Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu
Divisão Hemocentro

ISMAEL AUGUSTO SILVA LOMBARDI

Metilação e expressão do gene *BRCA1* em meningiomas

Botucatu
2013
Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica

Mestrado profissional

ISMAEL AUGUSTO SILVA LOMBARDI

Metilação e expressão do gene *BRCA1* em meningiomas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional), para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Adriana Camargo Ferrasi
Coorientadores: Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Dr. Marco Antonio Zanini

Botucatu
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Lombardi, Ismael Augusto Silva.
Metilação e expressão do gene BRCA1 em meningiomas / Ismael Augusto Silva Lombardi. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Adriana Camargo Ferrasi
Coorientadores: Marco Antônio Zanini
Maria Inês de Moura Campos Pardini
Capes: 20804008

1. Meningioma. 2. Genética – Expressão. 3. Regulamento genético. 4. Tumores intracranianos. 5. Mamas – Câncer.

Palavras-chave: BRCA1; Meningioma; Metilação.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivone e José, pelo amor incondicional.

A minha madrinha Nena, tios Carlos e Toti (*in memorian*) e tias Irene, Ruth, Bela e Marlene (*in memorian*), pelo suporte durante toda a vida toda.

À Priscila, por toda paciência, companherismo, suporte e carinho que a mim tem dedicado nos últimos anos.

Às "Marias", para que sirva de inspiração ao longo de suas jornadas.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Marco Antônio Zanini,** pelas oportunidades oferecidas durante a residência e por vários exemplos que geraram imensa admiração

À **Dra. Adriana Camargo Ferrasi,** orientadora e amiga, pela confiança depositada

À **Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini**, pela confiança no início e na continuidade do projeto

Aos **Dr Roberto Colichio Gabarra** e **Antônio Tadeu de Souza Faleiros,** por toda paciência e colaboração.

Ao **Dr. Francisco Otávio Camargo Pereira,** grande amigo e companheiro de jornada, cuja colaboração foi fundamental para a realização deste projeto

Às amigas **Aline Faria Galvani** e **Tainara Francine Felix,** pelas valiosas contribuições na bancada

Ao **Dr. Flávio Lima,** pela colaboração nas análises em imuno-histoquímica e coleta de amostras controle

RESUMO

Introdução: meningiomas são os tumores intracranianos primários mais comuns e correlacionam-se com câncer de mama, compatilhando características como incidência maior no sexo feminino, receptores para hormônios sexuais e crescimento a exposição a hormônios sexuais. O gene *BRCA1* é amplamente estudado no câncer de mama hereditário e esporádico, entretanto, são poucos os trabalhos que correlacionam *BRCA1* e meningiomas. O *BRCA1* é gene de supressão tumoral, interagindo com outros oncogenes, atuando no reparo do DNA durante a divisão celular e modulando negativamente receptores de estrógeno e progesterona. **Objetivos:** avaliar o padrão de metilação de e expressão de *BRCA1* em meningiomas e tecidos controles, e a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em meningiomas e controles, correlacionando estes dados com dados epidemiológicos da casuística. **Casuística e métodos:** pacientes com diagnóstico de meningiomas tiveram amostras tumorais colhidas durante cirurgias de rotina pela disciplina de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e do Hospital Mário Gatti, em Campinas. Previamente, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e cada paciente concordou em participar ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Amostras controle de aracnóide foram colhidas de cadáveres no serviço de necropsia da disciplina de Patologia da FMB. As amostras tumorais foram avaliadas para metilação de *BRCA1* por PCR específica para metilação e os resultados avaliados por eletroforese. A expressão foi avaliada por PCR em tempo real os resultados dados em relação a amostras comtroles. A expressão de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) foram analisadas por imuno-histoquímica, conforme rotina da disciplina de Patologia da FMB. **Resultados:** foram avaliados 50 meningiomas entre janeiro de 2009 a setembro de 2012, sendo 22 masculinos e 28 femininos. A metilação de *BRCA1* foi estatisticamente significante em meningiomas em relação aos tecidos controles (p = 0,0394). A metilação de *BRCA1* foi mais frequente no sexo masculino (72%) e estatísticamente significante em homens com mais de 55 anos (p = 0,0461). A expressão de *BRCA1* foi maior em relação ao controle principalmente nos casos metilados em homens (p = 0,0474). A expressão de RP foi estatisticamente significante em meningiomas em relação aos tecidos controles (p = 0,0350), não sendo observada significância entre idade, sexo e metilação. Não houve expressão de RE nos tecidos controles e amostras tumorais. **Conclusões:** A metilação de *BRCA1* parece estar associada ao sexo masculino acima dos 55 anos, e pode contrubuir para a tumorigênese e desenvolvimento de meningiomas nestes casos. Além disso, a presença de RP pode contribuir para exarcebar os efeitos mitogênicos da progesterona em meningiomas, principalmente em casos *BRCA1*- metilados.

ABSTRACT

Introduction: Meningiomas are the most common primary intracranial tumors and correlate with breast cancer, shearing features like higher incidence in female, sexual hormone receptors and growth to exposure to sexual hormones. The gene is widely studied in hereditary and sporadic breast cancer, however, there are few studies that correlate *BRCA1* and meningiomas. The *BRCA1* is a tumor suppressor gene and interacts with other oncogenes by DNA repairing during cell division and also negative modulating estrogen and progesterone receptors. **Objectives:** To assess the pattern of methylation and expression of *BRCA1* in meningiomas and control tissues, and the expression of estrogen and progesterone receptors in meningiomas and control tissues, and to correlate these data with patients epidemiological data. **Methods:** Patients diagnosed with meningioma had collected tumors samples during routine surgeries by the discipline of Neurosurgery in Faculty of Medicine of Botucatu (FMB) and Mario Gatti Hospital in Campinas. Previously, the project was approved by the Research Ethics Committee and each patient agreed to participate by signing the Instrument of Consent. Control arachnoid samples were collected from cadavers during routine of necropsy of Pathology departament in FMB. The tumor samples were analyzed for methylation of *BRCA1* by methylation specific PCR and the results were evaluated by electrophoresis. The expression was assessed by real-time PCR results given in relation to samples comtroles. The expression of estrogen receptors (ER) and progesterone (PR) were analyzed by immunohistochemistry, as routine in Pathology departament. **Results:** there were 50 meningiomas between January 2009 to September 2012, 22 male and 28 female. The methylation of *BRCA1* in meningiomas was statistically significant compared to control tissues ($p = 0.0394$). The methylation of *BRCA1* was more frequent in males (72%) and statistically significant in men aged over 55 years ($p = 0.0461$). The expression of *BRCA1* was higher compared to control especially in cases methylated in men ($p = 0.0474$). The expression of PR in meningiomas was statistically significant compared to control tissues ($p = 0.0350$), no significance was observed between age, gender and methylation. There was no expression of ER in tissue controls and tumor samples. **Conclusions:** *BRCA1* methylation appears to be associated with male over 55, and may contribute to tumorigenesis and development of meningiomas in these cases. Furthermore, the presence of RP could contribute to exacerbate the mitogenic effects of progesterone in meningiomas, especially in cases *BRCA1*-methylated.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Metilação.....20

FIGURA 2. Ilustração de gel de poliacrilamida.....29

FIGURA 3. Lâmina TMA corada com H.E em aumento de 2x.....34

FIGURA 4. Lâmina TMA corada com H.E em aumento de 4x.....35

FIGURA 5. Lâmina TMA corada com H.E em aumento de 10x.....36

FIGURA 6. Subtipos de meningiomas.....39

FIGURA 7. Distribuição de meningiomas por sexo e faixa etária.....40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INCIDÊNCIA POR FAIXA ETÁRIA EM MENINGIOMAS.....6

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DE MENINGIOMAS.....7

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO OMS PARA MENINGIOMAS 2007.....9

TABELA 4. ANÁLISE DOS RESULTADOS MSP-PCR.....30

TABELA 5. METILAÇÃO DE *BRCA1* EM MENINGIOMAS E TECIDO CONTROLE.....41

TABELA 6. METILAÇÃO DE *BRCA1* POR SEXO.....41

TABELA 7. METILAÇÃO DE *BRCA1* NO SEXO FEMININO POR FAIXA ETÁRIA.....42

TABELA 8. METILAÇÃO DE *BRCA1* NO SEXO MASCULINO POR FAIXA ETÁRIA.....43

TABELA 9. EXPRESSÃO DE *BRCA1* POR METILAÇÃO NO SEXO FEMININO.....44

TABELA 10. EXPRESSÃO DE *BRCA1* POR METILAÇÃO NO SEXO MASCULINO.....44

TABELA 11. EXPRESSÃO DE RP EM MENINGIOMAS E TECIDOS CONTROLES.....45

TABELA 12. DISTRIBUIÇÃO DE RP POR SEXO.....45

TABELA 13. DISTRIBUIÇÃO DE RP POR CASOS METILADOS.....46

TABELA 14. DISTRIBUIÇÃO DE RP POR FAIXA ETÁRIA EM CASOS METILADOS.....46

TABELA 15. CASUÍSTICA E DADOS OBTIDOS.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

Amplif. - Amplificação

CBTRUS - Central de Registro de Tumores Cerebrais dos E.U.A

cDNA - DNA complementar

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

H.E - Hematoxilina e eosina

IMC - Índice de massa corpórea

mRNA - RNA mensageiro

MSP-PCR - Reação em cadeia da polimerase específica para metilação

NF2 - Neurofibromatose tipo 2

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Salina fosfatada tamponada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDGF-B - Fatoro de crescimento derivado de plaqueta B

QR - quantificação relativa (PCR em tempo real)

RA - Receptor de Androgênio

RE - Receptor de estrogênio

RNA - Ácido Ribonucleico

RP - Receptor de Progesterona

TCE - Traumatisco crânio-encefálico

SUMÁRIO

1. Introdução.....1

2. Revisão da Literatura.....4

2.1 Aspectos gerais dos meningiomas.....5

2.2 Meningiomas e Câncer de Mama.....15

2.3 Biologia Molecular em Meningiomas.....16

2.4 *BRCA1* e Meningiomas.....19

3. Objetivos.....22

4. Pacientes e métodos.....24

4.1 Casuística.....25

4.2 Métodos.....27

4.3 Análise Estatística.....37

5. Resultados.....38

5.1 Dados Epidemiológicos......39

5.2 Metilação de *BRCA1*......41

5.3 Expressão de *BRCA1*.....43

5.4 Receptores de Progesterona e Estrógeno.....44

6. Discussão.....49

7. Conclusões.....61

8. Referências.....63

9. Anexo.....71

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os meningiomas representam a essência da Neurocirurgia no tratamento das doenças tumorais do Sistema Nervoso Central. Dentre os vários tipos histológicos de tumores e neoplasias que acometem o encéfalo, os meningiomas representam um grupo que, quando em condições que favoreçam o tratamento ideal, podem trazer cura sem *déficits* neurológicos adicionais. Cushing, em 1922, fez a seguinte afirmação: *"Não há nada na esfera da cirurgia atual mais gratificante que a remoção com sucesso de um meningioma com perfeita recuperação funcional subsequente".*

Os primeiros relatos de meningioma se dão a partir do século XVII, entretanto, fósseis datados de 365.000 anos atrás apresentam sinais sugestivos destes tumores (CZARNETSKI *et al.,* 2003). A partir do século XX, com a implementação de exames de imagem e novas técnicas cirúrgicas, o tratamento dos meningiomas evoluiu e foram possíveis melhores resultados. Em paralelo, o conhecimento sobre alterações genéticas em meningiomas tem aumentado consideravelmente e já contribui para o raciocínio diagnóstico para tais tumores em algumas síndromes. Entretanto, a compreensão da biologia molecular em meningiomas ainda é vasto campo de estudo, a despeito dos inúmeros esforços na tentativa de identificar alvos moleculares que estejam envolvidos na tumorigênese e progressão tumoral, e pode trazer valiosas informações complementares ao diagnóstico histopatológico (HASHIMOTO et al., 2002).

Segundo Harvey Cushing, "um meningioma é, de várias formas, a alma da neurocirurgia. O progresso no tratamento de meningiomas reflete os avanços em neurocirurgia, enquanto os avanços em neurocirurgia são colocados ao máximo

uso para melhorar o tratamento de meningiomas". A biologia molecular é mais uma ferramenta que auxiliará o avanço no conhecimento da bilogia, diagnóstico e alvos terapêuticos de meningiomas.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais dos meningiomas

Dados epidemiológicos

Existem poucos dados epidemiológicos no Brasil referentes a meningiomas, sendo que a maioria destes é proveniente de casuísticas internacionais. Segundo Wiemels e colaboradores (2010), são vários os desafios que dificultam o estudo de meningiomas: 1) são tumores relativamente raros e que exigem estudos multicêntricos para grandes casuísticas; 2) grande período de latência tumoral, geralmente entre 20 a 30 anos e 3) prevalência de tumores subclínicos em mais de 2,8% da população, sugerindo que o número de casos não diagnosticados seja superior aos casos diagnosticados (WIEMELS *et al,* 2010).

A prevalência dos meningiomas é estimada em 97,5 para cada 100.000 habitantes, correspondendo a 20% dos tumores intracranianos no sexo masculino e 38% no feminino (CLAUS *et al.,* 2005). De forma geral, os casos sintomáticos representam de 13 a 26% dos tumores intracranianos, atrás apenas dos gliomas malignos (HANSSON *et al.,* 2007*).* Entretanto, meningiomas são considerados os tumores intracranianos mais frequentes quando considerados casos subclínicos, achados de exame e necropsias. Estudos que consideram meningiomas subclínicos, diagnosticados em achados de imagem e necropsias, estimam taxas de incidência superior a 2,8% na população geral (KRAMPLA *et al,* 2004; VERNOOIJ *et al*, 2007). Rausing e colaboradores sugerem que cerca de

90% dos meningiomas são subdiagnosticados por não apresentarem comprometimento clínico (RAUSING *et al,* 1970).

Segundo dados da Central de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS), a taxa de incidência de meningiomas aumenta com a idade para ambos os sexos, entretanto a incidência no sexo feminino é duas a três vezes maior em mulheres após a puberdade até próximo aos 50 anos. No período pré-puberal, a proporção dos raros casos é equivalente para ambos os sexos e após os 50 anos também há acentuada redução da razão feminino:masculino (CBTRUS 2009-2010). (LI *et al.,* 2009; MENON *et al.,* 2009). A TABELA 1 mostra a taxa de incidência de meningiomas por faixa etária.

TABELA 1 - INCIDÊNCIA POR FAIXA ETÁRIA EM MENINGIOMAS

Idade	0-19	20-34	35-44	45-54	55-64	65-74	75-84	85+
Incidência	0,12	0,74	2.62	4,89	7,89	12,79	17,04	18,86

CBTRUS 2009-2010

Aspectos étnicos também parecem ter significância na incidência de meningiomas. Negros não-hispânicos têm incidência maior (6,67) que brancos (5,94) e brancos não hispânicos (5,90) (CBTRUS 2009-2010).

As taxas de mortalidade em pacientes portadores de meningiomas apresentam múltiplos vieses, relacionados principalmente a casuística, topografia e tamanho das lesões incluídas, casos tratados conservadoramente, diferentes graus de ressecção cirúrgica e falta de notificação. Estudos populacionais da década de 90 apontam taxa de sobrevida de 5 anos variando de 73 a 94% dos casos (SANKILA *et al.,* 1992; PRESTON-MARTIN *et al.,* 1993).

Patologia

Localização

Meningiomas tem origem meningotelial, especificamente das células da aracnoide e, tem localização supratentorial mais frequente, provavelmente em consequência do maior número destas células nesta região. Sua distribuição topográfica pode ser observada na TABELA 2, de acordo com Buertow *et al.* (1990).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DE MENINGIOMAS

Convexidade	20-34%
Parassagital (inclui Foice)	18-22%
Esfenoide e Fossa Média	17-25%
Fronto-basal	10%
Tentorial	2-4%
Convexidade Cerebelar	5%
Ângulo Ponto-Cerebelar	2-4%
Clivus	<1%
Intraventricular	2-5%
Orbital	1-2%
Ectópico	<1%

BUERTOW *et al* (1990)

Destaca-se que o espaço intraventricular não apresenta células da aracnoide, porém raramente meningiomas podem se desenvolver nessa

topografia. A origem deste tumores intraventriculares é controversa, e pode estar associada a remanescentes de células aracnoides junto ao plexo coroide (ZANINI *et al.,* 2011)

Apresentação Geral

De forma geral, os meningiomas apresentam-se como lesões únicas, arredondadas e bem delimitadas, separáveis do parênquima cerebral e com ampla base aderida a dura-máter. Entretanto, a apresentação "*en plaque"* pode ocorrer em casos raros, a maioria em relação com a asa do esfenoide e seio cavernoso e associado a hiperostose. (BUERTOW *et al.,* 1990). Quando há a ocorrência de duas ou mais lesões simultâneas, estas são consideradas como meningiomas múltiplos e estão associados a neurofibromatose tipo 2.

Histopatologia

Os meningiomas apresentam uma grande variedade de tipos histológicos e inúmeras classificações foram propostas desde a classificação original, em 1931. A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é atualmente a mais aceita e divide os meningiomas em: Benigno (grau I); Atípico (grau II) e Anaplásico/Maligno (grau III) (LOUIS *et al.,* 2007), conforme aspectos histológicos como número de mitoses, presença de necrose, invasão cortical. Alguns subtipos histológicos são descritos e estão relacionados a maior chance de recidiva tumoral, observada nos graus II e III da OMS.

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO OMS PARA MENINGIOMAS 2007	
Meningotelial	Grau I OMS
Fibroso (Fibroblástico)	Grau I OMS
Transicional	Grau I OMS
Psamomatoso	Grau I OMS
Angiomatoso	Grau I OMS
Microcístico	Grau I OMS
Secretor	Grau I OMS
Linfoplasmocítico	Grau I OMS
Metaplásico	Grau I OMS
Cordóide	Grau II OMS
Células Claras	Grau II OMS
Atípico	Grau II OMS
Papilar	Grau III OMS
Rabdóide	Grau III OMS
Anaplásico (Maligno)	Grau III OMS

Comportamento Biológico

Considerando-se que parte dos meningiomas são sub-diagnosticados por não apresentarem sintomas, o conhecimento da história natural desses tumores tem grande importância na decisão do tratamento proposto, principalmente nos casos de achados de imagem durante investigações clínicas. Dados obtidos ao

longo do tempo permitiram esclarecimento acerca da taxa e fatores preditivos de crescimento OYA *et al*., 2011)

Taxa de Crescimento

Caracteristicamente, os meningiomas grau I têm crescimento lento. Olivero e colaboradores, em 1995, relataram que 78% dos casos não aumentaram de tamanho em seguimento de 2,5 anos, com taxa de crescimento de 0,24 cm/ano nos casos restantes (OLIVERO *et al.,* 1995). Em outra casuística, 37,3% dos casos apresentaram crescimento em 5 anos de acompanhamento, com taxa de crescimento de 1,9 mm/ano (YANO *et al.,* 2006). Hashiba e colaboradores, em 2009, estudaram 70 casos e observaram ausência de crescimento tumoral em 26 casos (37%). Nos casos restantes, 16 apresentaram padrão de crescimento exponencial, 15 padrão linear e 13 sem padrão definido (HASHIBA *et al.,* 2009).

Fatores Preditivos para Crescimento Tumoral

A presença de lesões com calcificações em exames de imagem e imagem hipo ou isointensa na janela T2 de ressonância magnética tiveram significância estatística para não crescimento tumoral (CHAMOUN *et al.,* 2011)

Hashiba e colaboradores (2009) sugeriram que exames de imagem com edema peri-tumoral, bordas tumorais ambíguas e forma irregular possam ser fatores preditivos para o crescimento de meningiomas. Pacientes com idade menor que 60 anos apresentaram taxa de crescimento e tempo de duplicação mais altos que pacientes mais idosos (NAKAMURA *et al.,* 2003). O tamanho inicial das lesões também pode ter valor preditivo para o crescimento tumoral e

lesões maiores devem ser acompanhadas com mais cuidado (YONEOKA *et al,* 2000).

Fatores de Risco

Hormônios

A maior incidência de meningiomas no sexo feminino após o inicio da puberdade desperta a atenção para a influência de fatores hormonais, especialmente hormônios sexuais, no desenvolvimento destes tumores. A incidência de meningiomas aumenta com a idade para ambos os sexos. No entantoe, a razão entre as taxas de incidência de mulheres por homens diminui a partir dos 50 anos (WIEMELS *et al.,* 2010), coincidentemente com o inicio do climatério. Em 2003, Jhawar e colaboradores concluíram que mulheres expostas a influência de hormônios exógenos e endógenos têm risco aumentado para meningiomas. Além disso, observaram também que pacientes com maior idade durante a menarca também têm risco elevado (JHAWAR *et al.,* 2003). Em estudo de caso controle recente, o Grupo Interphone sugere maior risco de meningiomas quanto maior número de partos em mulheres com menos de 50 anos (WIGERTZ *et al.,* 2008). O estudo Million Woman Cohort relatou risco aumentado de meningiomas em mulheres com IMC (Índice de Massa Corporal) elevado (BENSON *et al.,* 2008), considerando que maior adiposidade está associada a maior ativação da aromatase, importante enzima na produção de estrógenos.

Apesar de originários de células aracnoideas, que não expressam receptores para hormônios esteroides, os meningiomas frequentemente

apresentam receptores para estrógeno (RE), andrógenos (RA) e progesterona (RP), modificando sua concentração durante o ciclo menstrual e gestação (VADIVELU *et al.,* 2010; CLAUS *et al.,* 2007). Estes receptores apresentam proporções semelhantes entre os sexos masculino e feminino, porém os receptores de progesterona (PR) são mais abundantes que receptores de estrógeno e andrógenos (BOUILLOT *et al.,* 1994; BOZZETTI *et al.,* 1995; KORHONEN *et al.,* 2006;) Segundo Ragel (2005) 75% dos meningiomas apresentam expressão positiva para RP, 63% RA e 22% RE.

Ainda assim, a influência hormonal em meningiomas é campo controverso e que necessita de maiores estudos na identificação do real papel dos hormônios sexuais nestes tumores.

Radiação Ionizante

A radiação ionizante parece exercer importante papel na origem de meningiomas. Preston e colaboradores (2002) observaram aumento na incidência de meningiomas em pacientes sobreviventes da bomba atômica. Baixas doses de radiação ionizante podem ter efeitos na promoção e desenvolvimento destes tumores. Entre a década de 40 e 60, crianças submetidas a tratamento com baixas doses de radiação para tratamento de micoses em couro cabeludo tiveram incidência maior de meningiomas (SADETZKI *et al.,* 2002). Procedimentos diagnósticos e terapêuticos, como raio-x dentário e radioterapia mostraram-se relacionados à incidência de meningiomas (CLAUS *et al.,* 2012). Atualmente, a implementação de novas tecnologias permitiu maior qualidade dos exames de imagem e menor dose de radiação

ionizante dispendida e nenhum grande estudo correlacionou meningiomas e raio-x dentário ou outros exames de imagem recentemente.

Traumatismo Crânio-Encefálico

A associação entre meningiomas e traumatismo crânio-encefálico (TCE) é descrita desde a época de Harvey Cushing, porém carece de estudos consistentes. Pequenas casuísticas, principalmente da década de 80, correlacionaram TCE com risco aumentado para meningiomas (PHILLIPS *et al.,* 2002). Um estudo dinamarquês, com 228.055 casos de TCE entre 1977 e 1992, avaliou a ocorrência de concussão cerebral, fratura de base de crânio ou outras lesões intracranianas e padronizou a taxa de incidência para meningiomas em 1,2 (95% IC 0,8 – 1,7) (INSKIP *et al.,* 1998).

Uso de Telefone Celular

O risco de desenvolvimento de meningiomas por exposição a campos magnéticos, especialmente pelo uso de telefone celular, é tópico de grande interesse público e vem ganhando importância recentemente.

Existem poucas evidencias até o momento que correlacionam meningiomas com o uso de aparelho celular (CLAUS *et al.,* 2005). O Instituto Nacional do Câncer, nos Estados Unidos, avaliou o uso de aparelhos celulares e incluiu 137 casos de meningiomas, com risco relativo de 0,7 (95% IC 0,3; 1,7) (INSKIP *et al.,* 2001).

A intensidade do uso de telefone celular por cada indivíduo é uma variável de difícil mensuração. Poucos estudos levam em consideração a intensidade de exposição e presença de tumor e também os diferentes modelos

de aparelhos celulares. Desta forma, ainda são necessários mais estudos para determinar a real prevalência de meningiomas relacionados ao uso de telefone celular.

Fatores Ambientais

Estudos que buscaram correlações entre dados de meningiomas com fatores ambientais não mostraram associação significativa. Dentre os fatores ambientais, profissões relacionadas a indústria e exposição a substâncias químicas, tipo de dieta e doenças alérgicas não foram relacionados ao desenvolvimento de meningiomas (Brenner *et al.,* 2002; Terry *et al.,* 2009).

História Familiar de Meningioma

Considerando que cerca de 1 a 3% da população total pode desenvolver meningioma, o número total de famílias com vários membros diagnosticados com meningiomas é relativamente raro (WIEMELS *et al.,* 2010). Tal constatação indica, em parte, que amplo espectro da expressão fenotípica está envolvida na herança de meningiomas. Poucos estudos avaliaram a incidência familiar de meningiomas, em geral com pequenas casuísticas. Malmer, em 2003, relatou risco relativo igual a 2.0 em parentes de primeiro grau de portadores de meningiomas (MALMER *et al., 2003).* O mesmo foi observado por Hemminki, em parentes de primeiro e segundo graus com meningiomas, em população da Suécia e Noruega (HEMMINKI *et al., 2009).* Acredita-se que nos casos familiares, a incidência de meningiomas esteja relacionada a alterações do gene *NF2* .

2.2 Meningiomas e Câncer de Mama

A relação entre meningiomas e câncer de mama foi primeiramente observada em 1929, mas somente a partir da década de 80 houve expressivo aumento no número de relatos de casos disponíveis na literatura (MEHTA *et al.,* 1983; BURNS *et al.,* 1986; RUBINSTEIN I et al., 1989; ZON *et al.,* 1989;). Entre estes autores, várias teorias tentaram explicar a relação entre meningiomas e câncer de mama, como a de que meningiomas poderiam ser "metástases benignas" do próprio câncer de mama, ou mesmo de que meningioma poderia ser lesão preditiva para malignidade da mama. Bonito e colaboradores, em 1993, descreveram que meningiomas e câncer de mama não seriam consequência um do outro, e sim tumores distintos com fatores de risco semelhantes (BONITO *et al.,* 1993). De fato, meningiomas e câncer de mama compartilham características clínicas e histopatológicas, como predominância no sexo feminino, incidência aumentada com a idade, expressão para receptores esteroides e crescimento em resposta a hormônios sexuais.

Custer e colaboradores (2002) sugerem a associação significante entre câncer de mama e meningiomas (CUSTER *et al., 2002).* Apesar de pequenas casuísticas, o risco relativo entre meningiomas e câncer de mama é aproximadamente 2,0.

As vias tumorigênicas de ambos os tumores ainda carecem de estudos adicionais e, a relação entre meningiomas e câncer de mama levanta interesse a respeito de alterações moleculares comuns a ambos os tumores.

2.3 Biologia Molecular em Meningiomas

O papel da biologia molecular na compreensão dos vários tipos de tumores já é consagrado ao longo da história das doenças oncológicas, e contribui para o entendimento dos mais variados mecanismos que culminam com a gênese e desenvolvimento tumoral. Neste contexto, os meningiomas têm importante participação, pois foram os primeiros tumores sólidos a ter identificada uma alteração genética: monossomia do cromossomo 22 (ZANG *et al., 1967).* Desde então, as alterações no cromossomo 22 foram intimamente associadas aos meningiomas, incluindo o gene *Neurofibromatose Tipo 2 (NF2)*, contido no braço longo deste cromossomo (ROULEAU *et al.,* 1993; HANSSON *et al.,* 2007*).* A Síndrome da Neurofibromatose Tipo 2 (NF2) está associada a ocorrência de meningiomas em 50% dos casos, sendo estes o segundo tipo de tumor mais frequente nesta síndrome. O gene *NF2* foi rastreado em meningiomas, e sua inativação varia de 20 a 60% na literatura (RUTTLEDGE *et al, 1994*; LEKANNE *et al., 1994*; EVANS *et al., 2001*). De forma geral, considera-se que este gene está alterado em metade dos casos de meningiomas, permitindo a divisão destes tumores em dois grupos, considerando-se o ponto de vista molecular: 1) Meningiomas *NF2* alterado; 2) Meningiomas *NF2* intacto.

Meningiomas *NF2* alterado

Alterações Estruturais

O gene *NF2* está localizado no braço longo do cromossomo 22 e é considerado como supressor tumoral. As alterações do cromossomo 22q e *NF2*

são observadas em cerca de 50% dos casos. A proteína codificada por esse gene, conhecida como Schannomina ou Merlin (LOUIS *et al., 2000*), atua no citoesqueleto (inibição por contato) e na regulação da motilidade e do crescimento celular (RAGEL *et al., 2009*). Alterações do *NF2* levam a inativação da proteína Merlin, resultando em menor adesão celular e tumorigênese (IKEDA *et al.,* 1999). De acordo com Lee, a redução da expressão da proteína Merlin foi demonstrada frequentemente em meningiomas esporádicos (LEE *et al,* 1997*).*

As alterações do 22q ou do gene *NF2* também parecem influenciar nos subtipos histológicos e topografia dos meningiomas. Segundo Evans e colaboradores, as alterações do *NF2* raramente estão associadas ao subtipo meningotelial, e são mais frequentes nos subtipos transicional e fibroso (EVANS *et al.,* 2001).

O silenciamento epigenético do gene *NF2* foi avaliado por dois grupos, porém com resultados conflitantes. van Tilborg e colaboradores avaliaram 21 casos de meningiomas, onde apenas 1 caso apresentou metilação da região promotora do *NF2* (VAN TILBORG *et al.,* 2006). Lomas, em 2005, observou frequência maior de metilação do gene *NF2*, 23 em 88 casos (LOMAS *et al.,* 2005).

Meningiomas *NF2* intacto

Alterações Estruturais

As alterações do gene *NF2* e do cromossomo 22q, presentes em aproximadamente metade dos casos de meningiomas, suscitam o interesse por novos alvos moleculares que possam colaborar para a promoção e desenvolvimento destes tumores, principalmente nos casos *NF2* intacto.

Análises citogenéticas mostram que a deleção do braço curto do cromossomo 1 é a segunda alteração mais frequente em meningiomas e está associado a promoção e progressão destes tumores (RAGEL *et al., 2009*) (AL-MEFTY *et al, 2004).* Entretanto, nenhum gene localizado neste cromossomo foi associado, até o momento, a meningiomas. Segundo Ketter e colaboradores, meningiomas 1q alterados tiveram taxa de recorrência de 30% contra 4,3% daqueles sem alteração do braço curto do cromossomo 1 (KETTER *et al*, 2001).

Outros cromossomos também têm alterações descritas em meningiomas, incluindo cromossomos dicentricos ou em anel, deleções de braços 1p, 6q, 7, 9p, 10, 14q, 18q, 19 ou 20 ou amplificação 1q, 9q, 12q, 15q, 17q ou 20q (KETTER *et al*, 2001; RAGEL *et al., 2009*). Genes localizados nestes cromossomos parecem ter papel no desenvolvimento dos meningiomas, assim como associação com a graduação histológica. Segundo Ragel e colaboradores, deleções 14q são mais frequentes em grau I, ao passo que alterações 9p, onde estão contidos *CDKN2A*, *CDKN2B* e *p14ARF*, estão associados à progressão maligna.

Outros genes supressores também parecem ter papel na progressão de meningiomas. Segundo Pham e colaboradores, o gene *DAL1* no braço longo do cromossomo 18, *TIMP1* e *TIMP3*, respectivamente localizados no Xp e 22q, têm papel também na progressão e agressividade tumoral de meningiomas (PHAM *et al,* 2011).

Alguns oncogenes podem estar associados ao desenvolvimento e aumento do grau histológico. O gene *c-sis*, no cromossomo 22q, está diretamente relacionado com fator de crescimento derivado de plaqueta B (PDGF-B), e relaciona-se com o crescimento celular e desenvolvimento dos meningiomas. O mesmo ocorre com o *c-myc* e *c-fos*, localizados no 8q e 14q (KAZUMOTO *et al.,*

1990). Ragel e colaboradores descrevem em seu trabalho (2009) alguns oncogenes relacionados à tumorigênese de meningiomas, como *HA-ras* e *c-mos*, e também à progressão do grau histológico, entre eles *TP73* e *BCL2.* Recentemente, o gene *STAT3* foi hiper-expresso em meningiomas de alto grau, segundo demonstrou Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.,* 2010).

Segundo van Tilborg e colaboradores, as alterações epigenéticas, entre elas a metilação das regiões promotoras de genes de supressão tumoral, não são extensas em meningiomas *NF2* intacto (VAN TILBORG *et al*., 2005). Dentre os genes estudado por van Tilborg e colaboradores, apenas os genes *p14ARF, CDH1, BRCA1* e *RB1* apresentaram silenciamento por metilação da região promotora da transcrição.

2.4 *BRCA1* e Meningiomas

A correlação entre meningiomas e câncer de mama destaca que possíveis alterações genéticas podem ser compartilhadas por ambos os tumores em suas vias de origem. O gene *BRCA1* tem papel conhecido na neoplasia de mama, principalmente nos casos de câncer de mama hereditário, mas também já foi descrita sua alteração relacionada aos tumores esporádicos. O gene *BRCA1* está localizado na região 17q21 e considerado como supressor tumoral, inibindo a proliferação celular na mama e ovário, além de promover a apoptose celular em fibroblastos murinos (HOLT *et al.,* 1996). A proteína BRCA1 parece ter função no reparo de genes durante a divisão celular e na modulação de RE e RP, inibindo

sua sinalização (FAN *et al,* 2002) (DENG *et al.,* 2006; KATIYAR *et al*., 2006; MA *et al.,* 2006). A perda do gene *BRCA1* confere 87% de chance de câncer de mama e 44% de câncer de ovário ao longo da vida (EASTON *et al.,* 1993; FORD *et al.,* 1994). A ausência de *BRCA1* é alteração potencial para permitir efeitos mitogênicos relacionados a resposta a hormônios sexuais (ZHENG *et al.,* 2001).

Apesar do amplo conhecimento das alterações de *BRCA1* em neoplasias de mama, poucos estudos disponíveis na literatura correlacionam alterações moleculares desse gene com meningiomas.

Apenas o estudo de Kirsch em 1997 tentou correlacionar alterações mutacionais de *BRCA1* com meningiomas, mas não observou significância (KIRSCH *et al.,* 1997). Entretanto, Jun e colaboradores (2008) concluem que as alterações epigenéticas parecem ter papel predominante em meningiomas em relação a outras alterações moleculares. Dentre as alterações epigenéticas, a metilação é considerada a mais importante, e consiste na adição de um radical metil no carbono 5 das citosinas que compõem as ilhas CpG da região promotora, levando ao silenciamento do gene, conforme demonstrado na figura 1.

FIGURA 1 - METILAÇÃO



Considerando a correlação de meningiomas com câncer de mama e o possível papel dos hormônios sexuais no desenvolvimento deste tumores, a investigação do silenciamento por metilação de *BRCA1* em meningiomas ainda permanece praticamente inexplorada na literatura. Assim, questiona-se: a metilação de *BRCA1* estaria associada ao desenvolvimento de meningiomas?

Objetivos

3. OBJETIVOS

- Avaliar o padrão de metilação de *BRCA1* em meningiomas e tecidos controle;

- Avaliar a expressão de *BRCA1* em meningiomas em relação aos tecidos controles;

- Avaliar a expressão de receptores de progesterona e estrógeno em meningiomas e tecidos controles;

- Correlacionar os dados obtidos com dados epidemiológicos da casuística.

Pacientes e Métodos

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Casuística

Seleção de casos

Previamente a seleção dos casos, este projeto foi submetido a aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas no estudo.

Pacientes portadores de meningiomas, que foram operados de acordo com a rotina de atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti da Prefeitura Municipal de Campinas, foram convidados a participar da pesquisa. Foram admitidos como critério de inclusão no estudo (1) a presença ou suspeição de meningioma com indicação neurocirúrgica formal, incluindo casos de recidivas, e (2) o expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestados pelo paciente ou pelo seu responsável legal previamente à cirurgia através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO II). Foram automaticamente excluídos do estudo (1) pacientes com tumores pequenos, dos quais se obteve material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico e/ou outros exames necessários e (2) pacientes ou responsáveis legais que não tenham conseguido compreender suficientemente

as diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Seleção de Controles – Aracnoide Normal

Como parâmetro de normalidade, cerca de 10 (dez) amostras de aracnoides normais foram obtidas de cadáveres provenientes do Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Foram admitidos como critério de inclusão no estudo (1) casos em que a doença de base em nada remeta à presença de neoplasia intra ou extra-SNC, (2) a coleta de 02 amostras de tecidos não tumorais (± $3mm^3$) sem que houvesse qualquer modificação do procedimento habitual ou prejuízo ao exame necroscópico e histopatológico. Foram automaticamente excluídos do estudo: (1) diagnóstico prévio ou suspeição da presença atual de tumores intra ou extra-SNC; (2) histórico de neoplasia primária do SNC; (3) pacientes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade e (4) pacientes dos quais se obteve material escasso ou indissociável para o estudo necroscópico, histopatológico ou outros exames necessários.

4.2 Métodos

Armazenamento das Amostras

As amostras tumorais ou teciduais selecionadas em procedimento cirúrgico ou necropsia foram acondicionadas separadamente em tubos plásticos contendo RNA Latter, identificadas através de códigos e imediatamente transferidas em isopor para armazenamento em *freezer* a -80ºC., no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da FMB. Nos tecidos de origem tumoral, realizou-se cortes histológicos sob congelação (criostato) seguida da coloração pela hematoxilina-eosina objetivando o diagnóstico histopatológico preliminar e a confirmação do predomínio de células tumorais (≥ 80%) nos fragmentos obtidos. Amostras com tecido tumoral pouco representativo foram mantidas congeladas a -80ºC até a avaliação histopatológica definitiva (realizada através da peça cirúrgica principal enviada ao laboratório de patologia clínica). Confirmada a adequação do material, as amostras teciduais foram processadas para a extração de DNA e de RNA.

Extração de DNA

Fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mg de tecido tumoral ou controle foram macerados manualmente utilizando-se pistilo e nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada pelo QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN®)

seguindo instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com 600 µL de solução para lise nuclear, 3 µL de solução *RNAse* e 200 µL de solução para precipitação de proteica. Após centrifugação, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para tubo de microcentrífuga e misturado a 600 µL de isopropanol, formando massa visível. Após retirada de isopropanol, foi adicionada 600 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto. O etanol foi aspirado por pipeta de Pasteur e repetida nova lavagem com etanol e centrifugação nas mesmas condições. Para finalizar, após secagem do tubo em papel absorvente, foi adicionada 50 µL de solução para re-hidratação do DNA e mantido em incubação *overnight* em temperatura ambiente. Após extração, o material genético foi conservado em congelador a -80°C.

Tratamento com Bissulfito de Sódio

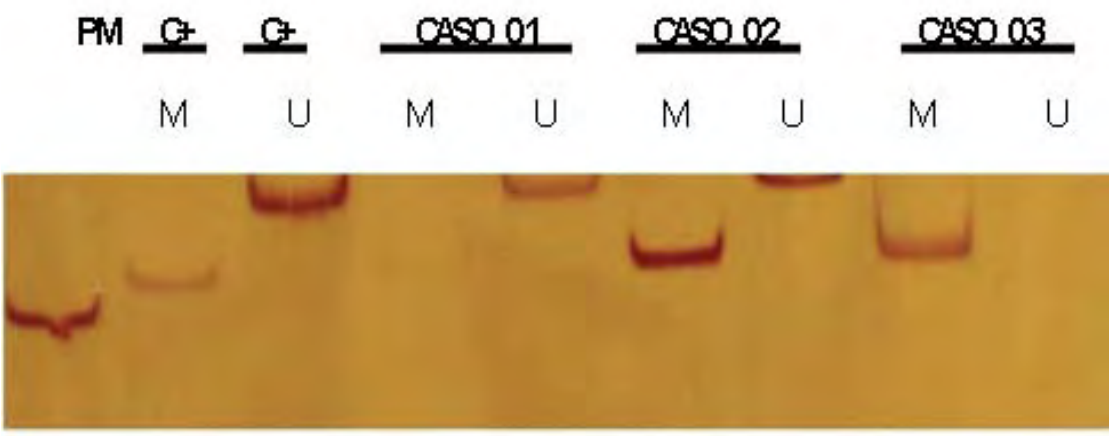
O tratamento de DNA com bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracilas, e conserva as citosinas metiladas, conforme descrito por Herman e colaboradores (HERMAN *et al.,* 1996)

O material genético foi desnaturado em banho maria a 80°C e adicionados 1 µL de esperma de salmão e 2 µL de NaOH 3M. A seguir, 500 µL de solução de bissulfito de sódio e hidroquinona foi adicionada ao DNA desnaturado e posteriormente incubado a 70°C por 3 horas. Após incubação, o material foi purificado por *Kit Wizard Gel* e *PCR Clean System* (QIAGEN®) e conservado a -80°C.

PCR específica para metilação

O padrão de metilação para *BRCA1* foi determinado por Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-Específica (MSP-PCR) com 2,0 microgramas de DNA tratado com bissulfito de sódio. Cem nanogramados do DNA modificado por bissulfito foram amplificados, utilizando *primers* específicos para DNA metilado e não metilado. As condições de PCR foram 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 90 segundos, resfriamento até 57-59°C para anelamento dos *primers* por 1 minuto, seguido de aumento da temperatura para 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. A análise dos resultados da MSP-PCR foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.

FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA



A análise dos resultados foi realizada de acordo com os padrões contidos na Tabela 4

TABELA 4 - ANÁLISE DOS RESULTADOS MSP-PCR

AMPLIF. *PRIMERS* METILADOS	AMPLIF. *PRIMERS* NÃO-METILADOS	RESULTADO DA AMOSTRA
Negativo	Positivo	Não-Metilado
Positivo	Positivo	Metilado
Positivo	Negativo	Metilado

Extração RNA

A extração de RNA foi realizada em tecidos tumorais e amostras controle conforme protocolo do *RNeasy Plus Universal Mini Kit* (QIAGEN®).

Foram utilizados fragmentos de 20 mg de tecidos e adicionados 600 µL de PBS (*phosphate-buffered saline*), seguido de 350 µL de álcool 70% após homogeneização. A seguir, 700 µL da amostra foi pipetada em minicoluna *RNeasy* e centrifugada por 15 segundos a 10000 rpm. Nova centrifugação foi realizada após adição de 700 µL de Buffer RW1. A coluna *RNeasy* foi transferida para novo tubo coletor e adicionado 500 µL de Buffer RPE, seguido de centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm. Após, mais 500 µL de Buffer RPE

foram adicionados, seguindo nova centrifugação nas mesmas condições, desta vez por 2 minutos. Para eluição, a coluna *RNeasy* foi transferida para novo tubo coletor e adicionado 30 a 50 µL de água *RNase-free* seguida de centrifugação.

Síntese de DNA complementar e PCR em tempo real

A análise da expressão gênica para *BRCA1* foi conduzida em amostras de RNA extraído de tecidos tumorais e controles. Após extração do RNA, procedeu-se transcrição reversa com *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (AppliedBiosystems - ABI). Para cada 5ng de RNA, foram adicionados 0,75 µL de RT Buffer, seguido de 0,075 µL de dNTP's, 1,5 µL de *primers* específicos e 0,5 µL da enzima MultiScribe™, 0,094 µL de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5 µL, sendo as amostras incubadas em termociclador automático (ABI Prism 7500, EUA) por 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e em seguida 4°C. Os ensaios dos *primers* e da sonda para os gene *BRCA1* e *ACTB* foram delineados pela Applied Biosystems. Para amplificação, foi utilizado o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (ABI) em termociclador automático (ABI Prism 7500, EUA). Os valores para cada amostra foram normalizados pela razão entre os valores obtidos para o gene estudado e para o gene de referência *ACTB* (Beta-actina). Os ensaios dos *primers* e da sonda para os genes *BRCA1* e *ACTB* foram delineados pela *AppliedBiosystems*.

A análise de expressão gênica foi baseada na quantificação relativa (QR) do gene *BRCA1*, utilizando um *pool* de 10 (dez) amostras obtidas de meninges dos controles normais (cadáveres) como calibrador, ou seja, a QR foi obtida pela

razão entre a expressão de cada amostra tumoral (meningioma) e o *pool* dos tecidos-controle, como demonstrado abaixo:

$$QR = \frac{\text{Expressão Tumor}}{\text{Expressão } \textit{Pool} \text{ Normais}}$$

Para valores da razão T/N maiores que 1, foi considerado um aumento da expressão de *BRCA1* no tumor quando comparado ao tecido não-tumoral (*pool*); os valor menores que 1 indicam redução da expressão de *BRCA1* no tumor quando comparado ao tecido não-tumoral (*pool*).

Avaliação da expressão de RP e RE

A expressão de RP e RE em tecidos tumorais e controle foi realizada por técnica de imuno-histoquímica, segundo rotina realizada pela disciplina de Patologia da FMB.

Lâminas de tecidos tumorais e controle foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (H.E.) após serem cortadas em micrótomos rotativos manuais, em cortes de 04 micras. Após a leitura das lâminas, foram selecionadas áreas específicas de meningiomas e aracnoides controles. Feita a marcação nestas lâminas, os fragmentos selecionados foram encaminhados para arranjo em matrix de amostra de tecidos (tissue microarray - TMA). Com o uso de um aparelho Pathology Devices™ (Pathology Devices, Silver Spring, MD, USA) foram confeccionados blocos de TMA conforme especificações do fabricante, seguindo-se as seguintes etapas: 1. Marcação da área selecionada no respectivo bloco de

parafina; 2. Utilização do aparelho para criar espaço vazado (“casela”) no bloco receptor; 3. Extração de um cilindro tecidual do bloco doador com 1 mm de diâmetro da respectiva área de interesse previamente selecionada; 4. Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor; 5. Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial; 6. Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento.

Foram obtidos cortes histológicos com 4 micra de espessura dos blocos de TMA, que foram aderidos a lâminas silanizadas (3-aminopropiltrietoxi-silane; Sigma Chemical, Co;USA), desparafinizadas em estufa a 60C , hidratadas em passagens de xilol, álcool absoluto,álcool a 70% e água destilada. Não serão utilizadas fitas adesivas. As figuras 2, 3 e 4 mostram como demonstra uma lâmina TMA corada com H. E.

FIGURA 3 - LÂMINA TMA CORADA COM H.E EM AUMENTO DE 2X

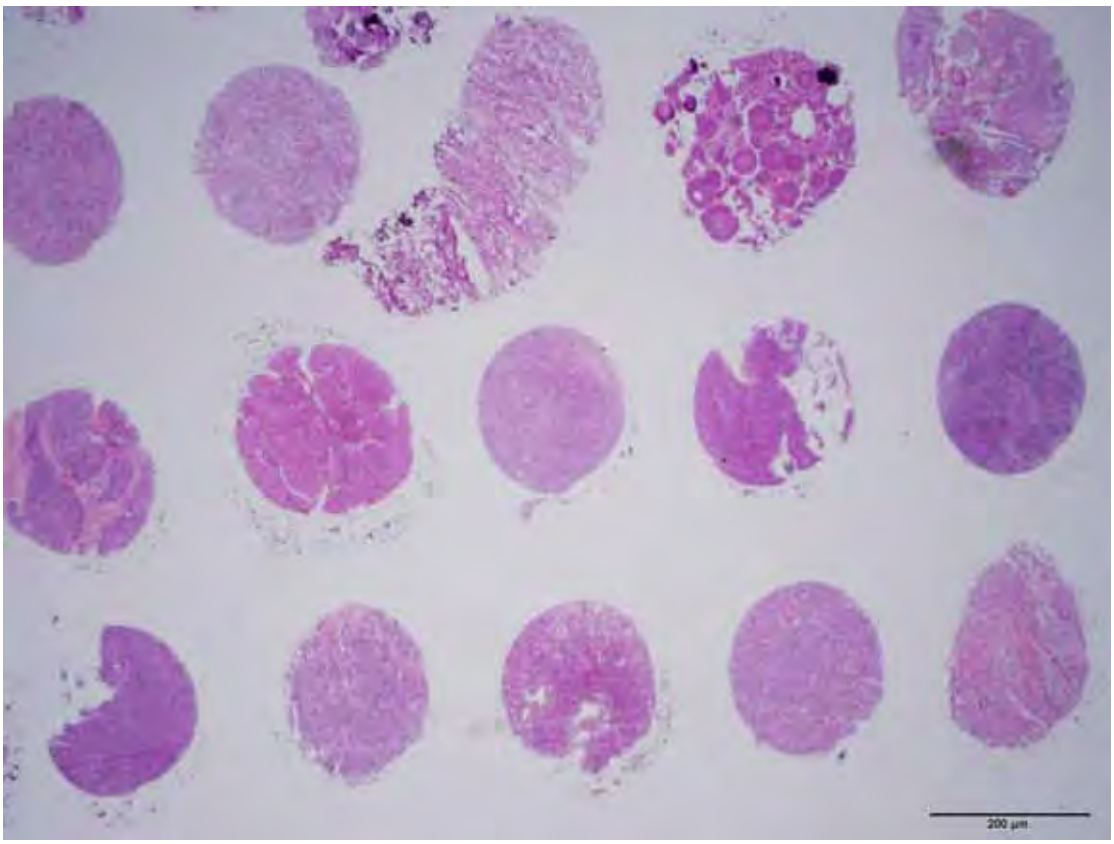


FIGURA 4 - LÂMINA TMA CORADA COM H.E. EM AUMENTO DE 4X

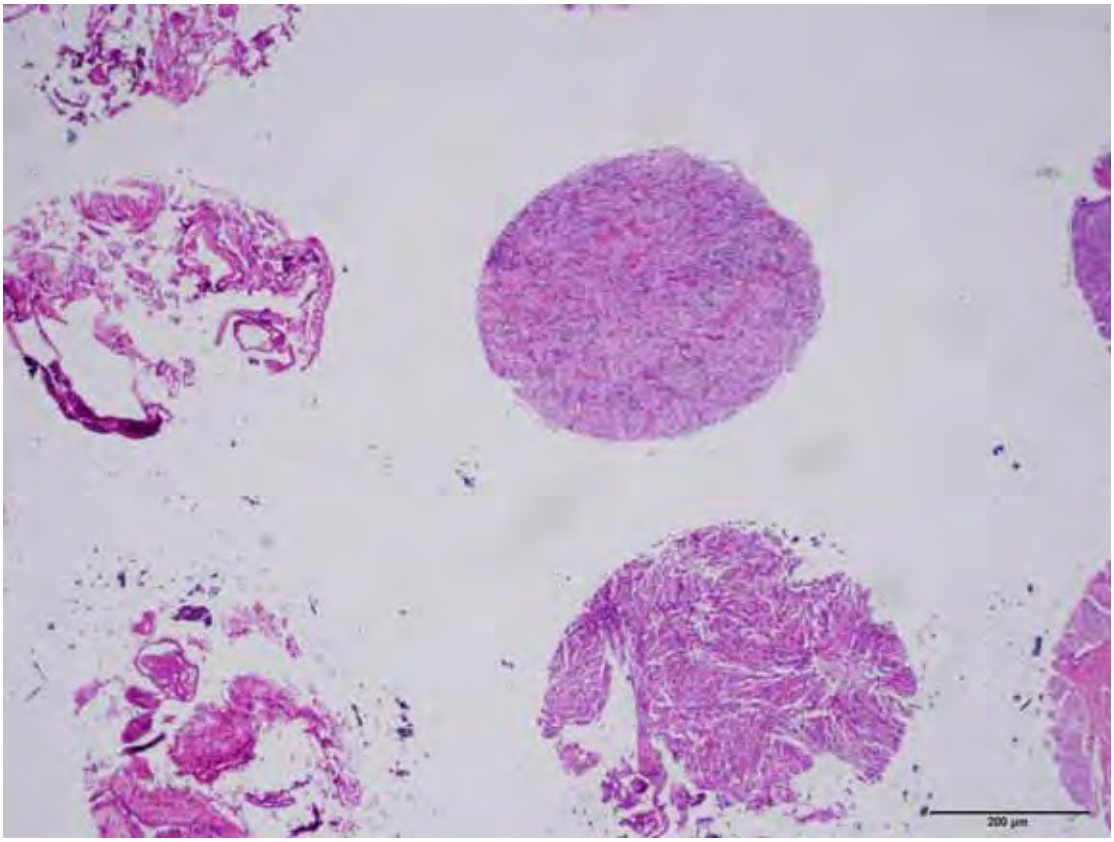
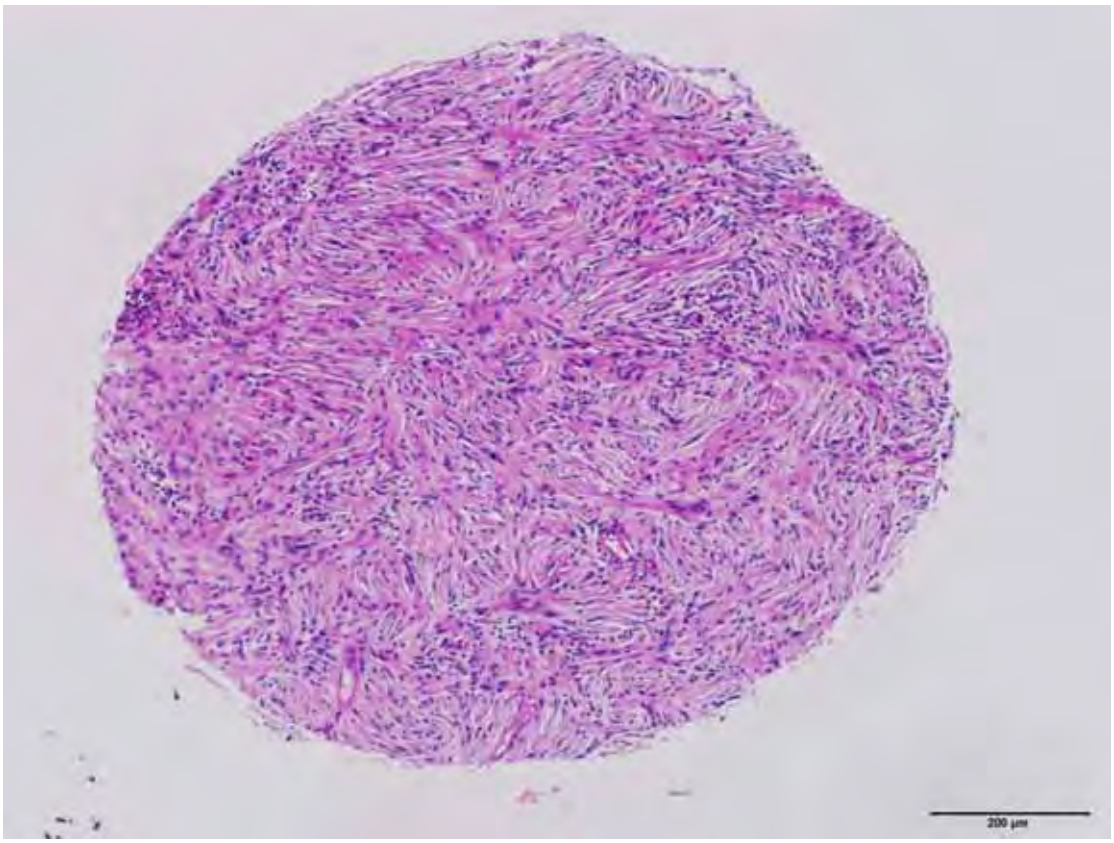


FIGURA 5 - LÂMINA TMA CORADA COM H.E EM AUMENTO DE 10X



Após a construção dos blocos de TMA, foram realizadas reações de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para receptores de estrógeno e receptores de progesterona nas amostras de meningiomas e aracnoides normais. Os resultados obtidos foram comparados com controles, conforme rotina realizada pelo serviço de Patologia.

4.3 Análise Estatística

Foram realizada análise descritiva dos resultados encontrados por meio de frequências, média e porcentagens. Para a associação entre variáveis observadas, foi aplicado Teste exato de Fisher.

Resultados

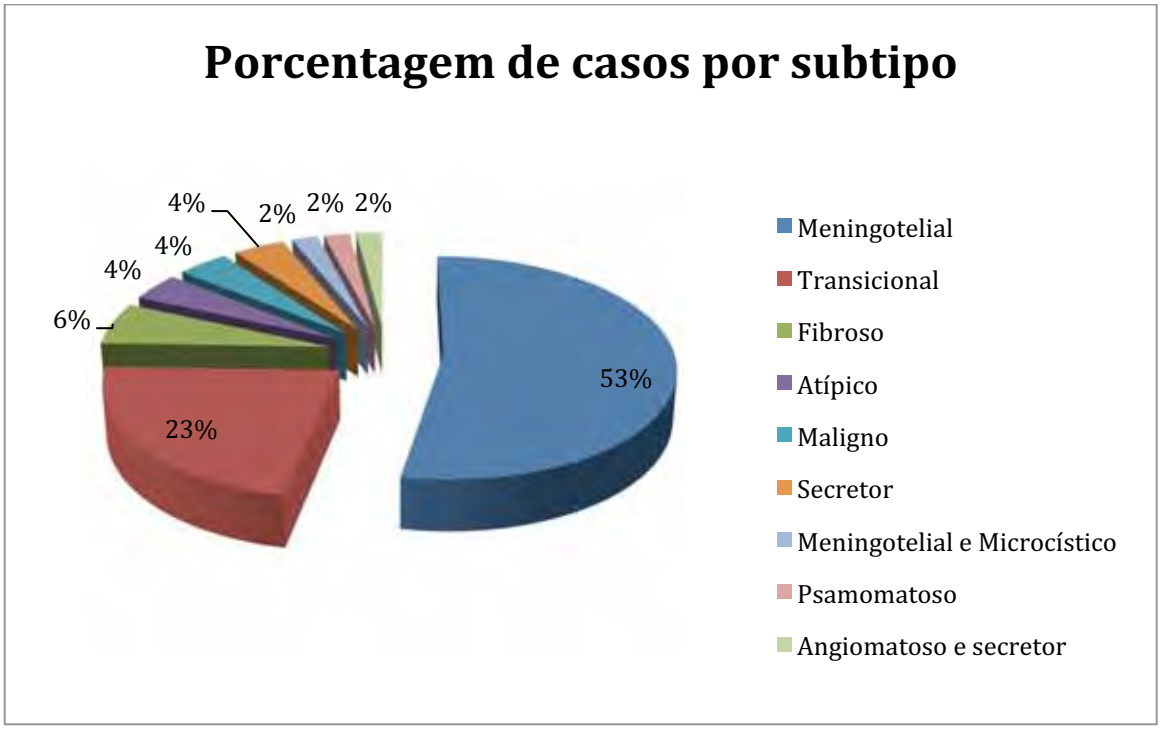
5. RESULTADOS

5.1 Dados Epidemiológicos

Foram incluídos 50 meningiomas operados segundo a rotina da disciplina de neurocirurgia da HC-FMB. Destes, 28 eram do sexo feminino e 22 do sexo masculino. A média de idade no sexo feminino foi 52,5 anos, com idades variando entre 28 e 85 anos. Para o sexo masculino, a média de idade foi 54,3 anos, com idade variando entre 39-72 anos.

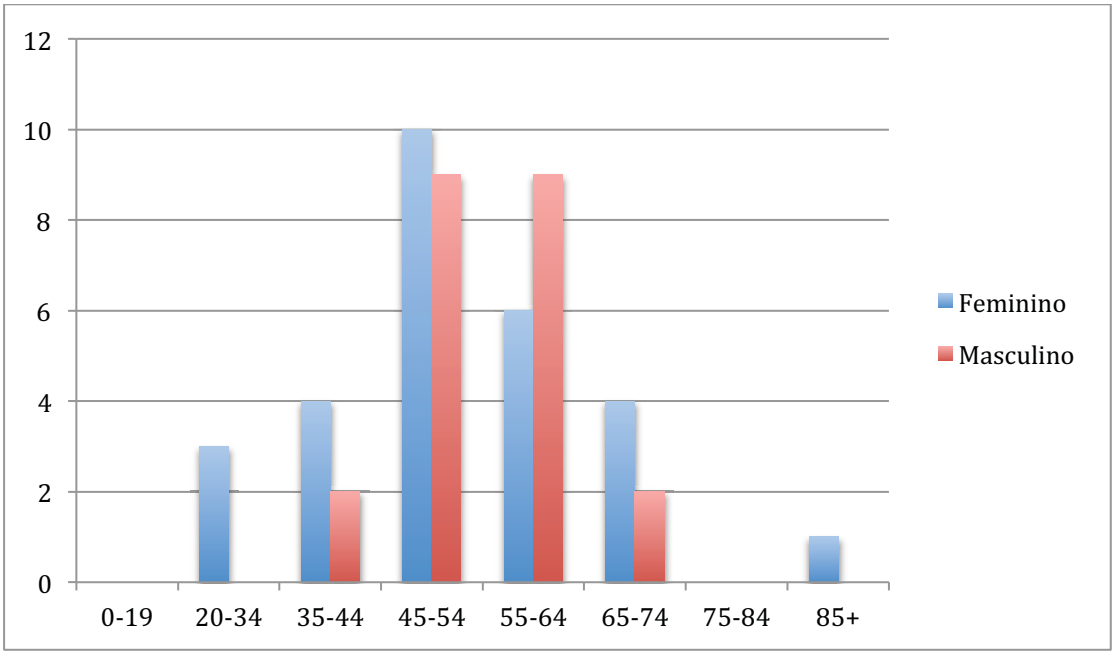
Entre os subtipos histológicos, o meningotelial foi o observado em 26 casos (53%) e o transicional em 11 casos (22%). Meningiomas grau II e III compuseram 8% da casuística, sendo dois casos para grau II e 2 casos para o grau III. A distribuição completa dos subtipos histológicos pode ser observada na FIGURA 6.

FIGURA 6 - SUBTIPOS DE MENINGIOMAS



A distribuição dos casos concentrou-se entre 35 e 74 anos para ambos os sexos. Dos 28 casos femininos, 3 estão entre 20-34 anos, 4 entre 35-44, 10 entre 45-54, 6 entre 55-64, 4 entre 65-74 e 1 com 85 ou mais. Dos casos masculinos, 2 casos entre 35-44, 9 entre 45-54, 9 entre 55-64 e 2 entre 65-74. A FIGURA 7 resume a distribuição de casos por faixa etária:

FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DE MENINGIOMAS POR SEXO POR FAIXA ETÁRIA



5.2 Metilação de *BRCA1*

Os casos metilados corresponderam a 60% dos 50 meningiomas. Foi avaliada também a metilação em 7 aracnoides controle, com metilação positiva em apenas 1 caso (14%). Quando aplicado o Teste Exato de Fisher, a metilação de *BRCA1* é significante em meningiomas em relação a aracnoide controle (p = 0,0394), conforme observado na TABELA 5

TABELA 5 - METILAÇÃO DE *BRCA1* EM MENINGIOMAS E TECIDO CONTROLE

	Metilado	**Não-metilado**
Meningioma	30 (60%)	20 (40%)
Aracnoide	1 (14%)	6 (86%)

p = 0,0394

Destaca-se que a metilação de *BRCA1* predomina no sexo masculino, correspondendo a 73% dos casos entre homens. Interessantemente, a distribuição no sexo feminino foi equivalente, conforme a TABELA 6:

TABELA 6 - METILAÇÃO DE *BRCA1* POR SEXO

	Metilado	**Não-metilado**
Feminino	14 (50%)	14 (50%)
Masculino	16 (72,7%)	6 (27,3%)

Também foi realizada a análise de metilação por sexo e faixa etária. Os casos foram divididos entre masculino e feminino e, também, em maiores de 55 anos e menores ou igual a 55 anos. Foi considerada que entre 50 e 55 anos, a proporção da incidência entre feminino e masculino diminui aceleradamente, justificando a divisão em subgrupos maior e menor ou igual a 55 anos.

Para o sexo feminino, a distribuição entre maiores e menores ou igual a 55 anos se manteve equivalente. Entretanto, para o sexo masculino, acima dos 55 anos foram observados nove meningiomas, com 100% destes positivos para metilação de *BRCA1.* Abaixo dos 55 anos, foram estudados 13 meningiomas masculinos, sendo 7 casos metilados (54%) e 6 não metilados (46%). Aplicando-se o Teste Exato de Fisher, observou-se significância estatística da metilação de *BRCA1* para o sexo masculino com mais de 55 anos (p = 0,0461). As TABELAS 7 e 8 resumem a distribuição por sexo e faixa etária:

TABELA 7 - METILAÇÃO DE *BRCA1* NO SEXO FEMININO POR FAIXA ETÁRIA

SEXO FEMININO	Metilado	Não-metilado
> 55 anos	5 (50%)	5 (50%)
≤ 55 anos	9 (50%)	9 (50%)

TABELA 8 - METILAÇÃO DE *BRCA1* NO SEXO MASCULINO POR FAIXA ETÁRIA

SEXO MASCULINO	Metilado	Não-metilado
> 55 anos	9 (100%)	0 (0%)
≤ 55 anos	7 (54%)	6 (46%)

p = 0,0461

5.3 Expressão de *BRCA1*

A expressão de *BRCA1* foi avaliada em 38 casos, sendo 20 casos do sexo feminino (53%) e 18 casos masculinos (47%). A expressão de *BRCA1* foi comparada com *pool* de aracnoides normais, composta por 10 casos, sendo 5 femininos e 5 masculinos. O resultado analisado se deu pela relação (QR) entre a expressão de *BRCA1* em cada amostra tumoral divida pela expressão média de *BRCA1* encontrada no *pool* de aracnoides controle, considerando-se o gênero das amostras tumorais e dos controles. Quando QR é superior a 1, há maior expressão de *BRCA1* na amostra tumoral em relação a média de tecido controle. Em caso de QR menor que 1, a expressão foi considerada menor que o tecido controle.

No sexo feminino, QR foi maior que 1 em 7 casos, sendo 4 metilados e 3 não metilados e menor que 1 em 13 casos, sendo 5 metilados e 8 não metilados (TABELA 9)

TABELA 9 - EXPRESSÃO DE *BRCA1* POR METILAÇÃO NO SEXO FEMININO

SEXO FEMININO	QR > 1	QR < 1
Metilado	4 (20%)	5 (25%)
Não-metilado	3 (15%)	8 (40%)

Em homens, destaca-se que dos 18 casos avaliados, a expressão foi maior que 1 em 10 casos metilados e em apenas 1 não-metilado (TABELA 10)

TABELA 10- EXPRESSÃO DE *BRCA1* POR METILAÇÃO NO SEXO MASCULINO

SEXO MASCULINO	QR > 1	QR < 1
Metilado	10 (55,5%)	3 (16,6%)
Não-metilado	1 (5,0%)	4 (22,9%)

$p = 0,0474$

5.4 Receptores de Progesterona e Estrógeno

A expressão de receptores para progesterona e estrógeno foi avaliada em 32 meningiomas e em 7 aracnoides normais.

Receptores de Progesterona

A expressão de RP foi observada em 20 meningiomas (62%) e em apenas 1 tecido controle, com significância estatística para expressão de RP em meningiomas (TABELA 11)

TABELA 11 - EXPRESSÃO DE RP EM MENINGIOMAS E TECIDOS CONTROLES

	RP+	RP-
Meningioma	20 (62,5%)	32(37,5%)
Controle	6 (85,7%)	7 (14,3%)

p = 0,0350

A distribuição dos receptores de progesterona não foi estatisticamente significante quando correlacionada com sexo, metilação de *BRCA1,* e faixa etária, conforme TABELAS 12, 13, 14.

TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE RP POR SEXO

	RP+	RP-
Masculino	8 (57%)	6 (43%)
Feminino	12 (66%)	6 (34%)

TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DE RP POR CASOS METILADOS

	RP+	RP-
Metilado	11 (55%)	9 (45%)
Não-metilado	9 (75%)	3 (25%)

TABELA 14- DISTRIBUIÇÃO DE RP POR FAIXA ETÁRIA EM CASOS METILADOS

CASOS METILADOS	RP+	RP-
> 55 ANOS	7 (58%)	5 (42%)
≤ 55 ANOS	4 (57%)	3 (43%)

Receptores de Estrógeno

Não houve expressão de receptores para estrógeno observada nos meningiomas avaliados e nos controles.

A TABELA 15 resume os dados epidemiológicos e histopatológicos dos tumores avaliados e também os dados coletados em relação à metilação e expressão de *BRCA1* e receptores de progesterona nos casos avaliados.

TABELA 15 - CASUÍSTICA E DADOS OBTIDOS

Caso	Idade	Sexo	Grau	*BRCA1*		RP	Subtipo
				Metilação	Expressão		
TC02	50	Fem	I	U	NR	POS	meningotelial
TC04	59	Masc	III	**M**	NR	NEG	maligno
TC06	55	Masc	I	**M**	**>1**	NEG	transicional
TC08	72	Masc	I	**M**	NR	NEG	fibroso
TC09	54	Fem	I	**M**	**<1**	NEG	transicional
TC12	55	Fem	I	**M**	NR	NEG	fibroso
TC13	68	Fem	I	**M**	**<1**	POS	psamomatoso
TC15	63	Fem	I	**M**	**>1**	POS	transicional
TC17	62	Masc	I	**M**	**<1**	POS	meningotelial
TC19	30	Fem	II	**U**	**<1**	NEG	atípico
TC20	68	Fem	I	**U**	**<1**	POS	transicional
TC21	40	Fem	I	**U**	**>1**	POS	transicional
TC25	69	Fem	I	**U**	**<1**	POS	meningotelial
TC26	54	Masc	I	**M**	**<1**	POS	meningotelial
TC28	48	Masc	III	**M**	**>1**	NEG	maligno
TC32	66	Fem	I	**M**	**<1**	POS	meningotelial
TC36	58	Masc	I	**M**	**<1**	POS	transicional
TC38	49	Masc	I	**M**	**>1**	NEG	meningotelial
TC46	53	Fem	I	**U**	**>1**	POS	-
TC56	51	Fem	I	**U**	**<1**	POS	meningotelial
TC59	45	Masc	I	**M**	**>1**	POS	meningotelial
TC61	60	Masc	I	**M**	**>1**	POS	transicional
TC62	48	Masc	I	**U**	**<1**	POS	meningotelial
TC64	64	Masc	I	**M**	**>1**	POS	angiomatoso e secretor
TC72	54	Fem	I	**M**	**<1**	POS	secretor
TC73	28	Fem	I	**U**	**>1**	NEG	meningotelial
TC76	57	Masc	I	**M**	**>1**	NR	meningotelial
TC 79	47	Masc	I	**M**	**>1**	NR	meningotelial
TC 80	40	Masc	I	**M**	**>1**	NR	meningotelial
TC83	51	Fem	I	**U**	**>1**	NR	meningotelial
TC84	62	Masc	I	**M**	**>1**	NR	meningotelial
TC 85	48	Fem	I	**M**	**>1**	NR	transicional
TC86	39	Masc	I	**U**	**<1**	POS	meningotelial
TC 87	49	Masc	I	**U**	**<1**	NEG	transicional
TC 88	58	Fem	I	**U**	**<1**	POS	meningotelial
TC 92	48	Fem	I	**M**	**<1**	POS	meningotelial
TC 94	85	Fem	I	**M**	**IGUAL**	NEG	transicional
TC 97	52	Fem	II	**M**	**>1**	NEG	atípico
TC 102	42	Fem	I	**U**	**<1**	NR	meningotelial
TC 103	55	Masc	I	**U**	**<1**	NR	secretor
TC 104	57	Fem	I	**U**	**<1**	NR	meningotelial
TC 105	50	Masc	I	U	**>1**	NR	meningotelial e microcistico
TC 109	60.	Fem	I	U	**<1**	NR	meningotelial
TC 110	27.	Fem	I	M	NR	NR	meningotelial
TC 111	63.	Fem	I	M	NR	NR	meningotelial
TC 112	71.	Masc	I	M	NR	NR	transicional
TC 113	44.	Fem	I	M	NR	NR	meningotelial
TC 114	51.	Fem	I	U	NR	NR	meningotelial
TC 115	52.	Masc	I	U	NR	NR	fibroso
TC 116	37.	Fem	I	M	NR	NR	meningotelial

TABELA 15 - Fem= feminino; Masc= masculino; M= metilado; U= Não-metilado; NR= não realizado, POS= positivo; NEG= negativo

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os meningiomas são os tumores intracranianos mais frequentes quando considerados casos observados em necropsias ou casos assintomáticos e resultados de "achados de exames". Ainda assim, meningiomas representam grande desafio em neurocirurgia, não só considerando aspectos cirúrgicos e pós-operatórios, como também aspectos moleculares, na identificação de suas alterações genéticas que contribuem para sua gênese e desenvolvimento. Diante deste desafio, estudos na área têm ajudado a compreender os mecanismos moleculares relacionados a meningiomas, com potencial em tornarem-se ferramentas importantes no rastreamento, diagnóstico e tratamento destes tumores.

Foram avaliados 50 meningiomas em relação ao padrão de metilação para o gene *BRCA1,* considerando sua expressão, a presença de receptores para progesterona e estrógeno e também os subtipos histológicos.

Do ponto de vista histológico, os meningiomas apresentam inúmeras classificações, entretanto, a mais aceita é a proposta pela Organização Mundial de Saúde, que divide estes tumores em graus de I a III, de acordo com o comportamento biológico, de benigno a maligno de cada lesão. Cada grau apresenta subtipos histológicos, sendo que um tumor pode apresentar mais de um subtipo simultaneamente. Cerca de 90 % dos meningiomas são considerados grau I e portanto benignos, sendo os subtipos meningotelial, fibroso e transicional os mais comuns. Na presente casuística, foram descritos subtipos histológicos em 49 amostras de 50 meningiomas. Entre os subtipos mais comuns, o meningotelial ocorre em 26 casos, correspondendo a 53%, seguido

pelo transicional, em 11 casos, e depois pelos fibroblásticos com 3 casos, correspondendo com os mais frequentes na literatura (REF). Também é possível observar que 8% da casuística é composta por casos atípicos e malignos, sendo 2 casos grau II e 2 casos grau III. Em estudo populacional de Rausing e colaboradores (em 1970), meningiomas atípicos e malignos correspondem, juntos, a 10% de meningiomas em geral, diferenciando-se dos grau I por apresentarem aumento no número de mitoses, aumento da celularidade, nucléolos proeminentes, presença de necrose e possível invasão do parênquima cerebral.

Alguns subtipos histológicos foram associados com alterações moleculares. Cerca de 70 a 80% dos meningiomas transicional e fibroblástico apresentam alteração *NF2* (AKAGI *et al,* 1995; EVANS *et al.,* 2001). Na presente casuística, entre os casos *BRCA1* metilados, 14 eram meningoteliais, 8 transicionais e 2 fibrosos, sem apresentar significância estatística.

Frente a sua evolução lenta e potencialmente benigna e, também, ao grande número de casos latentes e assintomáticos, os meningiomas são pouco estudados em relação a outros tumores cerebrais. De certa forma, existem poucos estudos epidemiológicos com casuísticas que representem fatores de risco adequadamente separados. A incidência de meningiomas aumenta com a idade para ambos os sexos, sendo maior no sexo feminino em relação ao masculino. Segundo dados do Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS) a taxa de incidência varia de 5,04 e 2,46 para os sexos femininos e masculinos, respectivamente (CLAUS *et al.,* 2005). Na casuística estudada, houve predominância dos casos operados com idades entre 34 e 64

anos, em ambos os sexos. A comparação desses dados com a literatura fica prejudicada pelo número pequeno de casos para avaliação epidemiológica e também por estes serem casos sintomáticos encaminhados para tratamento, não refletindo a real incidência desta patologia na neste estudo. Entretanto, considerando a proporção da incidência entre sexo feminino e masculino, observa-se na literatura que ocorre importante aumento após a puberdade, seguida de um decréscimo cada vez mais acentuado após os 45 a 54 anos de idade (WIEMELS *et al.,* 2010). Dentre os casos estudados, nas faixas etárias de maior incidência, esta relação é observada entre 35 a 44 anos, quando a proporção é 2, caindo para 1,11 entre 45 e 54 anos e 0,67 entre 55 e 64.

Interessantemente, nos extremos de idade, a proporção das incidências por sexo chega próxima a 1, atingindo seu ápice próximo ao climatério. A relação entre incidência de meningiomas por sexo, variando conforme a faixa etária, destaca possível papel dos hormônios sexuais na origem e/ou desenvolvimento destes tumores. Após os 55 anos, esta proporção diminui aceleradamente em relação as maiores idades, evidenciando que fatores que modificam a incidência não estão restritos apenas a alterações hormonais do sexo feminino, mas também por mecanismos que contribuem para o aumento de incidência no sexo masculino.

As funções do gene *BRCA1* vêm sendo bastante estudadas na literatura, principalmente relacionadas às neoplasias de mama e ovário. *BRCA1* parece estar envolvido no mecanismo de reparo de erros de DNA durante a divisão celular e indução de apoptose, relaciona-se com oncogenes como *c-myc* e *BRIP1* além de possível papel modulador negativo tanto em receptores de estrógeno

quanto de progesterona (MA *et al.,* 2005; DENG *et al.,* 2006). Entretanto, são poucos os trabalhos que investigam alterações de *BRCA1* em meningiomas, a despeito de semelhanças clínicas e patológicas entre meningiomas e câncer de mama e de seu papel como gene supressor tumoral. Segundo Custer e colaboradores, o risco relativo entre meningiomas e câncer de mama é aproximadamente 2,0 (CUSTER *et al.,* 2002), e sugere que mecanismos moleculares entre estes dois tumores possam ser compartilhados por ambos.

Kirsh e colaboradores (1997) estudaram alterações mutacionais dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em meningiomas, mas não encontraram correlação significativa (KIRSH *et al.,* 1997). Em 2008, Bethke e colaboradores correlacionaram a variações no gene *BRIP1* com risco para meningiomas (BETHKE *et al.,* 2008). Segundo Seal e colaboradores, mutações de *BRIP1* são variantes de baixo risco também para câncer de mama (SEAL *et al.,* 2006). Interessantemente, o reparo do DNA de *BRIP1* durante a divisão celular é dependente da proteína BRCA1, e indiretamente levanta hipótese sobre alterações de *BRCA1* em meningiomas.

Alterações epigenéticas de *BRCA1*, entre elas metilação a mais importante, foram estudadas amplamente em câncer de mama e ovário. Tapia e colaboradores avaliaram metilação de *BRCA1* em câncer de mama e concluíram que estes eventos colaboram para o desenvolvimento das neoplasias de mama (TAPIA *et al.,* 2008). Assim como as mutações de *BRCA1,* são escassos os estudos de metilação desse gene em meningiomas. van Tilborg e colaboradores (2006) investigaram o padrão de metilação de vários genes em meningiomas sem alteração do *NF2* e reconheceram o gene *BRCA1* como potencial alvo molecular

(van TILBORG *et al.,* 2006). Segundo Jun e colaboradores (2008), os mecanismos epigenéticos são comuns em meningiomas e podem ser a alteração genética predominante nestes tumores (JUN *et al.,* 2008). Da mesma forma, Tapia (2008) relata em seu trabalho que a metilação em *BRCA1* é predominante em relação as alterações mutacionais deste gene em câncer de mama hereditário. Tais trabalhos colaboram para a compreensão sobre a importância dos mecanismos epigenéticos em oncologia e da necessidade de maiores estudos em relação a meningiomas.

Diante destas informações, o padrão de metilação do gene *BRCA1* foi avaliado em casuística composta por 50 meningiomas. Em 30 casos (60%), onde foi obervada metilação de *BRCA1,* destaca-se que o silenciamento de *BRCA1* no sexo masculino parece ser mais frequente do que no sexo feminino. Entre os 22 casos masculinos avaliados, aproximadamente 73% estavam metilados contra 50% dos casos de mulheres metiladas. Além disso, em casos avaliados por sexo e faixa etária, observou-se significância estatística de metilação para casos do sexo masculino e acima de 55 anos de idade (p = 0,0461). Todos os nove pacientes masculinos com mais de 55 anos de idade apresentaram metilação de *BRCA1.* Quando considerados outros subgrupos sendo pacientes masculinos com idade menor ou igual a 55 anos, feminino com mais de 55 anos e feminino com idade menor ou igual a 55 anos, a distribuição da metilação para *BRCA1* foi em torno de 50% para todos os subgrupos. Este resultado destaca que o padrão de metilação para o gene *BRCA1* em meningiomas pode ter distribuição assimétrica entre os sexos e além disso, contribuir para o desenvolvimento tumoral em idades avançadas. Desta forma, *BRCA1* metilado em meningiomas de pacientes

masculinos e com mais de 55 anos de idade parece ser evento que colabora para a gênese e desenvolvimento destes tumores. Corroborando com nossos resultados, Tabernero e colaboradores publicaram em seu trabalho de 2007 que o padrão das alterações moleculares de meningiomas do sexo feminino e masculino apresentam padrões diferentes, o que poderia justificar os comportamentos distintos desses tumores entre mulheres e homens (TABERNERO *et al.,* 2007). A presente casuística mostra que a metilação de *BRCA1* pode ter padrões distintos entre sexos masculino e feminino, da mesma forma como ocorrem com outras alterações moleculares descritas por Tabernero em 2007.

É interessante ressaltar que a proporção da incidência de casos femininos por masculinos diminui aceleradamente entre 50 e 55 anos de idade, coincidentemente com a redução da concentração sérica de hormônios sexuais não só no sexo feminino como no sexo masculino. Este período, em homens, é conhecido como climatério masculino e caracteriza-se por alterações fenotípicas resultantes da redução de estrógeno e testosterona no sexo masculino (HORSTMAN *et al.,* 2012) (VANDENPUT *et al.,* 2009). A expressão da proteína BRCA1 pode variar conforme períodos distintos de vida e é regulada positivamente principalmente pelo aumento nas concentrações de estrógeno, progesterona e prolactina circulantes (GUDAS - *et al.,* 1995; SPILLMAN *et al.,* 1996; ROMAGNOLO *et al.,* 1998; FAVY *et al.,* 1999; LAUD *et al.,* 2001). Desta forma, a redução dos hormônios sexuais, que ocorrem em ambos os sexos no início da quinta década, favorecem diminuição da expressão de *BRCA1*. Na casuística estudada, a metilação de *BRCA1* no sexo masculino com mais de 55

anos pode ter os efeitos de silenciamento do gene potencializado pela redução de estrógeno a partir do climatério masculino, e contribuir para gênese e desenvolvimento tumoral. Ainda assim, a incidência de metilação parece aumentar com o envelhecimento e a própria idade pode contribuir para o silenciamento epigenético de vários supressores tumorais.

Considerando o possível papel dos hormônios sexuais em meningiomas, vários estudos focaram a identificação e a função dos receptores para estrógeno e progesterona nestes tumores. Dentre os casos analisados no presente estudo, vinte meningiomas (62%) expressaram RP, de acordo com a frequência de 60 a 100% descrita na literatura (CARROLL *et al.,* 1993). Nas 7 amostras de aracnoides normais analisadas, apenas 1 apresentou fraca expressão positiva para RP, com significância estatística para expressão de RP em meningiomas. A baixa expressão de RP em aracnoides normais também foi observadas por vários autores (MAXWELL *et al., 1993,* LEÃES *et al.,* 2010), e sugere que alterações moleculares relacionadas a receptores para hormônios sexuais estão presentes em meningiomas.

A correlação entre expressão de RP em meningiomas e sexo, assim como a correlação de RP e faixa etária maior de 55 anos não foram observadas. Korhonen e colaboradores (2006), encontraram 88% de meningiomas positivos para RP em casuística de 447 casos. Entretanto, não observaram correlação da expressão de RP com sexo e faixa etária. Dados obtidos no presente estudo estão de acordo com o trabalho de Korhonen e colaboradores (2006), e sugerem que apenas a presença de receptores para progesterona não é suficiente para explicar as diferenças entre meningiomas no sexo masculino e feminino. Da

mesma forma, os resultados entre faixa etária são semelhantes, e não podem explicar apenas por si a maior incidência de meningiomas com o aumento da idade.

A expressão de receptores de estrógeno em meningiomas foi menos estudada do que os receptores de progesterona, nos estudos atuais. Em parte, tal fato se deve à predominância dos receptores de progesterona nestes tumores e também ao conceito, difundido por alguns autores, de que RE não são funcionantes nestes tumores. A frequência de RE em meningiomas varia de 0 a 40% dos casos. A presente casuística está em acordo com a literatura, não se observando a expressão de RE em nenhum caso. Alguns autores descreveram que a metilação de *BRCA1* correlaciona-se com ausência de RE e RP em neoplasias de mama (CATTEAU *et al.,* 1999; WEI *et al.,* 2005; HONRADO *et al.,* 2007; Bal *et al.,* 2012). Em nossa casuística, REs foram negativos tanto em casos metilados quanto em não-metilados, e os RPs não apresentaram correlação significativa com a presença ou ausência de metilação para *BRCA1*. Este resultado é concordante com resultados na literatura que concluem não haver correlação da metilação de *BRCA1* com positividade tumoral de RP e RE.

Por outro lado, a associação entre receptores para hormônios sexuais e diminuição da proteína BRCA1 pode ter importância tanto no comportamento por sexo em meningiomas, quanto na incidência por idade em meningiomas. Além de atuar no reparo de DNA durante a divisão celular, *BRCA1* parece atuar na modulação negativa dos efeitos tanto de RE e RP (FAN *et al.,* 2002; KATIYAR *et al.,* 2006; MA *et al,* 2006). Dentre os casos metilados avaliados para receptores de hormônios sexuais, 55% apresentaram RP positivos, e entre casos acima dos

55 anos, 58% de positividade para RP. Apesar de não ter significância estatística entre RP e casos metilados, a alta frequência de RP em meningiomas, mesmo em casos *BRCA1* metilado, pode contribuir para desenvolvimento e proliferação destes tumores. O silenciamento de *BRCA1* pela metilação, pode permitir o aumento da sinalização dos receptores de estrógeno e progesterona e, consequentemente, seus efeitos mitogênicos. Katiyar e colaboradores (2006) descrevem que RP podem aumentar sua sinalização em 4 vezes na ausência de BRCA1. Mesmo em casos onde exista heterozigose para metilação de *BRCA1,* o silenciamento de um alelo pode aumentar a atividade dos receptores para hormônios sexuais (KING *et al.,* 2004). Entretanto, segundo Reynolds e colaboradores (1990), os hormônios sexuais podem influenciar o crescimento meningiomas por diferentes vias, independe da presença de receptores. A presença de RP em meningiomas pode ser um fator a mais que facilita os efeitos mitogênicos da progesterona. Desta forma, é razoável dizer que a positividade de RP em meningiomas com *BRCA1* metilado pode potencializar possíveis efeitos de hormônios sexuais nestes tumores.

Assim como as alterações de BRCA1 em meningiomas foram pouco estudadas na literatura, a expressão deste gene é referida apenas por Kirsch em 1997. Kirsch e colaboradores avaliaram a presença de BRCA1 em meningiomas e concluíram não haver diferenças significativas em relação a tecidos controle. Os tecidos controles utilizados para comparação por Kirsch foram fragmentos de tecido cerebral. Criticamente, a comparação da expressão de BRCA1 entre meningiomas e fragmentos cerebrais pode não representar as possíveis alterações desta proteína entre o tecido normal e tumoral, uma vez que

meningiomas derivam de células da aracnoide, onde a expressão de *BRCA1* pode ser diferente de tecido cerebral. Em nossa casuística, a expressão de *BRCA1* foi avaliada em 38 meningiomas por técnica de PCR em tempo real. No sexo feminino, não houve correlação entre a expressão de *BRCA1* e casos metilados e não metilados. No sexo masculino, 10 casos metilados resultaram em QR>1, com *p* significativo (*p* = 0,0474). Em neoplasias de mama, o silenciamento de *BRCA1* por metilação correlaciona-se com a redução da proteína BRCA1, sugerindo possíveis efeitos oncogênicos secundários a ausência dessa proteína (MATROS *et al.,* 2005; WEI *et al.,* 2005; TAPIA *et al.,* 2008). Na presente casuística, a expressão de *BRCA1* foi maior nos casos onde há metilação do gene *BRCA1.* Em parte, a explicação para tal ocorrência pode ser dada em função de dois fatores: 1) A qualidade das amostras controle em relação a quantidade de RNA - alguns casos foram colhidos de cadáveres com mais de 8 horas de óbito, o que poderia levar a degradação das moléculas de RNA frente a sua grande instabilidade molecular; 2) A heterozigose da metilação de *BRCA1*, situação onde seria identificado mRNA de *BRCA1*, mesmo em menor quantidade. Considerando a relação QR entre expressão tumoral e expressão nos tecidos controle de *BRCA1,* a heterozigose em tecidos tumorais comparada com tecidos onde mRNA pode ter sido amplamente degradado pode justificar valores de QR maiores que 1, independentemente do status de metilação.

A expressão de *BRCA1* ainda carece de maiores estudos e pode agregar informações importantes sobre o *status* da metilação do gene *BRCA1* em meningiomas. Entretanto, a seleção das amostras controle para pesquisa de mRNA deve considerar a instabilidade da fita única de RNA, e também

correspondência com o tipo de tumor a ser estudado, evitando vieses histológicos.

Este trabalho contribui para a compreensão do padrão das alterações moleculares em meningiomas, e que parecem ser distintas entre o sexo masculino e feminino. Essa compreensão permite abordagem diferenciada para cada caso, culminando com melhores resultados no tratamento de meningiomas. Além disso, a compreensão destes resultados em meningiomas abre espaço para a investigação de alterações epigenéticas séricas para *BRCA1*, da mesma forma como ocorre para câncer de mama, o que poderá proporcionar diagnósticos precoces ou testes de rastreamento, antes mesmo de lesões sintomáticas.

Em última instância, após pesquisas adicionais, investigações sobre o uso de agentes que revertam metilação, como deazacitadine, poderiam contribuir na restauração de supressores tumorais silenciados por metilação.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A metilação de *BRCA1* é significativamente maior em meningiomas do que em tecidos controles. e também em meningiomas de indivíduos masculinos com mais de 55 anos. Nestes casos, o silenciamento de *BRCA1* por metilação pode contribuir para origem e desenvolvimento de meningiomas

Assim como a metilação, a expressão de *BRCA1* parece ter padrão diferente entre os sexos e é significativamente maior nos casos metilados do sexo masculino. Entretanto, a dificuldade na obtenção de amostras normais pode influenciar a pesquisa de RNA, considerando a instabilidade dessas moléculas.

A expressão de RP não apresenta significância estatística entre sexo, idade e metilação. Entretanto, RP são frequentes em meningiomas e podem contribuir para efeitos mitogênicos dos hormônios sexuais em meningiomas.

O silenciamento de *BRCA1* pela metilação parece contribuir para o desenvolvimento de meningiomas no sexo masculino a partir dos 55 anos de idade, e pode ter seu efeito potencializado pela expressão tumoral de RP.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Al-Mefty O, Kadri PA, Pravdenkova S, Sawyer JR, Stangeby C, Husain M. Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. **J Neurosurg**. v101, p. 10-218, 2004.

Bal A, Verma S, Joshi K, Singla A, Thakur R, Arora S, Singh G. BRCA1-methylated sporadic breast cancers are BRCA-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression. **Virchows Arch.** 2012 Sep;461(3):305-12

Bethke L, Murray A, Webb E, Schoemaker M, Muir K, Mc- Kinney P, Hepworth S, Dimitropoulou P, Lophatananon A, Feychting M, Lonn S, Ahlbom A, Malmer B, Henriksson R, Auvinen A, Kiuru A, Salminen T, Johansen C, Christensen HC, Kosteljanetz M, Swerdlow A, Houlston R (2008) Comprehensive analysis of DNA repair gene variants and risk of meningioma. **J Natl Cancer Inst** 100:270–276

Bonito D, Giarelli L, Falconieri G, Bonifacio-Gori D, Tomasic G, Vielh P. Association of breast cancer and meningioma. Report of 12 new cases and review of the literature. **Pathol Res Pract**. 1993 May;189(4):399-404.

BouillotP,PellissierJF, Devictor Betal.Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptors, estrogen-regulated protein, and growth fraction: Immunocytochemical assays in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. **J Neurosurg** 1994; 81:765–773.

Bozzetti C, Camisa R, Nizzoli R, Manotti L, Guazzi A, Naldi N, Mazza S, Nizzoli V, Cocconi G. Estrogen and progesterone receptors in human meningiomas: biochemical and immunocytochemical evaluation. **Surg Neurol**. 1995 Mar;43(3):230-3; discussion 234.

Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, Inskip PD. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. **Int J Cancer.** 2002 May 10;99(2):252-9.

Buetow MP, Buetow PC, Smirniotopoulos JG. Typical, atypical, and misleadind features in meningioma. **Radiographics** 1991; v11 p 1087-1106

Burns PE, Jha N, Bain GO. Association of breast cancer with meningioma. A report of five cases. **Cancer.** 1986 Oct 1;58(7):1537-9.

Burns PE, Jha N, Bain GO. Association of breast cancer with meningioma. A report of five cases. **Cancer.** 1986 Oct 1;58(7):1537-9.

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. **Cancer Res** 1993; 53: 1312–1316.

Carroll RS, Zhang J, Black PM. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas**. J Neurooncol**. 1999 Apr;42(2):109-16.

Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. **Oncogene** 1999; 18:1957–65.

Central Brain Tumor Registry of the United States. 2009-2010 CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006. Hinsdale, IL: Central Brain Tumor Registry of the United States; 2009. http://www.cbtrus.org

Chamoun R, Krisht KM, Couldwell WT. Incidental meningiomas. **Neurosurg Focus**. 2011 v31(6):E19.

Claus EB, Black PM, Bondy ML, et al. Exogenous hormone use and menin- gioma risk: what do we tell our patients? **Cancer.** 2007;110(3):471–476.

Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M, Black PM: Epidemiology of intracranial meningioma. **Neurosurgery** 57:1088–1095, 2005

Claus EB, Park PJ, Carroll R, Chan J, Black PM. Specific genes expressed in association with progesterone receptors in meningioma. **Cancer Res**. 2008 Jan 1;68(1):314-22

Custer BS, Koepsell TD, Mueller BA. The association between breast carcinoma and meningioma in women. **Cancer**. 2002 Mar 15;94(6):1626-35.

Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. **Nucleic Acids Res**. 2006 Mar 6;34(5):1416-26.

Evans JJ, Jeun SS, Lee JH, Harwalkar JA, Shoshan Y, Cowell JK, Golubic M. Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningothelial meningiomas. J **Neurosurg**. 2001 Jan;94(1):111-7

Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA, Erdos M, Goldberg ID, Webb P, Kushner PJ, Pestell RG, Rosen EM. p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. **Cancer Res**. 2002 Jan 1;62(1):141-51.

Favy DA, Rio P, Maurizis JC, Hizel C, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Prolactin-dependent up-regulation of BRCA1 expression in human breast cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**. 1999 May 10;258(2):284-91.

Gudas JM, Nguyen H, Li T, Cowan KH. Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. **Cancer Res**. 1995 Oct 15;55(20):4561-5.

Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesen T, Dumanski JP. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. **BMC Genomics**. 2007 Jan 12;8:16.

Hashiba T, Hashimoto N, Izumoto S, Suzuki T, Kagawa N, Maruno M, Kato A,

Yoshimine T. Serial volumetric assessment of the natural history and growth pattern of incidentally discovered meningiomas. J **Neurosurg**. 2009 Apr;110(4):675-84.

Hemminki K, Tretli S, Sundquist J, Johannesen TB, Granström C. Familial risks in nervous-system tumours: a histology-specific analysis from Sweden and Norway. **Lancet Oncol**. 2009 May;10(5):481-8.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.

Honrado E, Osorio A, Milne RL, Paz MF, Melchor L, Cascón A, Urioste M, Cazorla A, Díez O, Lerma E, Esteller M, Palacios J, Benítez J. Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAX families. **Mod Pathol**. 2007 Dec;20(12):1298-306.

Horstman AM, Dillon EL, Urban RJ, Sheffield-Moore M. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2012 Nov;67(11):1140-52

Ikeda K, Saeki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA. Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. **J Neurosurg**. 1999 Jul;91(1):85-92.

Inskip PD, Mellemkjaer L, Gridley G, Olsen JH. Incidence of intracranial tumors following hospitalization for head injuries (Denmark). **Cancer Causes Control**. 1998 Jan;9(1):109-16.

Jhawar BS, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ. Sex steroid hormone exposures and risk for meningioma. **J Neurosurg**. 2003 Nov;99(5):848-53.

Jun P, Hong C, Lal A, Wong JM, McDermott MW, Bollen AW, Plass C, Held WA, Smiraglia DJ, Costello JF. Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific. **Neuro Oncol**. 2009 Aug;11(4):414-22.

Katiyar P, Ma Y, Fan S, Pestell RG, Furth PA, Rosen EM. Regulation of progesterone receptor signaling by BRCA1 in mammary cancer. **Nucl Recept Signal.** 2006;4:e006

Kazumoto K, Tamura M, Hoshino H, Yuasa Y. Enhanced expression of the sis and c-myc oncogenes in human meningiomas. **J Neurosurg**. 1990 May;72(5):786-91.
Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel WI. Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases**. J Neurosurg**. 2001 Oct;95(4):601-7.

Kirsch M, Zhu JJ, Black PM. Analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic meningiomas. **Genes Chromosomes Cancer**. 1997 Sep;20(1):53-9.

Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression**. J Neurooncol**. 2006 Oct;80(1):1-7

Laud K, Hornez L, Gourdou I, Belair L, Arnold A, Peyrat JP, Djiane J. Expression of BRCA1 gene in ewe mammary epithelial cells during pregnancy: regulation by growth hormone and steroid hormones. **Eur J Endocrinol**. 2001 Dec;145(6):763-70.

Leães CG, Meurer RT, Coutinho LB, Ferreira NP, Pereira-Lima JF, da Costa Oliveira M. Immunohistochemical expression of aromatase and estrogen, androgen and progesterone receptors in normal and neoplastic human meningeal cells. **Neuropathology**. 2010 Feb 1;30(1):44-9.

Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubić M. Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. **Neurosurgery.** 1997 Mar;40(3):578-87.

Li X, Zhao J. Intracranial meningiomas of childhood and adolescence: report of 34 cases with follow-up. **Childs Nerv Syst**. 2009 Nov;25(11):1411-7.

Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, Amiñoso C, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Rey JA. Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. **Genes Chromosomes Cancer**. 2005 Mar;42(3):314-9

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**. 2007 Aug;114(2):97-109.

Ma Y, Katiyar P, Jones LP, Fan S, Zhang Y, Furth PA, Rosen EM. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 regulates progesterone receptor signaling in mammary epithelial cells**. Mol Endocrinol**. 2006 Jan;20(1):14-34.

Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. **Breast Cancer Res Treat**. 2005 May;91(2):179-86.

Maxwell M, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Antoniades HN. Expression of androgen and progesterone receptors in primary human meningiomas. **J Neurosurg**. 1993 Mar;78(3):456-62.

Mehta D, Khatib R, Patel S. Carcinoma of the breast and meningioma. Association and management. Cancer. 1983 May 15;51(10):1937-40.

Mehta D, Khatib R, Patel S. Carcinoma of the breast and meningioma. Association and management. Cancer. 1983 May 15;51(10):1937-40.

Menon G, Nair S, Sudhir J, Rao BR, Mathew A, Bahuleyan B. Childhood and adolescent meningiomas: a report of 38 cases and review of literature. **Acta Neurochir (Wien).** 2009 Mar;151(3):239-44; discussion 244.

Mueller CR, Roskelley CD. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2003;5(1):45-52.

Nakamura M, Roser F, Michel J, Jacobs C, Samii M. The natural history of incidental meningiomas. **Neurosurgery**. 2003 Jul;53(1):62-70; discussion 70-1.
Olivero WC, Lister JR, Elwood PW. The natural history and growth rate of asymptomatic meningiomas: a review of 60 patients. **J Neurosurg**. 1995 Aug;83(2):222-4.

Oya S, Kim SH, Sade B, Lee JH. The natural history of intracranial meningiomas. **J Neurosurg.** 2011 May;114(5):1250-6.

Pham MH, Zada G, Mosich GM, Chen TC, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. **Neurosurg Focus**. 2011 May;30(5):E7.

Preston DL, Ron E, Yonehara S, Kobuke T, Fujii H, Kishikawa M, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. **J Natl Cancer Inst**. 2002 Oct 16;94(20):1555-63.

Preston-Martin S, Staples M, Farrugia H, Giles G. Primary tumors of the brain, cranial nerves and cranial meninges in Victoria, Australia, 1982-1990: patterns of incidence and survival. **Neuroepidemiology**. 1993;12(5):270-9.
Ragel BT, Jensen RL. Molecular genetics of meningiomas. **Neurosurg Focus**. 2005 Nov 15;19(5):E9.

Rausing A, Ybo W, Stenflo J. Intracranial meningioma--a population study of ten years. **Acta Neurol Scand**. 1970;46(1):102-10.

Reynolds RK, Talavera F, Roberts JA, Hopkins MP, Menon KM. Regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I receptors by estradiol and progesterone in normal and neoplastic endometrial cell cultures. **Gynecol Oncol**. 1990 Sep;38(3):396-406.

Romagnolo D, Annab LA, Thompson TE, Risinger JI, Terry LA, Barrett JC, Afshari CA. Estrogen upregulation of BRCA1 expression with no effect on localization. **Mol Carcinog.** 1998 Jun;22(2):102-9.

Rubinstein AB, Schein M, Reichenthal E. The association of carcinoma of the

breast with meningioma. **Surg Gynecol Obstet**. 1989 Oct;169(4):334-6.

Sankila R, Kallio M, Jääskeläinen J, Hakulinen T. Long-term survival of 1986 patients with intracranial meningioma diagnosed from 1953 to 1984 in Finland. Comparison of the observed and expected survival rates in a population-based series. **Cancer.** 1992 Sep 15;70(6):1568-76.

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. **Nat Genet**. 2006 Nov;38(11):1239-41.

Spillman MA, Bowcock AM. BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. **Oncogene.** 1996 Oct 17;13(8):1639-45.

Tapia T, Smalley SV, Kohen P, Muñoz A, Solis LM, Corvalan A, Faundez P, Devoto L, Camus M, Alvarez M, Carvallo P. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. **Epigenetics.** 2008 May-Jun;3(3):157-63.

Terry MB, Howe G, Pogoda JM, Zhang FF, Ahlbom A, Choi W, Giles GG, Little J, Lubin F, Menegoz F, Ryan P, Schlehofer B, Preston-Martin S. An international case-control study of adult diet and brain tumor risk: a histology-specific analysis by food group. **Ann Epidemiol**. 2009 Mar;19(3):161-71

van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC. Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. **J Pathol**. 2006 Mar;208(4):564-73.

Vandenput L, Ohlsson C. Estrogens as regulators of bone health in men. **Nat Rev Endocrinol**. 2009 Aug;5(8):437-43.

Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, Xu J, Fackenthal J, Tretiakova M, Das S, Olopade OI. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10692-9.

Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. **J Neurooncol**. 2010 Sep;99(3):307-14.

Yano S, Kuratsu J; Kumamoto Brain Tumor Research Group. Indications for surgery in patients with asymptomatic meningiomas based on an extensive experience. **J Neurosurg**. 2006 Oct;105(4):538-43.

Zanini MA, Faleiros AT, Almeida CR, Clara CA, Gabarra RC. Trigone ventricular meningiomas: surgical approaches. **Arq Neuropsiquiatr**. 2011 Aug;69(4):670-5.

Zhang MX, Zhao X, Wang ZG, Zhao WM, Wang YS. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 regulates expression of vascular endothelial growth factor in human meningioma differentiation. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2010 Jul;136(7):981-8.

Zheng L, Annab LA, Afshari CA, Lee WH, Boyer TG. BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Aug 14;98(17):9587-92.

Zon LI, Johns WD, Stomper PC, Kaplan WD, Connolly JL, Morris JH, Harris JR, Henderson IC, Skarin AT. Breast carcinoma metastatic to a meningioma. Case report and review of the literature. **Arch Intern Med.** 1989 Apr;149(4):959-62.

ANEXO

9. ANEXO

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de setembro de 2012 Of. 426/2012

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Adriana Camargo Ferrasi
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Adriana,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 4328-2012) "Mutação e metilação do gene BRCA1 em meningiomas", a ser conduzido por Ismael Augusto Silva Lombardi, orientado por Vossa Senhoria, Co-orientado pelo Prof. Dr. Marco Antonio Zanini, com a colaboração da Profª Drª Maria Inês de Moura Campos Pardini, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/09/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP