



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

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS
ENVOLVENDO OS CROMOSSOMOS 1p E 22 EM MENINGIOMAS
DE BAIXO GRAU

GEANNY PEREIRA DA SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira.

Belém – Pará
2015



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

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS
ENVOLVENDO OS CROMOSSOMOS 1p E 22 EM MENINGIOMAS
DE BAIXO GRAU

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientador

Profa. Dra. Margarida Maria C. de Lima
Professora da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Profa. Dra. Ciane Martins de Oliveira
Professora da Faculdade Metropolitana da Amazonia (FAMAZ)
Membro

Profa. Dra. Fernanda Andreza de P.Lott Figueiredo
Professora do Centro Universitário do Pará (CESUPA)
Membro

Belém – Pará
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Silva, Geanny Pereira da, 1982-

Análise de alterações no número de cópias envolvendo os cromossomos 1p e 22 em meningiomas de baixo grau / Geanny Pereira da Silva. - 2015.

Orientador: Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Meningioma. 2. Cérebro Tumores. 3. Cromossomos humanos Anomalias. I. Título.

CDD 22. ed. 616.99491

“Toda a psicologia humana é uma finíssima camada que repousa sobre uma guerra genética de bilhões de anos”.

Willian Eduardo Marques

Dedico este trabalho a minha família, onde encontro paz, força, conforto e principalmente amor, pois sem amor os demais não subsistiriam.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Edivaldo de Oliveira, pela imensa oportunidade de permitir participar do seu grupo, pela enorme paciência e seus ensinamentos em todas as áreas da vida. (Obrigada (MESMO) de todo meu coração).

Não poderia deixar de mencionar o Prof. Dr Ricardo Gunski (primeiro pai científico), pelo seu apoio, ajuda e com conselhos sábios. Serei sempre grata!!

À minha família pelo enorme apoio. Em especial minha mãe Terezinha que mesmo me encorajando para vir, em seu interior gostaria que eu ficasse, mesmo assim me deu apoio e força sem igual. (Mãe, te amo!! Obrigada por acreditar em mim e pelas suas orações e pelo apoio financeiro).

Ao meu Pai que mesmo distante sei que sempre pensou em mim, e da forma dele me deu força pra chegar até aqui.

Aos meus amigos de Tocantins que não são poucos que me apoiaram com palavras de coragem, conselhos e até mesmo puxões de orelhas, né!!!: Marina (Nunca vou esquecer o que fizeste por mim), Heidi, Aline, Thammy, Lucymara, Marcos (Bahia) e Welta.

A Artêmia amiga e Irmã, por suas orações e conversas sem igual, que sempre tivemos, não poderia esquecê-la, pois estava comigo no momento que recebi a notícia que iria trilhar esse novo caminho e nem saberíamos o que iria vir pela frente e mesmo distante suas orações me fortaleceram. (Amiga, obrigada por você sempre estar ao meu lado).

A Marcella Tagliarini, pois tu és um anjo de pessoa, linda por fora e principalmente por dentro com esse coração de tamanha bondade que é privilégio de poucos e tu foste uma das privilegiada por Deus, mesmo nesse pouco tempo em que convivemos tu foste importante pra mim mesmo distante, estará em minhas orações.

Ao meu amigo Samir e família por ter me adotado recebendo-me em sua casa nas inúmeras vezes que precisei; que Deus possa recompensar todo o trabalho que dei a vocês.

Em especial ao Michel Platini, responsável técnico pelos experimentos de array-CGH, e ao Fábio Estumano pela paciência e ensinamentos de laboratórios que me deste e por auxiliar na discussão, sem vocês eu não teria conseguido. Muito Obrigada!!!!

Ao Dr. Marcio Nunes e ao Clayton Lima (Centro de Inovação Tecnológica, IEC), pela possibilidade de utilização da plataforma de array-CGH. E a todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do IEC pela força e por me fazerem sorrir quando estava triste e por momentos agradabilíssimos que tivemos pelo aprendizado e pela equipe unida que somos. Que continuemos assim por um longo tempo. Pois é essa união que faz o grupo se crescer a cada dia mais profissionalmente.

Finalmente, ao CNPq, pelo apoio financeiro nesses 2 anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
<i>ABSTRACT</i>	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS: CÂNCER	1
1.2 CÂNCER DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL	2
1.3 CLASSIFICAÇÃO	6
1.4 MENINGIOMAS	9
I.4.1 Considerações Gerais	9
I.4.2 Classificação	10
I.4.3 Epidemiologia	14
I.5 INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA	15
I.6 CITOGENÉTICA E CÂNCER	17
I.6.1 Hibridização Genômica Comparativa Micro-Arranjos (aCGH)	19
I.6.2 Alterações Genômicas em Meningiomas	22
I.7 OBJETIVOS	26
I.7.1 GERAL	26
I.7.2 ESPECÍFICOS	26
II. MATERIAL E MÉTODOS	27
II.1 ASPECTOS ÉTICOS	27
II.2 AMOSTRAS	27

II.3 EXTRAÇÃO DO DNA	28
II.4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA	28
II.4.1 Digestão Enzimática e Marcação das Amostras	28
II.4.2 Purificação	29
II.4.3 Hibridização	30
II.4.4 Lavagem	32
II.4.5 Escaneamento e Extração De Dados	32
II.4.6 Análise Dos Dados	32
III RESULTADOS	34
III.1 ALTERAÇÕES ENVOLVENDO 1p	35
III.2 ALTERAÇÕES ENVOLVENDO CROMOSSOMO 22	37
III.3 OUTRAS ALTERAÇÕES RECORRENTES	37
IV. DISCUSSÃO	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	60
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Evolução e crescimento de células cancerígenas.....	1
Figura 2- Gráfico sobre evolução da taxa de mortalidade por câncer no Brasil entre 1990 e 2009.....	2
Figura 3- Esquema de cérebro e cerebelo com corte coronal do cérebro.....	3
Figura 4- Células da glia ou Neuroglia compreendendo vários tipos celulares que estão presentes no tecido nervoso ao lado dos neurônios.....	4
Figura 5- Células de Meningiomas atípico.....	13
Figura 6- Células de meningioma anaplásico.....	14
Figura 7- Esquema demonstrando as etapas no processo de hibridização.....	20
Figura 8- Representação da Técnica de CGH-array.....	31
Figura 9- Esquema demonstrando as etapas no processo de hibridização.....	33
Figura 10- Análise de alterações quantitativas envolvendo o cromossomo 1, através de aCGH.....	36
Figura 11- Análise de alterações quantitativas envolvendo o cromossomo 22, através de aCGH.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de Neoplasias do sistema nervoso.....	8
Tabela 2- Classificação dos meningiomas de acordo com seus subtipos histológicos e grau.....	11
Tabela 3- Caracterização das amostras analisadas conforme sexo, idade e histocompatibilidade.....	27
Tabela 4- Análise geral da variação do número de cópias identificada nas amostras....	34
Tabela 5- Relação das CNV envolvendo o braço curto do cromossomo 1 (1p). Com exceção de 1p36.32, em vermelho, todas as CNV foram deleções.....	35
Tabela 6- Relação da Variação do Número de Cópias envolvendo o par 22. Com exceção de 22q11.22, em vermelho.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

- a-CGH – Hibridização Genômica Comparativa em Micro-Arranjos.
- A-T – Ataxia Telangiectasia
- AluI- Enzima de restrição que reconhece os sítios AG -AT
- BSA- Albumina de Soro Bovino Fetal
- CCS - Comitê de Ética do Centro de Ciências e Saúde
- CSN- Câncer do Sistema Nervoso
- CIN - Instabilidade Cromossômica
- CNV- Variação do Número de Cópias
- CGH- Hibridização Genômica Comparativa
- dUTP- Diphosphatase
- dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
- DNA- Ácido Desoxirribonucléico
- FISH- Hibridização *in situ* por Fluorescência (do inglês *Fluorescence in situ hybridization*)
- FFPE- Fragmento Fixado em Formol e Embebido em Parafina
- FASE G1- Fase do Ciclo Celular onde as organelas são sintetizadas
- FASE S- Fase do Ciclo Celular onde ocorre a síntese de DNA
- HBV- Vírus da Hepatite B
- HPV- Papiloma vírus humano
- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
- hCDC4- Proteína Human F-box atua no reparo do Ciclo Celular
- INCA- Instituto Nacional do Câncer
- ISCA- Normas Internacionais para Citogenômica Arrays
- IFISH- FISH Nuclear ou Interfásico
- LCTC-IEC- Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas.

LOH- Perda de Heterozigosidade

LRC- Fluxo Cefalorraquidiano

MAD2- Mitotic Arrest Deficient 2

NF2- Gene Neurofibromatose Tipo 2

pRb- Proteína Retinoblastoma

RP- Receptor de Progesterona

TP53- O Gene Proteína 53 (*Tumor Protein 53*)

UFPA - Universidade Federal do Pará

WHO- Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

RESUMO

Os meningiomas constituem o segundo tipo de tumor primários cerebral mais comum, originando-se nas meninges que revestem o cérebro e a medula espinhal. Possuem crescimento lento, sendo encontrados com maior frequência no SNC. Na maioria dos casos são benignos, porém há também casos de meningiomas classificados como malignos. No nível citogenético, os meningiomas são os tumores mais bem estudados em humanos, e os resultados demonstraram que as alterações mais frequentes nesse tipo de tumor tem sido a perda de uma cópia do cromossomo 22 e a deleção do braço curto do cromossomo 1. Essas alterações têm sido associadas ao processo de gênese tumoral, por serem características de tumores de baixo grau, principalmente deleções envolvendo o cromossomo 22. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a recorrência de alterações no número de cópias (CNAs) envolvendo os cromossomos 1p e 22 em meningiomas de grau I e II, além de averiguar a existência de outros rearranjos recorrentes, por meio da análise genômica comparativa de alta resolução (array-CGH). As amostras analisadas foram provenientes de oito pacientes. Todas as amostras apresentaram ganhos e perdas de diversos segmentos cromossômicos. Com exceção de um caso, todos os outros apresentaram em maior ou menor grau mais deleções do que ampliações. A perda de segmentos localizados em 1p foi observada em todas as amostras analisadas. Algumas CNAs apresentaram recorrência em até seis dos oito casos. O cromossomo 22 apresentou CNAs em todas as amostras, mas a monossomia total só foi observada em duas das oito amostras. A análise global de CNAs em todas as amostras demonstrou que, apesar de alterações em 1p e 22 serem as modificações mais observadas, como o esperado, outras regiões genômicas também se apresentaram modificadas em várias amostras, apontando para um possível envolvimento dessas modificações com o processo de tumorigênese e progressão tumoral. Algumas delas, como alterações nos pares 9, 12 e 17, já foram observadas em outros trabalhos e foram correlacionadas com meningiomas atípicos e anaplásicos. Dessa forma, os dados obtidos apontam para a existência de um número maior de alterações genômicas em meningiomas de baixo grau, refutando, em parte, a afirmação de que esses tumores são caracterizados por um pequeno número de alterações quando comparados com tumores de malignidade maior. No entanto, o fato desses tumores apresentarem as alterações que são clássicas dos meningiomas, mesmo os benignos, como as deleções em 1p e em 22q, pode ser um indício de que estas alterações devem estar ligadas com os eventos iniciais destes meningiomas, como já foi sugerido diversas vezes por outros autores. Concluindo, essas alterações permanecem como marcadores importantes em meningiomas, e as relações dessas e outras CNAs com a resposta a diferentes tratamentos e ocorrência de recidivas devem ser o próximo passo após a caracterização citogenômica baseada em array-CGH.

Palavras-Chave: Meningiomas, Alterações Cromossômicas, a-CGH, Deleções, Duplicações

ABSTRACT

Meningiomas are the second most common type of primary brain tumor, originating in the meninges covering the brain and spinal cord. They show slow growth, and are found more often in the CNS, being benign in most case, although there are also cases of meningiomas classified as malignant. At the cytogenetic level, meningiomas are the most well studied tumors in humans: studies in CNS tumors have shown that most cases had chromosomal abnormalities, and the most common alterations in this type of tumor are the loss of one copy of chromosome 22 and deletion of the short arm of chromosome 1. These alterations have been associated with the tumorigenesis process, because they are found mostly in low-grade tumors, particularly deletions involving chromosome 22. Thus, the aim of this study was to analyze the occurrence of copy number alterations (CNAs) involving chromosomes 1p and 22 meningiomas grade I and II, and in addition to verifying the existence of other recurrent rearrangements through the application of high resolution comparative genomic hybridization (array - CGH). Tumor samples were collected from eight patients. All samples showed gains and losses of various chromosomal segments. Except for one case, all others showed, in different degrees though, more deletions than amplifications. Loss of 1p segments was observed in all samples. Some CNAs were recurrent, being found up to six out of the eight cases. Pair 22 showed CNV in all samples, but the total monosomy was observed in only two of the eight samples. The global analysis of CNAs in all samples showed that, although changes 1p and 22 were the most frequent observed alterations, as expected, other genomic regions had also alterations in various samples, indicating a possible involvement of these modifications in the process of tumorigenesis and tumor progression. For instance, alterations in pairs 9, 12 and 17, have been observed in other studies and were correlated with atypical and anaplastic meningiomas. Our data indicate the existence of a larger number of genomic alterations in low-grade meningiomas, disagreeing partly with the assumption that these tumors are characterized by a small number of changes, usually involving pair 22 and, less frequently, loss of 1p. However, the fact that these tumors present alterations that are classically found in meningiomas, even benign, such as deletions in 1p and 22q, may be an indication that these changes must be linked with the early events of origin in meningiomas, as already suggested several times by other authors. In conclusion, these alterations remain important markers in meningiomas, and the relationships of these and other CNAs with the response to different treatments and recurrences should be the next step after cytogenomic characterization based on array-CGH has been completed.

Key Words: Meningiomas, Chromosomal Alterations, a-CGH, Deletions, Duplications.

I INTRODUÇÃO

I.1 MENINGIOMAS

I.1.1 Considerações Gerais

Meningiomas constituem o segundo tipo de tumor primários cerebral mais comum, originando-se nas meninges que revestem o cérebro e cordão espinhal, possuem crescimento lento encontrado com maior frequência no SNC (AHMADI *et al* 2006), sendo na maioria dos casos benignos e podendo ser curados com a retirada total do tumor (ROSENBLUM *et al.* 2004). São responsáveis por 13-26% de todos os tumores primários intracranianos, com uma incidência anual estimada em 6 novos casos a cada 100.000 indivíduos (WROBEL *et al.*, 2005 ; ALEXIOU *et al.*, 2011). Além disso, em estudos baseados em autópsias, 2,3% dos indivíduos apresentavam meningiomas assintomáticos que não haviam sido diagnosticados, sugerindo que esse tipo de tumor seja mais comum do que é detectado clinicamente (LUSIS *et al.*, 2004).

No entanto, aproximadamente 9% a 22% dos pacientes possuem experiência de recorrência, dependendo da localização do tumor (AKEYSON *et al.*, 1996; WHITTLE *et al.* 2004). Embora a maioria destes tumores seja histologicamente benigna, alguns meningiomas apresentam sinais de malignidade, tais como vascularização acentuada, perda da estrutura organóide, figuras mitóticas, pleomorfismo nuclear, nucléolos proeminentes, necrose focal, ou infiltração adjacente ao cérebro (LOPEZ-GINES *et al.*,2004)

A classificação e graduação do meningiomas recebeu atenção especial na Conferência Internacional de Neuropatologistas (1999) a fim de oferecer informações adicionais sobre o comportamento de agressividade e predisposição à recorrência de cada subtipo, e quatro variáveis foram acrescentadas à análise: grau, subtipo histológico, índice proliferativo, e invasão cerebral (KLEUIUES *et al.*, 2002).

I.4.2 Classificação

Segundo a classificação da WHO os tumores das meninges são divididos de acordo com sua origem em: tumores das células meningoteliais, tumores mesenquimais, lesões melanocíticas primárias e outras neoplasias relacionadas às meninges (Tabela 01) (LOUIS *et al.*, 2007). Além disso, são classificados em três diferentes graus de malignidade (I, II e III), possuindo, assim, significância prognóstica importante (LOUIS *et al.*, 2007; ALEXIOU *et al.*, 2011).

- Grau I: São meningiomas benignos (85-90%), que incluem meningotelial, fibroso (fibroblástica), transicional, angiomatoso, microcístico secretor, rico em linfoplasmático ou metaplásico. A maioria das categorias dentro do grupo benigno não possui nenhum significado prognóstico.
- Grau II: Alto risco de recorrência e agressividade (5-10%), inclui meningiomas de células claras, cordóide e tipos histológicos atípicos possuindo alto potencial de hiper celularidade e formação de células pequenas.
- Grau III: É o grupo maligno comporta se de forma mais agressiva (3-5%), incluindo papilar; meningioma rabdoide e anaplásico. Apresentam uma alta frequência de invasão no cérebro, recorrência e metástases. (LOUIS *et al.*, 2007, ALEXIOU *et al.*, 2011).

Apesar dos meningiomas, normalmente, apresentarem características histológicas benignas e a retirada total estar associada com prognóstico favorável, os tumores atípicos ou anaplásicos podem ser encontrados em 6% dos casos e estão associados com risco aumentado de recorrência. Meningiomas atípicos ou anaplásicos são ligeiramente mais comuns em homens. Além disso, meningiomas atípicos e malignos, quando surgem, são mais comuns na sexta e sétima décadas de vida, respectivamente. O termo

atípico é usado para qualquer padrão de arquitetura, porém as características histológicas específicas são a taxa de pelo menos quatro figuras mitóticas por campo, alto potencial mitótico e hiper celularidade, lençóis arquitetônico, e formação de células pequenas (ALEXIOU *et al.*, 2011).

A maioria dos meningiomas obtém diversos receptores durante a tumorigênese. Estudos de receptores hormonais foram realizados principalmente por meio de imunohistoquímica. Quase 61% dos meningiomas possuem Receptores de Progesterona (RP) que desempenham um papel importante no crescimento do meningioma. Expressão de RP está associada com o grau histológico benigno, menor frequência de recorrência e, sobretudo, prognóstico favorável (ALEXIOU *et al.*, 2011).

Tabela1. Classificação dos meningiomas de acordo com seus subtipos histológicos e grau segundo a WHO(2000).

Meningioma Típico (Grau I)- Baixo risco de recorrência e agressividade
Meningioma Meningotelial
Meningioma Fibroblástico
Meningioma Transicional
Meningioma Psamomatoso
Meningioma Angiomatoso
Meningioma Microcístico
Meningioma Secretor
Meningioma Linfoplasmocítico
Meningioma Metaplásico
Meningioma Atípico (Grau II)- Alto risco de recorrência e agressividade
Meningioma Atípico
Meningioma de células claras
Meningioma cordóide
Meningioma Atípico (Grau II)- Alto risco de recorrência e agressividade (maligno)
Meningioma Rabdóide
Meningioma Papilar
Meningioma Anaplásico

Meningiomas de grau I, geralmente, seguem um curso clínico benigno, onde os três padrões mais comuns dentro deste grupo são os tumores meningoteliais, fibrosos e de transição (WHITTLE *et al.*, 2004). Meningiomas anaplásicos, papilares e rabdóides são classificados como meningiomas de grau III e se comportam de uma forma muito agressiva (MITELMAN *et al.*, 1995). Estes tumores apresentam uma alta frequência de invasão no cérebro, alto índice de recorrência e metástases (ALEXIOU *et al.*, 2011).

Eun *et al.*, (2009) demonstraram que houve um aumento significativo na frequência de complexidade cariotípica com respeito ao aumento de grau pela WHO entre tumores de grau I (63,3%), havendo uma tendência para aumentar entre os de grau II (80,0%) e III (71,4%), no entanto de acordo com a WHO, houve um aumento significativo nas frequências de complexidade cariotípica entre os graus I , II e III.

Observou-se que tumores de alto grau são mais propensos a demonstrar anomalias citogenéticas e complexidade do que tumores de baixo grau, o que levou à sugestão de que o cariótipo reflete a natureza biológica do tumor. Mais de 80% dos meningiomas benignos são das classes meningeal, transicional ou fibroblástica (LANTOS *et al.*, 2002). Os meningiomas benignos têm bom prognóstico, embora possa haver recorrência do tumor em 7-20% dos casos, mesmo quando retirados completamente (PITTELLA *et al.*, 2006).

Meningiomas atípicos mostram algumas características de malignidade histológica, como a presença de quatro ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento, ou o encontro de três dos seguintes aspectos histológicos: alta celularidade, aumento da relação núcleo/citoplasma, nucléolos proeminentes, arranjo arquitetural mais difuso e necrose (Figura 1). Estes tumores representam 4,7-7,2% dos meningiomas, com índices de recidiva de até 50% após cinco anos de tratamento (FROSH *et al.*, 2005; PITTELLA *et al.*, 2006).

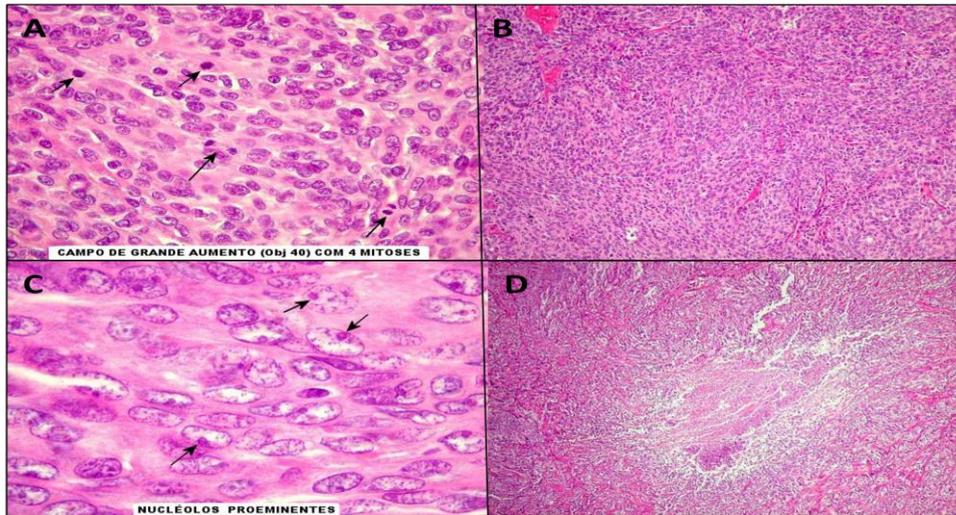


Figura 1: Células de Meningiomas atípico, (A) células com 4 mitose por campos, (B) hiper celularidade, (C) núcleos proeminentes, (D) células com necrose. <http://anatpat.unicamp.br/nptmeningioma18a.html>.

Os meningiomas anaplásicos ou malignos são tumores que apresentam características histológicas de malignidade, que são a presença de 20 ou mais mitoses por campos de grande aumento e aspectos citológicos semelhantes aos sarcomas, carcinomas ou melanomas. É constituído por extensas áreas de células de aspecto ‘rabdóide’, ou seja, células arredondadas ou poligonais, com citoplasma abundante, róseo, contendo uma área nodular, lembrando uma inclusão eosinofílica, que desloca o núcleo para a periferia. Geralmente, o núcleo tem cromatina frouxa e nucléolo proeminente. Os meningiomas anaplásicos constituem 1,7-2,8% dos meningiomas (KLEIHUES *et al.*, 1993; KLEIHUES & CAVENENCE, 2000; PITTELLA *et al.*, 2006; LOUIS *et al.*, 2007).

O meningioma do tipo anaplásico pode ser a apresentação inicial do meningioma ou a recorrência do meningioma benigno. As causas podem ser tanto exógenas, incluindo fatores como traumas, vírus e irradiação craniana, quanto endógenas, ocasionadas por ação de hormônios ou fatores de crescimento (FALAVIGNA *et al.*, 2003) (Figura 2)

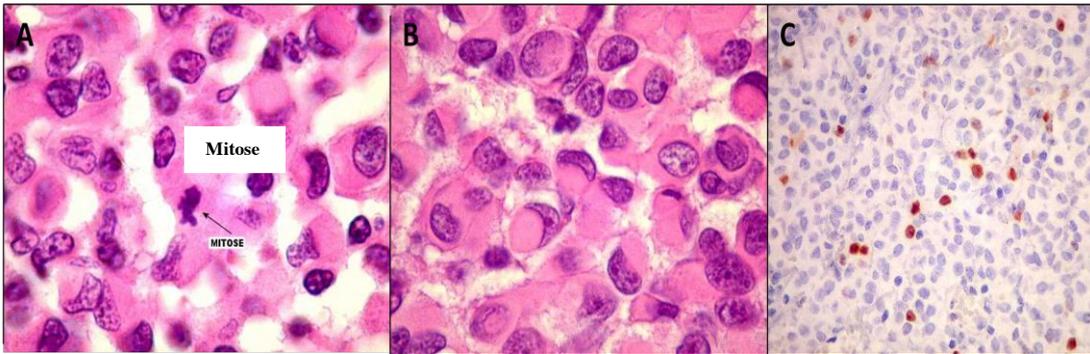


Figura 2: Células de meningioma anaplásico, (A) mitoses comumente visível, (B) Citoplasma róseo com 'corpúsculo rabdóide' que indenta o núcleo, (C) Alto índice de marcação por MIB-1 (Ki-67) células com positividade em 10-15% dos núcleos. <http://anatpat.unicamp.br/textomeningiomas-tipos2.html#criterioanaplasico>

I.4.3 Epidemiologia

Meningiomas intracranianos afetam mais freqüentemente as mulheres do que homens, tendo uma relação de 2:1, respectivamente e geralmente ocorrem em pacientes entre 50 e 60 anos. A incidência anual por 100.000 pessoas varia de 2 a 7, para as mulheres e 1 a 5 para os homens (ALEIXIOU *et al.*, 2011). Estima-se que 2-3% da população pode ter meningioma incidental assintomática (WHITTLE *et al.*, 2004). Meningiomas são os tumores mais comum decorrente da dura-máter do cérebro em qualquer sítio, mais comumente a abóbada do crânio e da base do crânio (KLEIHUES *et al.* 2002). Embora muitos meningiomas tenham uma etiologia desconhecida, vários fatores de risco foram identificados, entre os quais a radiação ionizante, traumatismo craniano, hormônios e outros sítios de ligação e de fatores genéticos (GU *et al.*, 2009).

Em indivíduos com idade entre 18 e 49 anos, o risco de meningioma é aumentado 3-4 vezes em pessoas quando possuem histórico familiar de tumores cerebrais benignos, de câncer de mama ou melanoma, comparados com aqueles que não possuem relato de histórico familiar (HILL *et al.*, 2004).

Os meningiomas atípicos e anaplásicos são mais comuns entre homens; em crianças e adolescentes meningiomas são igualmente raros em ambos os sexos, porém

apresentam uma tendência ao desenvolvimento de subtipos mais agressivos, geralmente associados a síndromes hereditárias, como Neurofibromatose Tipo 2, síndrome de Gorlin e síndrome de Cowden (MAROSI *et al.*, 2008). Por apresentar uma evolução crônica, observam-se sintomas do tipo cefaléia, vômitos, alteração mental e sintomas focais, como convulsão e hemiplegia que é a paralisia de toda metade do corpo. O fator prognóstico mais importante é a localização do tumor, suas características histológicas e a extensão por retirada cirúrgica, no entanto o quadro clínico depende da área encefálica comprometida (FALAVIGNA *et al.*, 2003).

I.2 INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

O termo Instabilidade Cromossômica (CIN) refere-se a uma taxa aumentada de ganho e/ou perda de cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos devido as divisões mitóticas aberrantes. Essas alterações são comuns à maioria dos tumores malignos e resultam em desequilíbrio no número de cromossomos (aneuploidia), que pode aumentar a taxa de Perda de Heterozigosidade (LOH) e de ampliações de oncogenes e/ou levar a taxa de inativação de genes supressores tumorais (KOPS *et al.*, 2005; MICHOR *et al.*, 2005).

Alguns genes que levam à CIN foram identificado, incluindo: 1) *hBUB1* e *MAD2*, cujos produtos participam do controle de *checkpoints*; 2) *BRCA 1* e *BRCA2* que atuam no reparo e recombinação do DNA, controle dos *checkpoints* do ciclo celular, e transcrição; e 3) *hCDC4* – envolvidos na regulação dos *checkpoints* da fase G1-S do ciclo celular por marcar proteínas para destruição (YERDEN *et al.*, 2002; RAJAGOPALAN *et al.*, 2004; BECKMAN & LOEB, 2005; MICHOR *et al.*, 2005).

Existem consideráveis evidências do envolvimento da CIN na iniciação, progressão, aquisição de resistência à drogas, habilidade de formar metástases de

malignidades humanas, sendo visível a existência em síndromes de CIN hereditárias, incluindo a Ataxia telangiectasia (A-T), a quebra Nijmegen, as Síndrome de Bloom e Werner, bem como a anemia de Fanconi, todas conhecidas pela predisposição a vários tipos de cânceres (MASUDA & TAKAHASHI, 2002; LI *et al.*, 2009).

I.3 CITOGENÉTICA E CÂNCER

O papel dos rearranjos cromossômicos adquiridos na oncogênese e progressão tumoral estão bem estabelecidos, conforme exemplificado anteriormente ao se explicar a ocorrência de instabilidade cromossômica (CIN). Estas alterações são múltiplas e diversas e os produtos destes genes rearranjados desempenham um papel essencial na transformação e crescimento de células cancerosas (BERNHEIM *et al.*, 2010). A observação de que muitos genes afetados por rearranjos cromossômicos estavam envolvidos em algumas fases críticas no crescimento celular, desenvolvimento ou sobrevivência tem aumentado o interesse sobre como os rearranjos alteram a função desses genes alvo, resultando em uma melhor compreensão dos mecanismos de formação de alterações cromossômicas e o seu papel no desenvolvimento do câncer (BONASSI *et al.*, 2004).

Aberrações cromossômicas numéricas são comumente observadas em tumores humanos. Presume-se que estas alterações são os eventos genéticos de maior prevalência dentre mais de vinte mil tumores sólidos analisados (SEN, 2000). Neste contexto, análises citogenéticas de tumores objetivam identificar alterações cromossômicas a partir das quais os estudos moleculares de genes envolvidos na patogênese do câncer possam ser desenvolvidos (PATEL *et al.*, 2000).

A determinação de alterações genéticas é de extrema importância em câncer, uma vez que, a determinação de um grande número de alterações em cânceres em

progressão pode ser a chave pra quantificar a extensão da heterogeneidade de um tumor e avaliar pacientes quanto ao risco ou desenvolvimento a resistências a drogas (LOEB *et al.*, 2008).

As análises citogenéticas clássicas de tumores obtiveram considerável incremento nos anos 90, em função das análises de banda de alta resolução e da hibridização *in situ* (FISH). O aprimoramento tecnológico da hibridização *in situ* deu origem à multiplex FISH e à Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization-CGH*), e mais recentemente ao *array-CGH*, idealizadas para realizar análises rápidas e precisas do genoma completo de tumores, em experimentos únicos (PATEL *et al.*, 2000; PINKEL & ALBERTSON, 2005).

Os métodos de citogenética molecular são necessários para detectar defeitos submicroscópicos, como microdeleções e microduplicações (PATEL *et al.*, 2000; PINKEL & ALBERTSON, 2005). A aplicação de FISH em células interfásicas (iFISH) permite análise do aumento ou diminuição do número de cromossomos, através do uso de sondas centroméricas ou sondas controle de cópia única, e pode evidenciar alterações cromossômicas presentes em uma pequena porcentagem de células que poderiam escapar da detecção, caso somente técnicas de bandeamento fossem utilizadas (TIBILETTI, 2004).

I.3.1 Hibridização Genômica Comparativa em Micro-Arranjos (aCGH)

Alterações no número de cópias do DNA (CNAs) correspondem a uma das muitas causas de modificação da expressão e função de genes. Algumas variantes são encontradas entre indivíduos normais (geralmente chamadas de CNVs, ou variações no número de cópias), enquanto outras participam na causa de várias doenças (CNAs). Por exemplo, muitos defeitos no desenvolvimento humano são causados por perda ou ganho

de cromossomos ou segmentos cromossômicos, que ocorrem na formação do gameta ou logo após a fertilização, e as alterações nas dosagens do DNA observadas nas células somáticas frequentemente estão envolvidas nos cânceres (PINKEL & ALBERTSON, 2005).

A hibridização genômica comparativa (CGH) foi o primeiro método eficiente para um escaneamento geral do genoma em busca de alterações no número de cópias de segmentos do DNA. De uma forma geral, em um experimento de CGH, o DNA-teste e o DNA padrão são isolados, marcados por diferentes fluorocromos, e hibridizados em uma metáfase. Em uma variante da técnica, com maior resolução, a hibridização ocorrem em um micro-arranjo (a-CGH). A intensidade relativa dos sinais de hibridização são proporcionais ao número de cópias das sequências, no DNA-teste e no DNA padrão, e sua mensuração nos indica a ocorrência de ganhos e perdas genômicas no DNA-teste (PINKEL & ALBERTSON, 2005) (Figura 3).

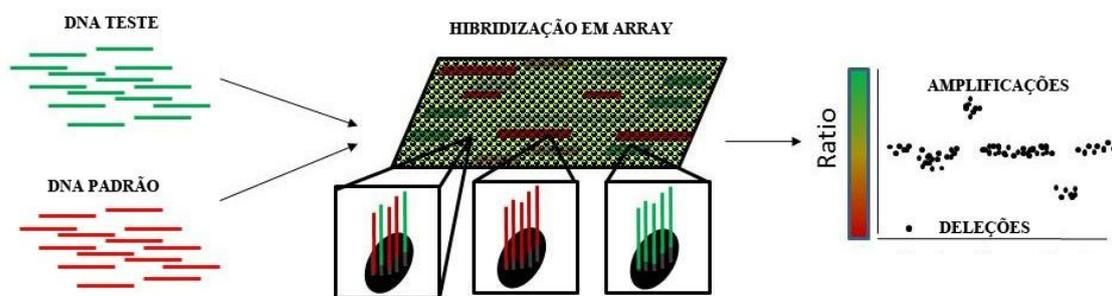


Figura 3: Representação esquemática do processo de aCGH: extração e marcação do DNA alvo e DNA padrão, co-hibridização em lâmina com micro-arranjo, escaneamento e interpretação de dados (Adaptado de <http://compbio.cs.brown.edu/projects/nbc/>).

Assim, a análise por citogenética clássica pode detectar alterações cromossômicas visíveis, como uma banda cromossômica extra, mas pequenos ganhos e perdas no genoma podem não ser observados. Por outro lado, a aCGH é uma ferramenta

de alta resolução para detecção de ganhos e perdas de DNA nos cromossomos, anteriormente indetectáveis (ROGATTO & RAINHO, 2004).

As limitações do aCGH são a incapacidade de detectar mutações pontuais, rearranjos balanceados (inversões e translocações), ganhos e perdas em regiões não cobertas pelo *array*, alguns mosaicismos somáticos e alterações de ploidia. Este procedimento pode ser realizado com DNA extraído de biópsia tumoral fresca ou congelada, de células em cultura e linhagens celulares, ou até mesmo de fragmento fixado em formol e embebido em parafina (FFPE), ou seja, alterações na quantidade de material genético podem ser determinadas em amostras que poderiam não ser mais analisáveis por citogenética clássica (AFFYMETRIX, 2012).

A aplicação de aCGH em amostras extraídas de vários tipos de tumores tem revelado recorrentes ganhos e perdas cromossômicas que não foram detectadas por análise citogenética tradicional, sendo que as aplicações prospectivas e retrospectivas em amostras tumorais permitem a realização de estudos correlativos, com possível identificação de indicadores de diagnóstico e prognóstico destas patologias (BUFFART *et al.*, 2009).

O conhecimento de regiões deletadas ou amplificadas podem ter uso imediato em diagnóstico clínico e prognóstico. Os microarranjos desenhados para leucemia linfocítica tinham regiões-alvo que permitiram a associação entre alterações genômicas e respostas a tratamentos (SCHWAENEN *et al.*, 2009). Associações com variações no número de cópias de regiões genômicas já foram associadas com o prognóstico em diversos tipos tumorais, tais como próstata, mama, gástrico e linfomas (PARIS *et al.*, 2004; WEISS *et al.*, 2004; CALLAGY *et al.*, 2005).

I.3.2 Alterações Genômicas em Meningiomas

Estudos realizados em tumores de SNC demonstraram que a maioria desses tumores apresentavam anormalidades cromossômicas (51,8%), sendo que um grande percentual eram tumores das meninges Grau I e Grau II (WHO) (EUN *et al.*, 2009). De fato, no nível citogenético, os meningiomas são os tumores mais bem estudados em humanos. As alterações mais frequentes tem sido a perda de uma cópia do cromossomo 22 e a deleção do braço curto do cromossomo 1 (ZANG, 2001; NUNES *et al.*, 2005; EUN *et al.*, 2009). Anormalidades cromossômicas numéricas e/ ou estruturais foram observadas também nos cromossomos 5, 6, 7, 19 (EUN *et al.*, 2009).

Os meningiomas de Grau I mostram ou um cariótipo normal, ou a monossomia do cromossomo 22, sendo que essa alteração chegou a um porcentagem de 54,5% dos tumores das meninges (ZANG, 2001; EUN *et al.*, 2009). Outras alterações também foram encontradas envolvendo os cromossomos X, 1, 12 e 20, em percentuais menores em relação ao cromossomo 22. Estudos recentes têm mostrado que o perfil genético molecular dos meningiomas esporádicos com perda do cromossomo 22 são portadores de mutações no gene da neurofibromatose tipo 2 (NF2) em 22q12.2 . O locus da neurofibromatose 2 (NF2) é inativado em 50-60% dos meningiomas esporádicos, porém a base genética de meningiomas com NF2 inativo permanece obscura, visto que processos mais comuns de inativação, como a metilação, foram observados em apenas uma pequena porcentagem de amostras (LIU *et al.*, 2005; HANSSON *et al.*, 2007; EUN *et al.*, 2009).

Nunes *et al.*, (2005) analisaram 63 meningiomas e encontraram 34 com monossomia do 22, sendo observado que 8 apresentaram perda de heterozigidade (LOH) em NF2 (23%), todos os 23 restantes mostraram uma diminuição no número de cópias de quase todos os segmentos do 22.

Deleções no cromossomo 1p são o segundo tipo de alteração mais frequente em meningiomas. A frequência aumenta de acordo com o grau histológico. Usando “*dual-color FISH*” (utilização de duas sondas marcadas com fluorocromos diferentes), ISHINO *et al.* (1998) apoiaram a existência de genes supressores de tumor em 1p associados à alta recorrência e progressão maligna em meningiomas. Nagasaka *et al.* (2010), analisaram a ocorrência da translocação 1p/19q por FISH e relataram que as anormalidades genômicas de 1p/19q foram significativamente diferentes em meningiomas atípicos de baixo grau. Todos os meningiomas atípicos apresentavam deleções do cromossomo 1, enquanto que apenas 1/16 de meningiomas de baixo grau tiveram monossomia 1p. Assim, a identificação dessas aberrações genéticas pode ser útil para classificação de meningiomas e possível identificação de tumores com alto risco de recorrência. Além disso, a monossomia 1p é a aberração mais frequentemente associada à progressão de meningiomas (BELLO *et al.*, 1994).

Análises citogenéticas mais detalhadas, baseadas em CGH, mostraram que de 30% a 50% dos meningiomas tem cariótipos normais, sem evidências para a monossomia do cromossomo 22. Dentre esses, mesmo em casos analisados no nível molecular, não foram encontrados microdeleções. Nesses casos, uma mutação primária independente do cromossomo 22 deve ser considerada (ZANG, 2001).

Apesar dos meningiomas serem na maioria das vezes benignos, são tumores únicos quando se consideram seus aspectos citogenéticos, biológicos e clínicos. Por isso, diferentes metodologias focando efeitos genéticos e epigenéticos que podem ser relevantes no entendimento da origem dos meningiomas vem sendo aplicadas por diferentes grupos. Entretanto, os dados acumulados nas últimas três décadas indicam que talvez um pequeno número de alterações moleculares são decisivas na origem e

progressão desses tumores, enquanto muitos outros podem apresentar influência modular sobre o seu efeito (ZANG, 2001).

O uso de *microarrays* associado ao estudo de expressão gênica mostraram que os três graus de meningiomas reconhecidos pela WHO (benigno, atípico e maligno) podem ser classificados em dois grupos moleculares, que poderiam ser denominados “de baixa proliferação” e “de alta proliferação”. Enquanto todos os tumores benignos analisados se enquadraram no grupo de baixa proliferação e os malignos no grupo de alta proliferação, os meningiomas atípicos foram distribuídos em um grupo ou no outro. As análises de aCGH mostraram que perdas de 6q, 9p, 13 e 14 foram exclusivas dos meningiomas de alta proliferação. Além disso, foram identificados genes que distinguiram os dois grupos propostos, sendo que o ganho de marcadores de proliferação celular e a perda de componentes da via de sinalização do fator de crescimento beta foram os principais mecanismos moleculares que distinguem esses dois grupos (CARVALHO *et al.*, 2007).

Um outro estudo que aplicou aCGH comparou 73 casos de meningioma, classificados como esporádicos solitários (64), esporádicos múltiplos (5) e familiares múltiplos (4). Os tumores esporádicos solitários revelaram rearranjos genômicos consistentes com pelo menos dois mecanismos de iniciação tumoral – uma relacionada com a perda do cromossomo 22 e consequente perda do supressor tumoral NF2, e outra sem a perda desse cromossomo. Os tumores com perda do cromossomo 22 foram agrupados em dois subgrupos, que se adequaram quase perfeitamente aos graus histológicos benignos (WHO grau I) e malignos (WHO graus II e III), com esses últimos apresentando desequilíbrios genômicos em uma escala maior ($P < 0.001$). Os meningiomas esporádicos múltiplos mostraram desequilíbrios genômicos em uma frequência compatível àquela observada em tumores solitários. Em contraste, os

meningiomas familiares múltiplos não apresentaram desequilíbrio genômico (perdas e ganhos), apoiando a idéia de que esses tumores apresentam mecanismos de origem diferentes dos demais (SHEN *et al.*, 2009).

O conjunto de dados apresentados mostram que as análises por aCGH tem grande importância como complemento das análises histopatológicas para diagnóstico e classificação de meningiomas. Além disso, podem auxiliar na distinção de subgrupos dentro daqueles reconhecidos nas classificações histopatológicas, com implicações clínicas em potencial para análise do comportamento desses tumores e o risco de recorrência em outros membros da família (CARVALHO *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2009).

I.4 OBJETIVOS

I.4.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de alterações no número de cópias (CNAs) afetando os cromossomos 1p e 22 em oito meningiomas por meio da análise por array-CGH.

I.4.2 Objetivos Específicos

- Verificar a concordância de perdas em ganhos recorrentes entre as amostras.
- Verificar a existência de perdas e ganhos que possam ser associadas ao tipo histopatológicos, sexo ou idade dos pacientes.
- Comparar os dados obtidos com aqueles da literatura para apoiar ou refutar padrões genômicos associados a meningiomas.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (UFPA) sob o número CCS-UFPA 029/06 (Anexo I). As amostras só foram coletadas de casos em que o paciente ou seu responsável assinou o termo de Consentimento Livre e Esclarecido Anexo II).

II.2 AMOSTRAS:

As amostras (biópsias) utilizadas foram obtidas durante procedimento cirúrgico de ressecção total ou parcial de meningiomas ocorridas no Hospital Ophir Loyola, no período de 2006 a 2009. Uma vez coletadas, as amostras foram transportadas em meio de cultura RPMI para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas (LCTC-IEC). Em condições adequadas, cada biópsia foi dividida em duas partes equivalentes, sendo uma para preservação e posterior extração de DNA e a outra para cultivo celular. A identificação histológica das amostras foi feita a partir de dados do laudo histopatológico expedido posteriormente pelo departamento responsável do referido hospital. A caracterização das amostras encontra-se na Tabela 2.

Tabela2. Caracterização das amostras analisadas nesse trabalho.

Registro	SEXO	IDADE	HISTOPATOLÓGICO
CSN 02	MACULINO	-	MENINGIOMA TRANSICIONAL
CSN 06	MASCULINO	-	MENINGIOMA ATÍPICO
CSN10	FEMININO	36 ANOS	MENINGIOMA MENINGOTELIOMATOSO
CSN 16	FEMININO	61 ANOS	MENINGIOMA
CSN 29	FEMININO	61 ANOS	MENINGIOMA TRANSICIONAL
CSN 36	FEMININO	52 ANOS	MENINGIOMA TRANSICIONAL
CSN 66	FEMININO	46 ANOS	MENINGIOMA MENINGOTELIOMATOSO
CSN 83	FEMININO	73 ANOS	MENINGIOMA PSAMATOSO

II.3 EXTRAÇÃO DO DNA

Primeiramente as amostras de tecidos tumorais estocadas no freezer -86°C foram retiradas, maceradas e posteriormente homogeneizadas em tampão de extração e digeridos com proteinase K. Após esta digestão o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol, para então ser dissolvido com tampão TE e conservado em freezer (SAMBROOK *et al.*, 1989). As amostras foram quantificadas e sua qualidade testada em gel de agarose (1%) a fim de se observar a integridade das mesmas. Somente amostras não fragmentadas foram utilizadas no estudo.

II.4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA

Para o aCGH foi utilizada a matriz *SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K*, da Agilent. Essa matriz contém cerca de 120.000 sondas de aCGH, cobrindo o total de clones do consórcio ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*, disponível em <http://isca.genetics.emory.edu>).

II.4.1 Digestão Enzimática e Marcação das Amostras

O DNA deveria estar composto de fragmentos entre 200 a 500 pb aproximadamente., o que foi obtido pela digestão enzimática. Para isso, o DNA extraído foi diluído na proporção de 1µg/22µl de água ultra-pura. O mesmo foi feito com o DNA de referência (*Human Reference DNA Male or Female* da Agilent), disponibilizado no kit. As amostras foram fragmentadas através de digestão por enzimas de restrição, e marcadas com Cy5-dUTP, enquanto o DNA de referência foi marcado com Cy3-dUTP, utilizando-se o kit *SureTag Complete DNA Labeling*, seguindo-se as instruções do fabricante:

1. Em cada tubo contendo o DNA genômico diluído, foram adicionados 5,8µL do *Digestion Master Mix*, composto de Água ultra-pura, Tampão de Restrição Enzimática 10X, BSA e das enzimas Alu I e Rsa I.

2. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas, e logo em seguida a 65°C, por 20 minutos.

Após a fragmentação do DNA das amostras, o próximo passo foi a marcação do mesmo, também seguindo-se as instruções do fabricante:

1. 5µl de um *primer* randômico foram adicionados à mistura.
2. Incubaram-se os tubos a 95°C por 3 minutos, e depois em gelo por 5 minutos.
3. Foram acrescentados 21 µL do *Labeling Master Mix*, composto por água ultrapura, tampão de reativação 5x, 10x dNTPs, Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP e Exo-Klenow.
4. Após misturar, pipetou-se os materiais gentilmente, para serem em seguida incubados a 37°C por duas horas, e depois a 65°C, por 10 minutos.

II.4.2 Purificação

Após a marcação, o material foi purificado. Para isto, acrescentaram-se 430 µl de 1xTE (pH8.0) em cada amostra, sendo então transferidas para colunas de purificação e centrifugadas a 14000x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e mais 480 µl de 1xTE (pH 8.0) foram adicionados. Após a segunda centrifugação, a coluna foi invertida em tubo coletor novo de 2 ml e centrifugada a 1000 x g para obtenção do material purificado. Este foi quantificado em Nanodrop para a medição das concentrações do DNA e dos marcadores, que foram utilizados, junto com a medição do volume final da amostra, para a estipulação dos valores de **atividade específica** dos marcadores e **rendimento** do processo de marcação. Estes valores indicaram o funcionamento das etapas anteriores e definiram a escolha dos pares de amostras (DNA de referência e teste) a serem formadas (os valores entre estas devem ser semelhantes).

II.4.2 Hibridização

Antes do processo de Hibridização, as amostras foram pré-tratadas.

- 71 μ L do *Hybridization Master Mix* (composto de tampão de hibridização, agente de bloqueio 10X concentrado e Cot-1 DNA) foram adicionados em cada amostras (DNA de referência + DNA da amostra a ser testada) e estas foram incubadas a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferidos para um banho maria a 37°C, por 30 minutos. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 6000x g e então estava pronto para a hibridização.

O processo de hibridização seguiu as instruções do fabricante, a saber:

1. Em uma lamínula específica, despejaram-se 100 μ l da solução em cada um dos poços.
2. A lâmina com microarranjos foi encaixada sobre a lamínula, e as duas unidades – lâmina e lamínula – foram fixadas com uma base de fixação.
3. Manualmente foi ajustada uma braçadeira para manter o conjunto bem fixado.
4. O conjunto foi movido verticalmente para que o líquido espalhasse uniformemente sobre cada arranjo e para que possíveis bolhas de ar não se fixem nessa região.
5. O conjunto foi colocado em uma câmara de hibridização e mantida a 65°C por 24 horas, com uma rotação de 20 rpm.

O protocolo encontra-se ilustrado na figura 5.

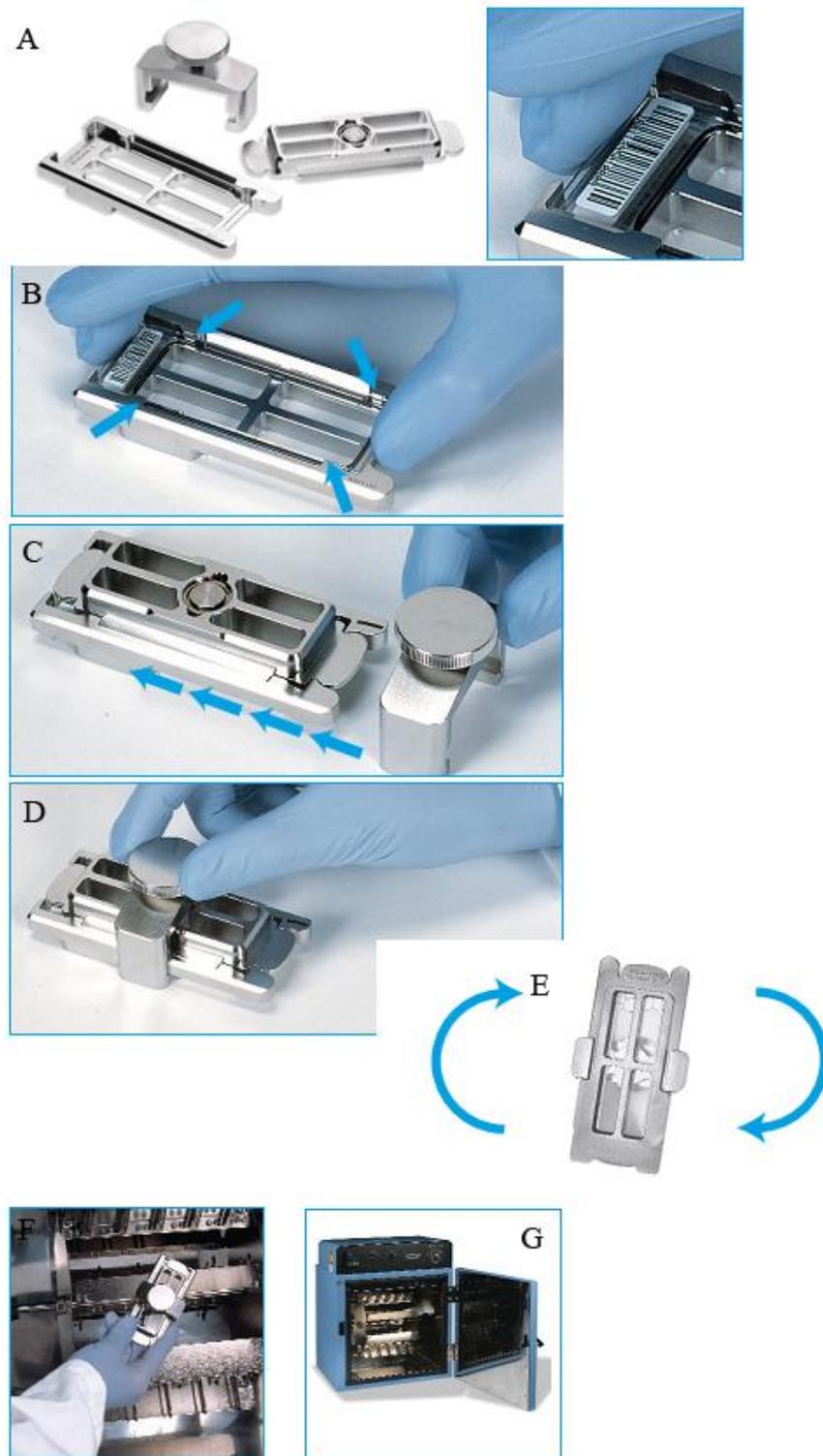


Figura 5: Durante a etapa de hibridização. (A) Peças utilizadas para incubação das lâminas em forno durante a hibridização. (B) Lâmina e lamínula devem ser devidamente encaixadas na base de metal, para em seguida (c) ser vedada e (D) apertada com ajuda de uma braçadeira.(E) O conjunto é girado para se observar a presença de bolhas fixas.(F) O conjunto é então acoplado a um suporte giratório dentro do forno (G), que gira a 20rpm em uma temperatura de 65°C, por 24h. (Fonte: [HTTP://www.agilent.com](http://www.agilent.com))

II.4.3 Lavagem

A lavagem dos microarranjos foi feita em ambiente pobre em ozônio (figura XXX). Primeiramente, o conjunto “lâmina+lâminula” foi retirado da base de fixação e mergulhadas em tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) para ajudar na dissociação. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo novamente tampão de lavagem 1 sob agitação com magneto, por cinco minutos. Tanto a dissociação como a primeira lavagem foram feitas à temperatura ambiente. As lâminas foram então transferidas para uma terceira cuba contendo o tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*), em agitação com magneto, à temperatura de 37°C. Finalmente, as lâminas foram cobertas com uma lâminula protetora de ozônio e encaixadas em um estojo para proceder para a próxima etapa (Figura 6 A-D).

II.4.4 Escaneamento e Extração de Dados

Os estojos com os microarranjos foram devidamente encaixados em cassetes do scanner. O *scanner* tem a capacidade para até 48 estojos de cada vez. Após o encaixe e fechamento da tampa, o controle e obtenção das imagens do *scanner* foram feitos com o uso do software *Feature Extraction v10.10*, que extrai imagens com a extensão.TIFF a partir dos microarranjos (Figura 6 E-F).

II.4.5 Análise dos Dados

As imagens obtidas pelo escaneamento, transformadas em arquivos de imagem com extensão .TIFF, foram analisadas com auxílio do software *Agilent CytoGenomics 2.7.8*, no modo multianálise, que permite uma análise simultânea das amostras.

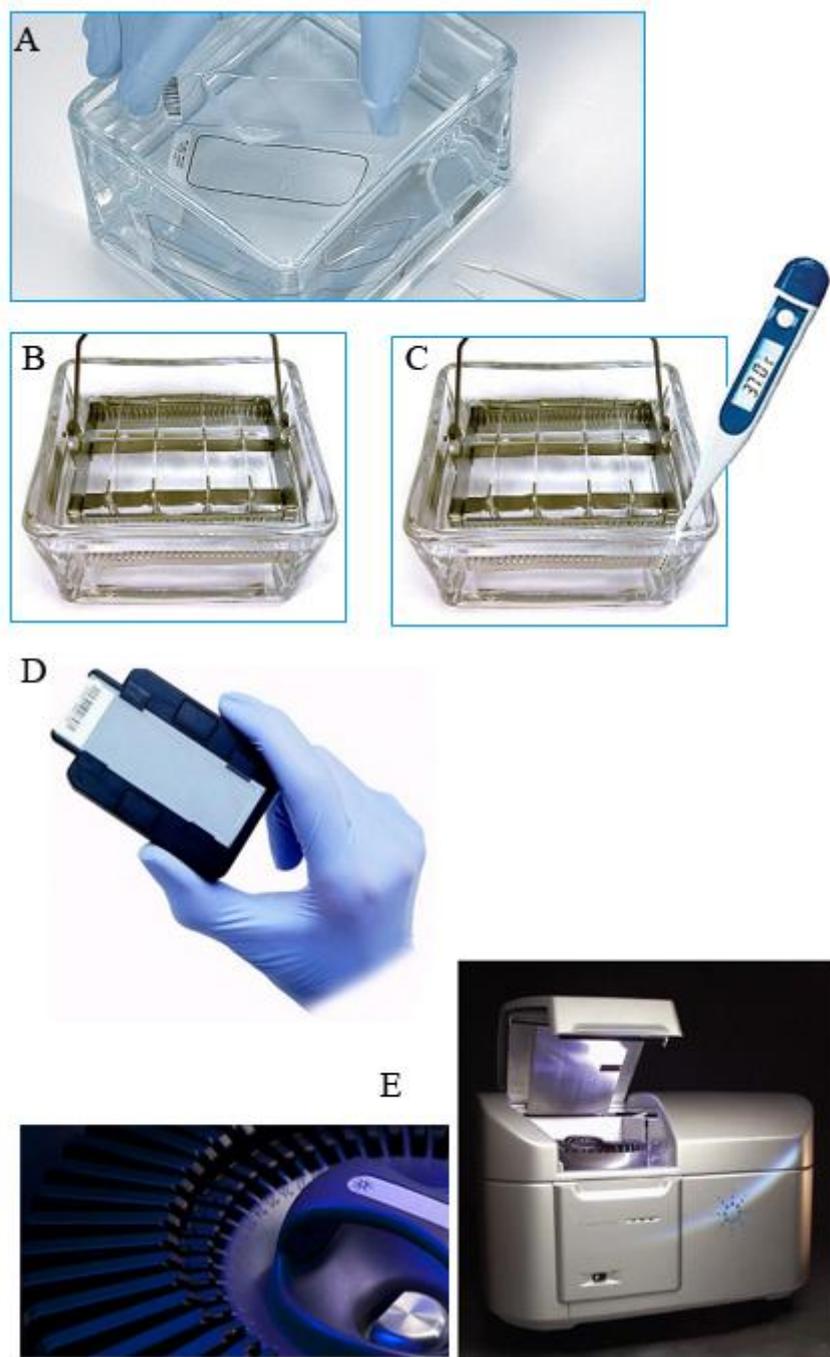


Figura 6: Etapa de Lavagem. (A) Mergulhado em tampão de lavagem 1, o conjunto lamina e lamínula é dissociado. (B) As lâminas são mergulhadas em uma cubeta contendo tampão de lavagem 1, para serem lavadas por 5 minutos a temperatura ambiente. (C) Em seguida, as lâminas são transferidas para outra cubeta contendo tampão de lavagem 2, a 37°C, ficando mergulhadas nesta por 1 minuto.(D) Por fim, a lâmina, é acoplada a um estojo adaptado, (E) e depois levada ao Scanner utilizado para a captura de fluorescência. (Fonte: [HTTP://www.agilent.com](http://www.agilent.com))

III. RESULTADOS

As amostras analisadas foram provenientes de dois pacientes do sexo masculino, com idades desconhecidas, e seis do sexo feminino, com idades variando entre 36 e 73 anos (média 54,8), o que corrobora com dados da literatura. A proporção entre sexos na amostra corresponder a 3 mulheres:1 homem, enquanto o referido pela literatura aponta para 2 mulheres:1 homem (ALEIXIOU *et al.*, 2011). Entretanto, o teste binominal para 1 proporção não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,3791$). Com exceção de um caso (CSN 06), que se enquadra no Grau II da classificação da WHO, todos os outros casos eram do tipo benigno (Grau I). A distribuição de Poisson indicou que a amostra, apesar de pequena, está bem distribuída, visto que a ocorrência de meningiomas atípicos é de cerca de 6% dos casos de meningiomas na população, com $p=0,06$.

Todas as amostras apresentaram ganhos e perdas de diversos segmentos cromossômicos. Com exceção do caso CSN 02, todos os outros apresentaram em maior ou menor grau mais deleções do que amplificações, como pode ser visto na Tabela 3, onde apresentamos os dados gerais de variação no número de cópias das amostras (CNA).

Tabela 3: Análise geral da variação do número de cópias identificados nas amostras.

Amostras	Deleções	Amplificações	Total de CNAs
CSN 02	32	129	161
CSN 06	99	58	157
CSN 10	103	42	145
CSN 16	188	161	349
CSN 29	47	43	90
CSN 36	28	8	36
CSN 66	30	7	37
CSN 83	27	15	42

* CNAs = Alterações no Número de Cópias

A análise dos dados apresentados na Tabela 3 demonstrou que a média de deleções, ampliações e do total de CNAs não são significantes estatisticamente entre os sexos (Teste T de Studente, com $p > 0,05$). No caso dos pacientes com idade conhecida, não houve relação estatisticamente significativa entre idade e o número de deleções, ampliações ou total de alterações (teste de correlação de Pearson, todos com $p > 0,05$).

III. 1 ALTERAÇÕES ENVOLVENDO 1p

A perda de segmentos localizados em 1p foi observada em todas as amostras analisadas. Algumas CNAs apresentaram recorrência de até seis dos oito casos. Apesar de apenas um segmento ter sido encontrado amplificado (1p36.32), o mesmo ocorreu em seis dos oito casos. Todas as alterações encontradas em 1p estão mostradas na tabela 4. A figura 7 mostra que, apesar de haver também CNA em 1q, a maioria das alterações quantitativas envolvendo esse par ocorreu no braço curto (1p).

Tabela 4: Relação das CNA envolvendo o braço curto do cromossomo 1 (1p). Com exceção de 1p36.32, em vermelho, todas as CNA foram deleções.

Região	CSN02	CSN06	CSN10	CSN16	CSN29	CSN36	CSN66	CSN83
1p34.1	X	X	X	X	X	X		
1p34.2	X		X	X	X	X		
1p34.3		X	X	X	X	X		
1p36.32	X	X	X		X		X	X
1p36.32- p36.33			X	X	X	X	X	
1p36.21- p36.31			X	X	X	X	X	
1p35.2 - p36.11		X	X	X	X	X		
1p35.3- p36.11		X	X	X	X	X		
1p21.2	X	X	X	X	X			
1p33		X	X	X	X			
1p34.1- p36.31			X	X	X	X		
1p13.2		X	X	X	X			
1p33.3		X	X	X	X			
1p31.1			X	X	X			

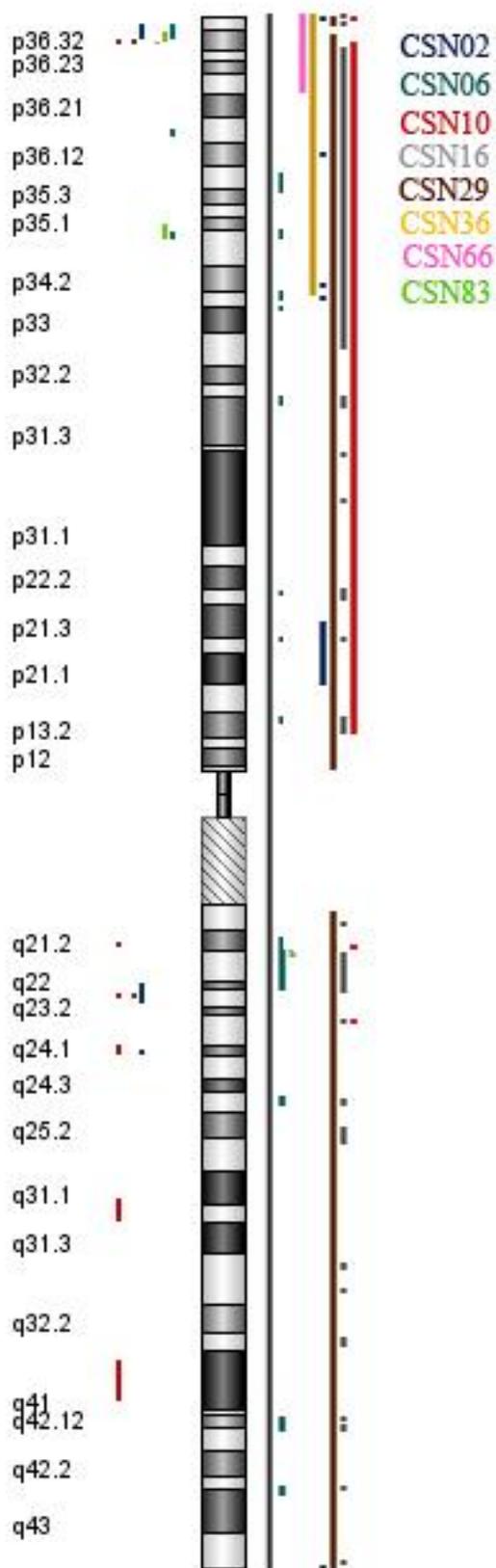


Figura 7: Resultado da análise de alterações quantitativas envolvendo o cromossomo 1, por aCGH. As amostras estão representadas pelas cores das linhas que representam seus resultados individualmente. As ampliações encontram-se ao lado esquerdo do cromossomo, enquanto as deleções estão representadas à direita dos cromossomos.

II. 2 ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O CROMOSSOMO 22

O par 22 apresentou CNA em todas as amostras. Além disso, houve a monossomia total em duas das oito amostras (CSN02, CSN10). Os resultados para o cromossomo 22 estão contidos na tabela 5, e na figura 8. Apenas uma região apresentou-se amplificada, com recorrência em seis dos oito casos analisados.

Tabela 5: Relação das CNA envolvendo o par 22. Com exceção de 22q11.22, em vermelho, todas as CNA foram deleções.

Região	CSN02	CSN06	CSN10	CSN16	CSN29	CSN36	CSN66	CSN83
22q11.22			X	X	X	X	X	X
22q12.1-q12.2	X	X	X	X		X		X
22q13.1-q13.2	X	X	X	X		X	X	
22q12.3-q13.31	X		X	X		X	X	
22q11.1	X	X	X	X	X	X		

II.4 OUTRAS ALTERAÇÕES RECORRENTES

Além das CNA observadas nos cromossomos 1p e 22, mais comumente citadas na literatura como características de meningiomas, as análises demonstraram que outros cromossomos apresentaram alterações no número de cópias. Alguns cromossomos apresentaram somente perda de material (1q, 2q, 4p, 7, 10q, 11, 12p, 14q, 16, 19p, 21q e X). Outros apresentaram tanto deleções como duplicações (2p, 8p, 9q, 15q, 19q). Um terceiro grupo apresentou ampliações somente (17q) ou trissomias (12, 18, 19 e 21).

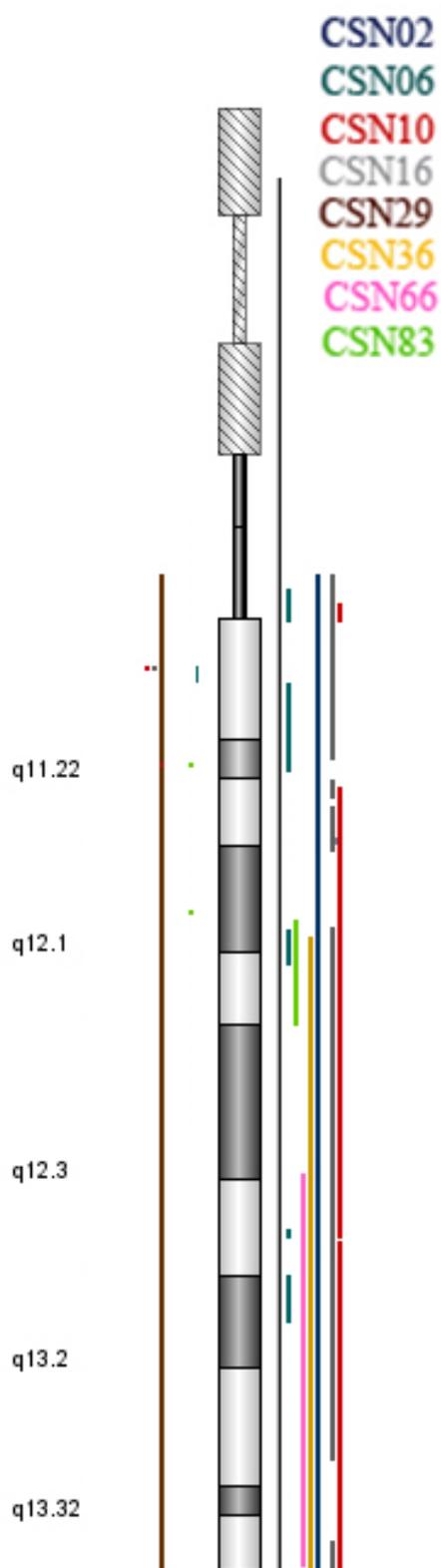


Figura 8: Resultado da análise de alterações quantitativas envolvendo o cromossomo 22, por aCGH. As amostras estão representadas pelas cores das linhas que representam seus resultados individualmente. As ampliações encontram-se ao lado esquerdo do cromossomo, enquanto as deleções estão representadas à direita dos cromossomos.

III. DISCUSSÃO

Cânceres de sistema nervoso são o grupo de neoplasias que causa o maior número de mortes entre crianças abaixo dos 15 anos e a segunda em pessoas entre 15 e 34 anos. Em adultos, cânceres desse tipo são menos frequentes, mas ainda assim têm uma alta taxa de mortalidade (LEGLER *et al.*, 2000). Dentre os tumores mais frequentes que acometem o sistema nervoso central, os meningiomas ocupam a segunda posição em ocorrência, mas normalmente são benignos e de crescimento lento. A maioria dos meningiomas apresenta bom prognóstico, e a sua ressecção associada a radioterapia são frequentemente curativas (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006). Entretanto, algumas vezes a ressecção total não pode ser feita devido à localização do tumor, que compromete estruturas vasculares ou neuro-sensitivas, e há tipos de meningiomas malignos, com prognóstico pobre. Assim, o conhecimento das características genômicas, estruturais e da patogênese molecular desses tumores poderia auxiliar em tratamentos nos casos de meningiomas não operáveis ou malignos (CHOY *et al.*, 2011).

Uma das novas técnicas de análise do perfil genômico é o array-cgh (aCGH) que permite detectar tanto perdas quanto ganhos de segmentos cromossômicos, que podem ser utilizada para detectar subtipos moleculares de tumores que podem estar relacionados com diferenças na sobrevivência do paciente (MISCHEL *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2009). Espera-se que em breve marcadores de prognóstico possam ser desenvolvidos com base nesses perfis genômicos. Assim, muitos estudos vêm se direcionando para esse objetivo. O painel de linhagens celulares mantido pelo Instituto Nacional do Câncer nos EUA foi testado no nível de sensibilidade para um grande número de agentes anti-cancerígenos, e a sobreposição do perfil genômico com a dados de resposta funcional dessas linhagens indica que será possível desenvolver um método baseado em análises de DNA a-CGH para predição de quimiosensibilidade tumoral

(SHERF *et al.*, 2000; STAUNTON *et al.*, 2001; WALLQVIST *et al.*, 2003). Baseados nessas afirmações, a análise do perfil de variações no número de cópias em CSN seria um passo inicial para a determinação posterior da quimiosensibilidade tumoral e desenvolvimento de terapias mais eficazes para esse grupo de neoplasias.

Citogeneticamente, meningiomas são bem caracterizados, com alguns rearranjos observados em uma grande proporção das amostras analisadas, como deleções envolvendo 1p e monossomia do par 22, além de ganho de 17q (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007). Aparentemente, um pequeno número de mutações seria o suficiente para o desenvolvimento da maioria dos meningiomas; entretanto seu crescimento lento faz da latência uma questão importante, dificultando a identificação da fonte e momento das mutações iniciais (WIEMELS *et al.*, 2010) Meningiomas esporádicos estão tipicamente associados a uma ou mais deleções focais, enquanto meningiomas atípicos ou malignos tendem a ter múltiplas alterações no número de cópias, fato consistente com a aquisição de uma mutação facilitadora de instabilidade cromossômica (SHEN *et al.*, 2009). Além das alterações em 1p, 22 e 17q, outras alterações recorrentes envolvem 6q, 14q e 18q (LEE *et al.*, 2009). Segundo Riemenschneider *et al.* (2006), as aberrações cromossômicas aumentam com a malignidade tumoral em meningiomas. Os rearranjos mais encontrados em meningiomas também foram recorrentes nas amostras analisadas no presente trabalho: deleções envolvendo 1p, monossomia do par 22 e ganho de 17q. As deleções de 1p e 22 estão bem caracterizada como recorrente nesse tipo tumoral, desde estudos baseados em citogenética clássica (MARK *et al.*, 1972; SAAD *et al.*, 1987; MALTBY *et al.*, 1988), e foram confirmadas em estudos mais recentes envolvendo a-CGH (NIGRO *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2009).

A perda de 1p é o segundo evento citogenético mais comum em meningiomas, depois da monossomia do 22, especialmente da região 1p33-1p36. Nossos resultados corroboram esse achado, sendo que os diversos clones que cobrem 1p mostraram que apesar de ter uma alta concordância nas amostras, as deleções cobrem diferentes segmentos cromossômicos. Entretanto, esse rearranjo costuma ser mais comum em meningiomas atípicos e malignos (YEW *et al.*, 2012), enquanto em nossa amostra foi observado em meningiomas benignos. A deleção com maior recorrência cobriu o segmento 1p34.1, e foi comum para seis das oito amostras. Oito deleções foram comuns para até cinco amostras. Essa constante perda de 1p em meningiomas levou à proposta de que esse segmento apresenta vários genes supressores tumorais, e que sua perda seria importante para a gênese e progressão de meningiomas (BELLO *et al.*, 2000). De fato, o estudo detalhado da região 1p33-1p36 (aproximadamente 8,2 MB) incluem genes que são potenciais candidatos ou já confirmados como supressores tumorais: *TP73*, *CDKN2C*, e *RAD54L* (MEDIOLLA *et al.*, 1999; BOSTROM *et al.*, 2001; LOMAS *et al.*, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2003; GABEAU-LACET *et al.*, 2009).

O gene *TP73* codifica uma proteína relacionada com a p53 e está localizado em 1p36.2, e atua também no controle do ciclo celular e apoptose. Em relação aos tumores de sistema nervoso central, merece maiores estudos por estar provavelmente relacionado com a tumorigênese de meningiomas atípicos (GABEAU-LACET *et al.*, 2009). Esse gene apareceu deletado em duas amostras de grau I, mas de tipos histológicos diferentes (transicional e meningoteliosomatoso).

O gene *CDKN2C* é relacionado com o controle de ciclo celular (ponto de checagem G1/Fase S) e já foi observado com mutações em diferentes tipos de cânceres humanos (BLAIS *et al.*, 1998; DREXLER, 1998; HUSSEMAN *et al.*, 1999). Esse gene codifica uma proteína de 18 kd (p18^{INK4c}) que se liga à Cdk6 e Cdk4 e inibe sua

atividade como cinase. Observamos em nossas amostras que esse gene apareceu deletado em três de nossas amostras (CSN10, CSN16 e CSN29).

O gene *RAD54L*, localizado em 1p32, é um membro da família de ATPases DNA-dependentes SNF2/SWI2, e mutações observadas em diferentes tipos de câncer levou à proposta de que seria um supressor tumoral (RASIO *et al.*, 1997). As mesmas três amostras que apresentaram deleção de *CDKN2C*, também apresentaram o *RAD54L* deletado. Em meningiomas, uma mutação pontual nesse gene foi associada ao risco de desenvolvimento desse tumor (LEONE *et al.*, 2003).

A perda desses genes em 1p em meningiomas levou Brostrom *et al.* (2001) a propor que a inativação dos ponto de checagem G1/Fase S seria uma importante aberração em meningiomas anaplásicos. Entretanto, nossos achados mostram que aparentemente essa via estaria comprometida em outros tipos de meningiomas de grau I, pela deleção simultânea dos dois genes relacionados com esse ponto de checagem em três de nossas amostras (*CDKN2C* e *RAD54L*). Assim, a inativação desse ponto de checagem poderia estar relacionada com a tumorigênese em meningiomas benignos, como os de nossa amostra.

Um fato interessante foi a amplificação de 1p.36.32, comum para seis das oito amostras, das quais quatro apresentaram o segmento 1p34.1 deletado. A região 1p.36.32 apresenta um gene interessante para estudos relacionados à oncologia, chamado *PRDM16*. Esse gene encontra-se superexpressado em paciente com leucemia mielóide crônica, portadores de uma translocação 1;21, e transcreve um fator de transcrição “zinc finger” recentemente identificado como potencialmente envolvido na imortalização de células progenitoras da medula óssea (DU *et al.*, 2005). Porém a maioria dos estudos relacionados a esse gene restringem-se a pacientes de leucemia mielóide crônica e seu

possível papel quando superexpressado e fusionado com o gene *RUNXI* na translocação 1;21 (ROCHE-LESTIENNE *et al.*, 2008).

Em relação ao cromossomo 22, os meningiomas foram o primeiro tipo de tumor sólido caracterizado como portador de uma aberração cromossômica, que seria a monossomia desse par (ZANG & SINGER, 1967). Desde então, perdas de material do cromossomo 22 têm sido a aberração mais consistente em meningiomas, atingindo cerca de 70% desses tumores (SEIZINGER *et al.*, 1987; RUTTLEDGE *et al.*, 1994). Essa também foi a situação observada em nossa amostra, visto que todos os casos analisados apresentaram deleções nesse cromossomo, e dentre as oito, três apresentaram monossomia do par 22 (CSN02, CSN10 e CSN36), apesar de uma duplicação de um pequeno segmento desse cromossomo (22q11,22) ter sido observada nas seis amostras do sexo feminina, estando deletadas nos homens. Esse segmento abriga um micro-RNA (MIR650). Apesar de não haver dados relacionados ao papel do miR-650 em meningiomas e outros cânceres de sistema nervoso, os estudos de Zhang *et al.* (2010) demonstraram que sua superexpressão em câncer gástrico pode promover a proliferação e crescimento de células cancerosas, aparentemente através de seu efeito em ING4, e que a modulação de miR-650 pode ser um bom alvo no tratamento de câncer gástrico baseado em miRNA.

Perdas no cromossomo 22 são frequentemente associadas à inativação do gene supressor tumoral *NF2*. De fato, meningiomas estão proximamente associados à síndrome genética Neurofibromatose tipo 2 (NF-2) (PARRY *et al.*, 1994). Aproximadamente 50% dos pacientes de NF2 desenvolvem meningiomas. Em 1993, o gene supressor tumoral *NF2* foi mapeado no cromossomo 22 (ROULEAU *et al.*, 1993).

Meningiomas esporádicos apresentam frequentemente inativação do *NF2*. Devido a isso, foram feitos estudos minuciosos nesse tipo de meningioma, em busca de

mutações do gene supressor tumoral *NF2*, o qual se encontrou frequentemente inativado, mas ainda há uma grande discrepância nas percentagens observadas (entre 20 e 60%) (RUTTLEDGE *et al.*, 1994; PAPI *et al.*, 1995; EVANS *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2005). Na verdade, os meningiomas podem ser divididos em dois grupos a partir da presença ou ausência de mutações em *NF2*, e esses grupos podem ser correlacionados com subtipos histológicos (WELLENREUTHER *et al.*, 1997; HANSSON *et al.*, 2007).

Os tumores com mutações em *NF2*, geralmente envolvendo perda alélica, são associados aos subtipos transicional e fibroso. Tumores sem mutações nesse gene pertencem predominantemente ao subtipo meningotelial. Em nossos resultados, seis das oito amostras apresentaram esse gene deletado. Dentre estes as amostras CSN02 e CSN36 (subtipo transicional), CSN16 (fibroso) – com deleção – e CSN66 (meningotelial) – sem CNA - concordam com a relação proposta entre presença ou ausência de mutações em *NF2* e subtipo tumoral. Já as outras amostras com deleção (CSN06, CSN10 e CSN83) são de tipos histológicos não associados aos dois grupos propostos. A amostra CSN29 discorda da classificação, visto que apesar de ser transicional não apresentou CNA envolvendo esse gene. Entretanto, é importante lembrar que as análises só consideraram as alterações no número de cópias. Estudos de sequenciamento poderiam revelar se as duas amostras sem deleções do *NF2* (CSN29 e CSN66) apresentam a inativação desse gene por mutações ou modificações epigenéticas, como a metilação.

O silenciamento transcricional de *NF2* por meio da metilação CpG em meningiomas foi estudado, mas apresentou resultados conflitantes. Enquanto Van Tilborg *et al.* (2005) reportaram a metilação em 1/21 tumores, outros autores (LOMAS *et al.*, 2005) demonstraram uma frequência maior (23/88). Em um terceiro estudo (HANSSON *et al.*, 2007) em 40 sítios CpG distribuídos em uma região promotora de

750 pb, foi sugerido que a metilação do promotor de *NF2* não tem um papel importante no desenvolvimento de meningiomas, devido à baixa frequência observada na amostra analisada (3 em 12). Conclui-se, dessa forma, que a sub-expressão do gene *NF2* está mais frequentemente relacionada com perdas do número de cópias, mas que outras formas de inativação, apesar de menos frequente, não podem ser descartadas.

A importância do *NF2* na gênese de meningiomas tem sua importância ilustrada por Goutagny *et al.* (2010). Em uma análise de 18 pacientes e 37 tumores (com recorrência), esses autores sugerem que a tumorigênese de meningiomas deveria ser dividida em dois grupos de acordo com o status do NF2: Cerca de 1/3 desses tumores surgem sem perda do NF2. Esses tumores seriam caracterizados por poucas alterações cromossômicas. Os eventos genéticos envolvidos na iniciação desses tumores permanecem obscuros. Por outro lado, cerca de 2/3 de meningiomas surgem a partir de uma rota dependente do *NF2*. Esses casos não evoluem para graus mais altos e são caracterizados por muito poucas alterações cromossômicas, geralmente a perda de 22q (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006). Um subgrupo de tumores de grau I podem progredir para graus mais malignos e são caracterizados por um padrão de alterações cromossômicas incluindo perdas de 1p, 6q e 14q. Essas alterações são associadas a tumores de grau II e III (LEONE *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2009). Entretanto, a amostra analisada por Goutagny *et al.*(2010) mostrou a ocorrência dessas alterações em meningiomas de graus I e II também. Para esses autores, essas alterações não são eventos tardios em meningiomas, envolvidos com sua progressão, já que foram detectados em tumores de grau I. Nossos dados, obtidos pelo aCGH, demonstram que, em parte, nossa amostra não corrobora os achados de Goutagny *et al.* (2010), visto que são tumores de grau I e II e encontramos alterações em 1p e 14q, mas nenhuma alteração em 6q.

A análise global de CNAs em todas as amostras demonstrou que, apesar de alterações em 1p e 22 serem as modificações mais observadas, como o esperado, outras regiões genômicas também se apresentaram modificadas em várias amostras, apontando para um possível envolvimento dessas modificações com o processo de tumorigênese e progressão tumoral. Algumas delas, como alterações nos pares 9, 12 e 17, já foram observadas em outros trabalhos e foram correlacionadas com meningiomas atípicos e anaplásicos.

As amplificações mais comuns em meningiomas envolvem o braço longo do cromossomo 17 (GOULTAGNY *et al.*, 2010), sendo geralmente encontradas em meningiomas anaplásicos (BUSCHGES *et al.*, 2002; LAMSZUS, 2004; LIU *et al.*, 2005; MAWRIN e PERRY, 2010; CHOY *et al.*, 2011) Büschges *et al.* (2002) observaram, por CGH, a amplificação de parte do braço longo do cromossomo 17 (17q21-qter) como uma aberração comum em meningiomas anaplásicos, mas não em meningiomas atípicos ou benignos. Entretanto, parte desse segmento (17q21) estava amplificada em quatro das amostras analisadas nesse trabalho, sugerindo que esse evento pode ser encontrado também em meningiomas de baixo grau, pelo menos parcialmente. Adicionalmente, a banda 17q25 foi encontrada amplificada em um número maior ainda das amostras (cinco das oito analisadas.). Os autores ainda afirmam que a incidência dessas amplificações aumenta com a malignidade do tumor (BÜSHGES *et al.*, 2002). Desta forma, observa-se que a presença destas alterações em um grande número de meningiomas benignos é bastante conflitante, demonstrando a necessidade de maiores estudos para averiguação da importância delas para a progressão dos meningiomas.

É interessante que este grupo de meningiomas tenha apresentado um número elevado de CNAs, tendo em vista que 87,5% deles são benignos. Em uma revisão

realizada por Choy *et al.* (2011), os meningiomas benignos são associados com cariótipos com poucas alterações cromossômicas, geralmente apresentando alterações apenas no cromossomo 22. Liu *et al.* (2005) associaram o aumento na complexidade dos cariótipos com os meningiomas de maiores graus, uma associação que é comum a todos os tipos tumoral (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006).

Quando comparamos com os meningiomas estudados por Carvalho *et al.* (2007), que classificaram os meningiomas em tumores de baixa e alta proliferação, notamos que há uma diferença muito grande em relação aos nossos resultados. Nos tumores benignos (baixa proliferação), os resultados de Carvalho *et al.*, (2007) exibiram entre um e três cromossomos envolvidos em aberrações no número de cópias, principalmente perdas de sítios cromossômicos, enquanto que os meningiomas apresentados neste trabalho apresentam quase todos os cromossomos envolvidos em algum tipo de CNA, porém concordando que as perdas são mais frequentes que os ganhos. Alguns fatores podem ter influenciado para este número elevado de CNAs em meningiomas benignos. A codeleção de *NF2* e *CHEK2*, apontada como indutora de instabilidade cromossômica por Yang *et al.*, (2012), foi observada em quase todas as amostras que apresentaram os maiores números de CNAs. No entanto, essa codeleção de *NF2* e *CHEK2* também não era comum entre os meningiomas benignos.

O cenário criado pelos resultados da análise citogenômica de meningiomas, tanto das amostras incluídas no presente trabalho, como naquelas já publicadas, aponta para a grande necessidade do aumento do número de estudos dessa natureza, tendo em vista que de alguma forma os meningiomas deste estudo, histologicamente classificados como benignos, estão apresentando perfil citogenômico característico de tumores malignos. Pode ser especulado que algum fator regional possa estar influenciando no aparecimento deste perfil diferenciado. No entanto, o fato desses tumores apresentarem as

alterações que são clássicas dos meningiomas, mesmo os benignos, como as deleções em 1p e em 22q, pode ser um indício de que estas alterações devem estar ligadas a eventos iniciais do seu desenvolvimento, como já foi sugerido diversas vezes por outros autores. Dessa forma, essas alterações permanecem como marcadores importantes em meningiomas, e o estudo das relações dessas e outras CNAs com a resposta a diferentes tratamentos e ocorrência de recidivas devem ser o próximo passo após a caracterização citogenômica baseada em array-CGH.

IV. REFERÊNCIAS

- AFFYMETRIX (2012). Cytoscan HD array. Disponível em: http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=cytoscan_kit
< Acessado em 11 de Novembro de 2013.
- AHMADI SA, SAMADI N. (2006) Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region staining in predicting the behavior of meningiomas. *Ann Saudi Med* 26(1):38-42
- AKEYSON EW, MCCUTCHEON IE. (1996) Management of benign and aggressive intracranial meningiomas. *Oncol.*; 10(5):747-759.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2004) *Biologia Molecular da Célula*. 4ª edição. Artmed, Porto Alegre, 1463pp.
- ALEXIOU GA, MARKOULA S, GOGOU P, KYRITSIS AP. (2011) Genetic and molecular alterations in meningiomas. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 113 261-267.
- BAAK JPA, PATH FRC, HERMSEN MAJA, MEIJER G, SCHMIDT J, JANSSEN EAM. (2005) Genomics and proteomics in câncer. *European Journal of Cancer* 39 1199–1215.
- BALMAIN, A (2001) Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat. Rev. Cancer* 1, 77e 82.
- BECKMAN RA, LOEB LA (2005) Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Seminars in Cancer Biology* 15 423–435.
- BELLO MJ, DE CAMPOS JM, KUSAK ME, VAQUERO J, SARASA JL, PESTANA A, REY JA (1994): Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 9: 296-298.

- BELLO MJ, DE CAMPOS JM, VAQUERO J, KUSAK ME, SARASA JL, REY JA (2000). High-Resolution Analysis of Chromosome Arm 1p Alterations in Meningioma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* .Volume 120:30–36.
- BERNHEIM, A (2010) Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence, *Molecular Oncology* doi:10.1016/j.molonc.2010.06.003.
- BLAIS A, LABRIE Y, POULIOT F, LACHANCE Y, LABRIE C (1998) Structure of the gene encoding the human cyclin-dependent kinase inhibitor p18 and mutational analysis in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 247:146-153.
- BONASSI S, ZNAOR A, NORPPA, HAGMAR L (2004) Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res* 104:376–382.
- BORGES - OSÓRIO, M-R, ROBINSON, WM (2001) *Genética Humana*. 2^a edição Artmed, Porto Alegre, 299pp.
- BOSTROM J, MEYER-PUTTLITZ B, WOLTER M, BLASCHKE B, WEBER RG, LICHTER P, ICHIMURA K, COLLINS VP, 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. *Am J Pathol* 159:661–9.
- BREIVIK J. (2005) The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Seminars in Cancer Biology* 15:51-60.
- BREM S. (2004) Angiogenesis and brain tumors. In: Winn RH ed. *Youmans neurological surgery*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. p. 771-785.
- BOSTRÖM J, PUTTLITZ M.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 (p16INK4a), p14ARF,

CDKN2B (p15INK4b), and CDKN2C (p18INK4c) in Atypical and Anaplastic Meningiomas *Am J Pathol.* August; 159(2): 661–669.

BUFFART TE, TIJSSEN M, EL-BCHIRI J, DUVAL A, VAN DE WIEL MA, YLSTRA B, MEIJER GA, CARVALHO B. NMD inhibition fails to identify tumour suppressor genes in microsatellite stable gastric cancer cell lines. *BMC Medical Genomics* 2:39.

BUFFART TE, CARVALHO B, MONS T, REIS RM, MOUTINHO C, SILVA P, VAN GRIEKEN NC, VIETH M, STOLTE M, VAN DE VELDE CJ, SCHROCK E, MATTHAEI A, YLSTRA B, CARNEIRO F, MEIJER GA (2007). DNA copy number profiles of gastric cancer precursor lesions. *BMC Genomics*, 8:345.

CALLAGY GM, PHAROAH PD, PINDER SE, HSU FD, NIELSEN TO, RAGAZ J, ELLIS IO, HUNTSMAN D, CALDAS C. (2006) BCL2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cncer Research* 12:2468–2475

CARVALHO L H, SMIRNOV I, BAIA G S, MODRUSAN Z, SMITH S J, JUN P, COSTELLO J F, MCDERMOT W MICHAEL, VANDENBERG S RAND, LAL A (2007) Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Molecular Cancer* 2007, 6:64 doi:10.1186/1476-4598-6-64

CHOY W, KIM W, NAGASAWA D, STRAMOTAS S, YEW A, GOPEN Q, PARSA AT, YANG I. (2011) The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg Focus* volume 30 (5):E 6,

DA SILVA FEP & DE OLIVEIRA EHC (2013) Clinical Management and involving novel therapeutic atrategies for patients with brain tumors. In: LICHTOR, T. (Org.).

Chromosomal Analysis: Clinical Applicability to Brain Cancers. Ed: InTech, P. 357-388.

DREXLER HG (1998) Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 12:845-859. [PubMed]

ESTIMATIVA 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 118 p.

EUN K K, KIM KK, KIM DC, PARK JI, HAN YJ (2009). Cytogenetic Characterizations of Central Nervous System Tumors: The First Comprehensive Report from a Single Institution in Korea. *J Korean Med Sci*; 24: 453-60.

EVANS J.J, JEUN SS, LEE JH, HARWALKAR JA, SHOSHAN Y, COWELL JK, GOLUBIC M. (2001) Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningothelial meningiomas. *J Neurosurg* 94(1):111-117.

EVANS DG, WATSON C, KING A, WALLACE AJ, BASER ME (2005) Multiple meningiomas: differential involvement of the NF2 gene in children and adults. *J Med Genet* 42(1):45-48.

FALAVIGNA A, SANTOS JAN, CHIMELLI L, FERRAZ APF, FOREST F, CALLEARI S (2003). Anaplastic Meningioma: cases reports. *Revista AMRIGS, Porto Alegre* (4):292-295.

FERREIRA RM (1999) Tumores do Sistema Nervoso Central: fatores prognósticos relacionados a sobrevida de crianças e adolescentes em duas cortes Hospitalares. Rio de Janeiro, 183p. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública.

- GU J, LIU Y, KYRITSIS AP, BONDY ML (2009) Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics*. 6:427–35.
- HANSSON CM, BUCKLEY PG, GRIGELIONIENE G, PIOTROWSKI A, HELLSTROM AR, MANTRIPRAGADA K, JARBO C, MATHIESEN T, DUMANSKI JP (2007) Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 8:16.
- HILL A D, LINET M S, PETER M B, HOWARD A F, ROBERT G S, WILLIAM R S, PETER D I (2004) Meningioma and schwannoma risk in adults in relation to family history of cancer. *Neuro-Oncology* 6, 274–280.
- HODGSON S, FOULKES W, ENG C e MAHER E. (2007) *A Pratical Guide to Human Cancer Genetics*. Cambridge, UK. Cambridge University Press, 2007. 411pp.
- ISHINO S, HASHIMOTO N, FUSHIKI S, DATE K, MORI T, FUJIMOTO M, ET AL (1998) Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer*;83:360–6.
- JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, THUN MJ (2009) Cancer statistics. *CA. Cancer Journal Clin* 59(4):225-49.
- JUKICH PJ, MCCARTHY BJ, SURAWICZ TS, FREELS S, DAVIS FG. (2001) Trend incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994. *Neuro-oncololy* (2001); 3(3):131-51.
- KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D (1992). Compative genomic hybridization for molecular cytogenetics analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- KLEIHUES P, LOUIS DN, SCHEITHAUER BW, RORKE LB, REIFENBERGER G, BURGER PC, CAVENEE WK (2002) *The WHO Classification of Tumors of the*

Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 61: 215-225.

KLEIHUES P, BURGER PC, SCHEITHAUER BW (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Berlin: Springer-Verlag

KLEIHUES P, CAVENEE WK (2000) World Health Organization Classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. Lyon: IARC Press.

KOPS GJ, WEAVER BA, CLEVELAND DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5: 773–785.

LANTOS O.L, LOUIS D.N, ROSENBLUM M.K, KLEIHUES P (2002) Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfields neuropathology*. London: Arnold.

LEE Y, LIU J, PATEL S, CLOUGHESY T, LAI A, FAROOQI H, SELIGSON D, DONG J, LIAU L, BECKER D, MISCHER P, SHAMS S, NELSON S (2009) Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol* 20:751–762.

LEGLER JM, GLOECKLER RIES LA, SMITH MA, WARREN JL, HEINEMAN EF, KAPLAN RS, LINET MS (2000) RESPONSE Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*. Jan 5;92(1):77A-8.

LEONE P. E, MENDIOLA M, ALONSO J, CÉSAR PAZ-Y-MIÑO AND PESTAÑA (2003) A. Implications of a RAD54L polymorphism (2290C/T) in human meningiomas as a risk factor and/or a genetic marker 2 *BMC Cancer*, 3:6.

- LI X, ZHAO J (2009) Intracranial meningiomas of childhood and adolescence: report of 34 cases with follow-up. *Childs Nerv Syst* 25:1411–1417.
- LIU Y, PANG JC, DONG S, MAO B, POON WS, (2005) NG HK: Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol*, 36(4):416-425.
- LOEB L A., BIELAS J H. BECKMAN R A (2008) Cancers Exhibit a Mutator Phenotype: Clinical Implications. *Cancer Res*; 68:3551-3557.
- LOMAS J, BELLO MJ, ARJONA D, GONZALEZ-GOMEZ P, ALONSO ME, DE CAMPOS JM, VAQUERO J, RUIZ- BARNES P, SARASA JL, CASARTELLI C, REY JA (2001). Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet*;129:88–91.
- LOMAS J, BELLO MJ, ARJONA D, ALONSO ME, MARTINEZ-GLEZ V, LOPEZ-MARIN I, AMINOSO C, DE CAMPOS JM, ISLA A, VAQUERO J, REY JA (2005) Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 42(3):314-319.
- C. LOPEZ-GINES, M. CERDA-NICOLAS, R. GIL-BENSO, C.ROBERT, C.MARIA, R. PEDRO, B. LOMBART-ANTONIO/ *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148 (2004) 123–128.
- LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER O, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAAEUER BW, KLEIHUES P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
- LUSIS E, GUTMANN DH (2004) Meningioma: an update. *Curr Opin Neurol* 17:687–692.

- MALTBY EL, IRONSIDEB JW, BATTERSBY RDE (1988): Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet and Cytogenet* 31 (2): 199–210.
- MARK J., LEVAN G., MITELMAN F (1972) Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas*; 71: 163–8
- MAROSI C; HASSLER M; ROESSLER K; RENI M; SANT M; MAZZA E; VECHT C (2008) Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol*; 67(2): 153-71.
- MASUDA A, TAKAHASHI T (2002) Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in pathogenesis. *Oncogene* 21: 6884-6897.
- MENDIOLA M, BELLO MJ, ALONSO J, LEONE PE, VAQUERO J, SARASA JL, KUSAK ME, DE CAMPOS JM, PESTANA A, REY JA (1999) Search for mutations of the hRAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Molecular carcinogenesis*;24:300–4.
- MICHOR F, IWASA Y, VOGELSTEIN B, LENGAUER C, NOWAK MA (2005) Can chromosomal instability initiate tumorigenesis *Seminars in Cancer Biology* 15: 43-49.
- MITELMAN F, JOHANSSON B, MERTENS F, (1995) Data base of chromosome aberrations in cancer [Internet]. Updated February 16, Available from <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes>.
- MURAKAMI M, HASHIMOTO N, TAKAHASHI Y, HOSOKAWA Y, INAZAWA J, MINEURA K. (2003) A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 140:99–106.

NAGASAKA T, GUNJI M, HOSOKAI N, HAYASHI K, FUJINO M, IKEDA H, ITO M, INAO S (2010) Fluorescent in situ hybridization 1p/19q deletion/imbalance analysis of low-grade and atypical meningiomas. *Neurol Med Chir*; 50:27–32.

NIETO-SAMPEDRONIETO-SAMPEDRO M, VALLE-ARGOS B, GÓMEZ-NICOLA D, FERNÁNDEZ-MAYORALAS A, NIETO-DÍAZ M (2011). Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. *Clin Med Insights Oncol* 5 265–314.

NIGRO JM, MISRA A, ZHANG L, SMIRNOV I, COLMAN H, GRIFFIN C, OZBURN N, CHEN M, PAN E, KOUL D YUNG WK, FEUERSTEIN BG, ALDAPE KD (2005): Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res*, 65(5):1678-1686.

NUNES F, SHEN Y, NIIDA YO, BEAUCHAMP R, STEMMER-RACHAMIMOV A O, RAMESH V, GUSELLA JS, MACCOLLI (2005) *Cancer Genetics and Cytogenetics* 162 135–139

NUSSBAUM RL, MCINNES RR, WILLARD HF (2002) Thompson & Thompson *Genética Médica*. 6a edição, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp. 274-293.

ONCOGUIA, Câncer Sistema Nervoso. 2012 Disponível em <http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/tumores-cerebrais---sistema-nervoso-central/54/176/> > Acesso em: 13 de Novembro de 2013.

PARIS PL, ANDAYA A, FRIDLYAND J, JAIN AN, WEINBERG V, KOWBEL D, BREBNER JH, SIMKO J, WATSON JE, VOLIK S, ALBERTSON DG, PINKEL D, ALERS JC, VAN DER KWAST TH, VISSERS KJ, SCHRODER FH, WILDHAGEN MF, FEBBO PG, CHINNAIYAN AM, PIENTA KJ, CARROLL PR, RUBIN MA, COLLINS C, VAN DEKKEN H (2004) Whole genome scanning

identifies genotypes associated with recurrence and metastasis in prostate tumors. *Hum Mol Genet*;13:1303–13.

PAPI L, DE VITIS LR, VITELLI F, AMMANNATI F, MENNONNA P, MONTALI E, BIGOZZI U. (1995) Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 95(3):347-351.

PATEL AS, HAWKINS AL, Griffin CA (2000) Cytogenetics and cancer. *Current Opinion in Oncology*, 12(1):62-67.

PINKEL D, SEGRAVES R, SUDAR D, CLARK S, POOLE I, KOWBEL D, COLLINS C, KUO WL, CHEN C, ZHAI Y, DAIRKEE SH, LJUNG BM, GRAY JW, ALBERTSON DG (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*, 20:207-211.

PINKEL D, ALBERTSON DG (2005). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet. Jun*;37 Suppl:S11-7.

PITTELLA JEM, ROSEMBER S, HANN MD, CHIMELLI L, ARAUJO MBM (2006) Sistema Nervoso. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,.

RAJAGOPALAN H, LENGAUER C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* vol 432.

RASIO D, MURAKUMO Y, ROBBINS D, ROTH T, SILVER A, NEGRINI M, SCHMIDT C, BURCZAK J, FISHEL R, CROCE CM. (1997) Characterization of the human homologue of RAD54: a gene located on chromosome 1p32 at a region of high loss of heterozygosity in breast tumors. *Cancer Res*, 57:2378-2383.

RIEMENSCHNEIDER MJ, PERRY A, REIFENBERGER G (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 5:1045–1054.

- ROGATTO SR, RAINHO CA (2004). Citogenética molecular do câncer. In: Guerra, M. Fish: conceitos e aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: Ed. SBG, p. 149-170.
- ROSENBLUM M K, BILBAO JM, ANG LC (2004) Neuromuscular System: Meningiomas In Rosai & Ackerman's surgical pathology. Volume1. 9th edition. Edited by Rosai J. Philadelphia.
- SAADI A, LATIMERD F, MADERCICA M, ROBBINS T. (1987): Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance. II. Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 26:127–141.
- SEIZINGER BR, DE LA MONTE S, ATKINS L, GUSELLA JF, MARTUZA RL (1987): Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15):5419-5423.
- STAUNTON JE, SLONIM DK, COLLER HA, TAMAYO P, ANGELO MJ, PARK J, SCHERF U, LEE JK, REINHOLD WO, WEINSTEIN JN, MESIROV JP, LANDER ES, GOLUB TR (2001) Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10787–10792.
- SCHERF U, ROSS DT, WALTHAM M, SMITH LH, LEE JK, TANABE L, KOHN KW, REINHOLD WC, MYERS TG, ANDREWS DT, SCUDIERO DA, EISEN MB, SAUSVILLE EA, POMMIER Y, BOTSTEIN D, BROWN PO, WEINSTEIN JN. (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of câncer. *Nature Genetics* 24, 236 - 244 doi:10.1038/73439
- SCHWAENEN C, VIARDOT A, BERGER H, BARTH TF, BENTINK S, DÖHNER H, ENZ M, FELLER AC, HANSMANN ML, HUMMEL M, KESTLER HA, KLAPPER W, KREUZ M, LENZE D, LOEFFLER M, MÖLLER P, MÜLLER-HERMELINK HK, OTT G, ROSOLOWSKI M, ROSENWALD A, RUF S, SIEBERT R, SPANG R, STEIN H, TRUEMPER L, LICHTER P, BENTZ M,

WESSENDORF S; MOLECULAR MECHANISMS IN MALIGNANT LYMPHOMAS NETWORK PROJECT OF THE DEUTSCHE KREBSHILFE (2009) Microarray-Based Genomic Profiling Reveals Novel Genomic Aberrations in Follicular Lymphoma Which Associate with Patient Survival and Gene Expression Status. *Genes, Chromosomes & Cancer* 48:39–54

SEN S (2000). Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol.*, 12(1):82-88.

SHEN Y, NUNES F, STEMMER-RACHAMIMOV A, JAMES M, MOHAPATRA G, PLOTKIN S, BETENSKY RA, ENGLER DA, ROY J, RAMESH V, GUSELLA JF.(2009) Genomic profiling distinguishes familial multiple and sporadic multiple meningiomas. *BMC Med Genomics* 2:42.

SNUSTAD D.P, SIMMONS J M (2008). *Fundamentos de Genética*. 4.edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,

SOLINAS-TOLDO S, LAMPEL S, STILGENBAUER S, NICKOLENKO J, BENNER A, DÖHNER H, CREMER T, LICHTER P (1997). Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 20:399–407.

RUTTLEDGE MH, SARRAZIN J, RANGARATNAM S, PHELAN CM, TWIST E, MEREL P, DELATTRE O, THOMAS G, NORDENSKJÖLD M, COLLINS VP *et al* (1994): Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet*, 6(2):180-184.

TIBILETTI MG (2004) Specificity of interphase fluorescence in situ Hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 155: 143-148.

- VAN TILBORG AA, MOROLLI B, GIPHART-GASSLER M, DE VRIES A, VAN GEENEN DA, LURKIN I, KROS JM, ZWARTHOF EC (2005): Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J Pathol* 208: 564-73.
- VERKHRATKY A, BUTT A (2007). *Glial Neurobiology: a text book*. Wiley. Cap. 10, p. 167-194. England.
- WALLQVIST A, MONKS A, RABOW AA, THANKI N, SHOEMAKER RH, COVELL DG. (2003). Mining the NCI screening database: explorations of agents involved in cell cycle regulation. *Prog. Cell Cycle Res.* **5**, 173–179
- WEISS MM, KUIPERS EJ, POSTMA C, SNIJDERS AM, PINKEL D, MEUWISSEN SG, ALBERTSON D, MEIJER GA.(2004) Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cellular Oncology* 26 307–317.
- WELLENREUTHER R, KRAUS JA, LENARTZ D, MENON AG, SCHRAMM J, LOUIS DN, RAMESH V, GUSELLA JF, WIESTLER OD, VON DEIMLING A (1995): Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146(4):827-832.
- WIEMELS, J., WRENSCH, M., AND CLAUS, E.B. (2010). Epidemiology and etiology of meningioma. *J. Neurooncol.* 99, 307–314.
- WHITTLE IR, SMITH C, NAVOO P, COLLIE D. MENINGIOMAS (2004) *Lancet* 363:1535–43.
- WHO mortality database: tables [online database]. Geneva, World Health Organization, 2012 (<http://www.who.int/healthinfo/morttables>).
- WROBEL G, ROERIG P, KOKOCINSKI F, NEBEN K, HAHN M, REIFENBERGER G, LICHTER P (2005) Microarray-based gene expression profiling of benign,

atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 114:249–256.

YARDEN RI, PARDO-REOYO S, SGAGIAS M, COWAM KH, BRODY LC (2002)

BRCA 1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk 1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics*. 30: 285-289.

ZANG KD (2001): Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human

tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet*; 93: 207–220.

ZANG KD, SINGER H (1967): Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature*,

216(110):84-85.

ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



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

ANEXO II: TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Universitário João de Barros Barreto - HUJBB, 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 estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

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 encaminhado 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. Edivaldo H.C. de Oliveira ou com o Prof. Dr. Nilson P. Anselmo, através dos telefones 3183-1568 ou 3183-1558.

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: