surgical Oncology* 35(4):339-347.

Nakane, Y.; Natsume, A.; Wakabayashi, T.; Oi, S.; Ito, M.; Inao, S.; Saito, K & Yoshida, J. (2007) Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *Journal of Neurosurgery* 107(2):398-404.

NCI: National Cancer Institute (2000) National Institute of Neurological Disorders and Stroke: Report of the Brain Tumor Progress Review Group. <http://planning.cancer.gov/pdfprgreports/2000braintumor.pdf>

Nunes, F.; Shen, Y.; Niida, Y.; Beauchamp, R.; Stemmer-Rachaminov, A.O.; Ramesh, V.; Gusella, J. & MacCollin, M. (2005) *Cancer Genetics and Cytogenetics* 162:135-139.

Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica* 109(1):93-108

Paulovich, A.G.; Toczyski D.P. & Hartwell, L.H. (1997) When checkpoints fall. *Cell* 83:315-321.

Pérez-Magán, E.; Campos-Martín, Y.; Mur, P.; Fiaño, C.; Ribalta, T.; García, J.F.; Rey, J.A.; de Lope, A.R.; Mollejo, M. & Meléndez, B. (2012) Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(10):882-893.

Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. Review. *Journal of Neuro-Oncology*. 70: 183–202

Pietras, K. & Östman, A. (2010) Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research* 316(8):1324-1331.

Ponder, B.A.J. (2001) *Cancer Genetics*. *Nature* 411:336-341.

Prados, M.D.; Berger, M.S. & Wilson, C.B. (1998) Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. *CA: A Cancer Journal of Clinicians* 48 (6):331-360, 321.

Raizer, J. (2010) Meningiomas. *Current Treatment Options in Neurology* 12:360-368.

Riemenschneider, M.J.; Perry, A. & Reifenberger, G. (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology* 5(12):1045-1054.

Rodenhiser, D. & Mann, M. (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal* 174(3):341-348.

Roman-Gomez, J.; Agirre, X.; Jimenez-Velasco, A.; Arqueros, V.; Vilas-Zornoza, A.; Rodriguez-Otero, P.; Martin-Subero, I.; Garate, L.; Cordeu, L.; San Jose-Eneriz, E.; Martin, V.; Castillejo, J.A.; Bandres, E.; Calasanz, M.J.; Siebert, R.; Heiniger, A.; Torres, A. & Prosper, F. (2009) Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 27(8):1316-1322.

Rosenberg, N.; Murata, M.; Ikeda, Y.; Opare-Sem, O.; Zivelin, A.; Geffen, E. & Seligsohn, U. (2002) The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *The American Journal of Human Genetics* 70(3):758-762.

Ruttledge, M.H.; Sarrazin, J.; Rangaratnam, S.; Phelan, C.M.; Twist, E.; Merel, P.; Delattre, O.; Thomas, G.; Nordenskjöld, M.; Collins, V.P.; Dumanski, J.P. & Rouleau, G.A. (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nature Genetics* 6:180-184.

Saito, Y.; Liang, G.; Egger, G.; Friedman, J.M.; Chuang, J.C.; Coetzee, G.A.; Jones, P.A. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9(6):435-443.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sandoval, J. & Esteller, M. (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development* 22(1):50-55.

Sanger, F.; Nichlen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5468.

Schneider, J.A.; Rees, D.C.; Liu, Y.T. & Clegg, J.B. (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *The American Journal of Human Genetics* 62(5):1258-1260.

Shivakumar, L.; Minna, J.; Sakamaki, T.; Pestell, R. & White, M.A. (2002) *Molecular and Cellular Biology* 22(12):4309-4018.

Shrubsole, M.J.; Gao, Y.T.; Cai Q.; Shu, X.O.; Dai, Q., Hébert, J.R.; Jin, F. & Zheng, W. (2004) MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13:190-196.

Sieber, O.; Heinemann, K. & Tomlinson, I. (2005) Review: Genomic stability and tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 15(1):61-66.

Silber, J.; Lim, D.A.; Petritsch, C.; Persson, A.I.; Maunakea, A.K.; Yu, M.; Vandenberg, S.R.; Ginzinger, D.G.; James, C.D.; Costello, J.F.; Bergers, G.; Weiss, W.A.; Alvarez-Buylla, A. & Hodgson, J.G. (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BioMed Central Medicine* 6:14.

Sirachainan, N.; Wongruangsri, S.; Kajanachumpol, S.; Pakakasama, S.; Visudtibhan, A.; Nuchprayoon, I.; Lusawat, A.; Phudhicharoenrat, S.; Shuangshoti, S.; Hongeng, S. (2008)

Folate pathway genetic polymorphisms and susceptibility of central nervous system tumors in Thai children. *Cancer Detection and Prevention* 32:72-78.

Suzuki, H.; Maruyama, R.; Yamamoto, E. & Kai, M. (2012) DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular Oncology* 6:567-578.

Tahara, E. (2004) Genetic pathways of two types of gastric cancer. *Mechanics of carcinogenesis: Contributions of Molecular Epidemiology*. 2004; 157:327-349.

Tamura, G. (2002) Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histology and Histopathology* 17:323-329.

Tse, J.Y.M.; Ng, H.K.; Lo, K.W.; Chong, E.Y.; Lam, P.Y.; Ng, E.K.; Poon, W.S. & Huang, D.P. (1998) Analysis of cell cycle regulators: p16INK4A, pRB, and CDK4 in low – and high-grade meningiomas. *Human Pathology* 29(11):1200-1207.

Turek-Plewa, J. & Jagodzinski, P.P. (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10(4):631-647

Umar, A.; Dunn, B.K. & Greenwald, P. (2012) Future directions in cancer prevention. *Nature Reviews Cancer* 12(12):835-848.

Van Tilborg, A.A.G.; Morolli, B.; Giphart-Gassler, M.; de Vries, A.; van Geenen, D.A.N.; Lurkin, I.; Kros, J.M. & Zwarthoff, E.C. (2006) Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *Journal of Pathology* 208:564-573.

Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36:131-149.

Vos, M.D.; Martinez, A.; Elam, C.; Dallol, A.; Taylor, B.J.; Latif, F. & Clark, G.J. (2004) *Cancer Research* 64(12):4244-4250.

Wang, Z.; Yao, H.; Lin, S.; Zhu, X.; Shen, Z.; Lu, G.; Poon, W.S.; Xie, D.; Lin, M.C. & Kung, H. (2013) *Cancer Letters* 331(1):1-10.

Ward, L.S. (2002) Entendendo o Processo Molecular da Tumoriênese. *Arquivos Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia* 46(4):351-360.

Weber, R.G.; Boström, J.; Wolter, M.; Baudis, M.; Collins, P.; Reifenberger, G. & Lichter, P. (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proceedings of National Academy Science of United States of America* 94:14719-14724.

Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146

Whitehurst, A.W.; Ram, R.; Shivakumar, L.; Gao, B.; Minna, J.D. & White, M.A. (2008) The RASSF1A tumor suppressor restrains anaphase-promoting complex/cyclosome ctivity during the G1/S phase transition to promote cell cycle progression in human epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 28(10)3190-3197.

Wilting, S.M.; van Boerdonk, R.A.; Henken, F.E.; Meijer, C.J.; Diosdado, B.; Meijer, G.A.; le Sage, C.; Agami, R.; Snijders, P.J.& Steenbergen, R.D.(2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of has-miR-124 in cervical cancer. *Molecular Cancer* 9:167.

Wrobel, G.; Roerig, P.; Kokocinski, F.; Neben, K.; Hahn, M.; Reifenberger, G. & Lichter, P. (2005) Microarray-based gene expression profilng of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *International Journal of Cancer* 114:249-256.

Yin, D.; Xie, D.; Hofmann, W.K.; Miller, C.W.; Black, K.L. & Koeffler, H.P. (2002) Methylation, expression, and mutation analysis of cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene* 21:8372-8378.

Yoshika, F.K.N.; raújo, A.G.; Tavella, M.H.; Hamoy, I.G. & Guerreiro, J.F. (2006) Prevalence of hereditary risk factors for thrombophilia in Belém, Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology* 29(1):38-40.

Zang, K.D. & Singer, H. (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85.

Zhi, F.; Zhou, G.; Wang, S.; Shi, Y.; Peng, Y.; Shao, N.; Guan, W.; Qu, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Yang, C.; Wang, R.; Wu, S.; Xia, X. & Yang, Y. (2013) A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. *International Journal of Cancer* 132(1):128-136.

Zhu, J. & Yao, X. (2007) Use of DNA Methylation for Cancer Detection and Molecular Classification. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40:135-141.

Zimmerman, A.L. & Wu, S. (2011) MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Letters* 2011:10-19.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A **Universidade Federal do Pará**, em colaboração com o **Hospital Ofir Loyola**, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam o desenvolvimento de tumores do sistema nervoso, através da identificação das alterações genéticas associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido neoplásico removido por cirurgia e trará novas informações sobre aspectos genéticos relacionados a este quadro clínico.

Você está sendo admitido (a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de algum tumor de sistema nervoso e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à esta enfermidade. Parte do material retirado será encaminhada para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido tumoral para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com o **Prof. Dr. Nilson P. Anselmo**, através do telefone 3201-7558.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.

Belém, de de

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome:

RG:

ANEXO 2

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA – INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



Universidade Federal do Pará

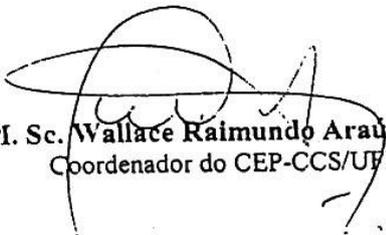
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CCS/UFPA

A: Prof. NILSON PRAIA ANSELMO

Carta: 025/06 CEP-CCS/UFPA

Senhor Pesquisador temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa: "Caracterização Citogenética e Molecular de Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense", protocolo nº: 029/06 CEP-CCS/UFPA, foi apreciado e aprovado parecer *Ad-referendum*, em 30 de março de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até o dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA situado no Campus universitário do Guamá no Complexo de sala de aula do CCS – sala 13 (Altos), (em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia).

Atenciosamente,



Prof. M. Sc. Wallace Raimundo Araújo dos Santos
Coordenador do CEP-CCS/UFPA