

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Camila Batista de Oliveira Silva

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
REPARO E SÍNTESE DE DNA EM
MENINGIOMAS**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2020**

Camila Batista de Oliveira Silva

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE REPARO E SÍNTESE DE DNA EM MENINGIOMAS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Dra. Júlia F. S. Pereira-Lima
Co-orientadora: Dra. Miriam da Costa Oliveira

**Porto Alegre
2020**

Catálogo na Publicação

Batista de Oliveira Silva, Camila
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE REPARO E SÍNTESE DE DNA EM
MENINGIOMAS / Camila Batista de Oliveira Silva. -- 2020.
147 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2020.

Orientador(a): Júlia F Semmelmann Pereira-Lima ;
coorientador(a): Miriam da Costa Oliveira.

1. meningiomas. 2. reparo de DNA. 3. síntese celular.
4. recorrência tumoral. 5. tumores sistema nervoso
central. I. Título.

Agradecimentos

Primeiramente, à minha orientadora, **Dr^a Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima**, pela confiança e acolhimento ao longo do mestrado e doutorado. Agradeço pelas horas de estudo, conversas e apoio incansável, e principalmente pela amizade e respeito, és um exemplo profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, **Dr^a Miriam da Costa Oliveira**, por todo suporte acadêmico, pelas oportunidades e incentivo constante. Agradeço pela confiança e amizade construída.

Às minhas amigas queridas, **Bárbara Ongaratti e Geraldine Trott**, pela amizade construída durante toda jornada de pós-graduação. Agradeço não somente pelo suporte acadêmico, mas pela amizade compartilhada.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa em Patologia, em especial aos técnicos **Teresinha Stein, Keli Cristine Reiter e Giuliano Rizotto**, pela dedicação e competência com que auxiliam na execução do estudo, bem como pelos momentos de confraternização e troca de conhecimentos.

À **Dr^a. Lígia Barbosa Coutinho** pela contribuição incomparável como patologista e por todos os ensinamentos compartilhados.

Ao Dr. **Nelson Pires Ferreira** pelo trabalho admirável e importante para a realização de todos os estudos do Centro de Neuroendocrinologia.

Aos **alunos de iniciação científica** do Centro de Neuroendocrinologia, pela disposição e auxílio, sempre atenciosos e comprometidos.

Ao meu marido, **Rodrigo Rossi**, meu esteio e meu melhor amigo. Agradeço por sempre me transmitir tranquilidade em todos os momentos, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida.

Aos meus avós, **Wilson e Júlia de Lourdes**, que torceram sempre pelo meu sucesso profissional e pessoal, vocês são/foram meu maior orgulho.

Aos meus pais, **Anderson e Larissa**, agradeço pelas oportunidades que me deram ao longo da vida. Pela torcida mais verdadeira, pelo apoio nas horas difíceis, que me proporcionaram tantas conquistas.

Por fim, agradeço aos **amigos e familiares**, que me trouxeram alegrias e motivação durante todo a minha caminhada.

Resumo da Dissertação

Introdução: Meningiomas são considerados a segunda neoplasia mais comum do sistema nervoso central em adultos. Na sua maioria são benignos com crescimento lento, frequentes em mulheres e com elevada taxa de recorrência. Em tumores observa-se menor eficiência nos processos de reparo, permitindo aumentando da instabilidade genômica e carcinogênese.

Objetivos: Neste trabalho, avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na síntese celular (ciclina D1) e reparo de erros no DNA (MUTYH, XPF, XPG) em meningiomas, relacionando-as com variáveis clínicas, tumorais e sobrevida livre de recorrência-recrescimento.

Material e Métodos: Neste estudo transversal, foram incluídos 85 pacientes, submetidos à cirurgia de ressecção via transcraniana com diagnóstico confirmado de meningioma. Os prontuários foram revisados para obtenção de parâmetros clínicos (idade, sexo, tamanho, localização, ressecção, recorrência ou recrescimento) e os meningiomas classificados quanto ao grau e subtipos segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para análise dos marcadores.

Resultados: O estudo incluiu 85 pacientes, com idade média de $52 \pm 13,3$ anos e a maioria mulheres (proporção de 2:1). Sessenta e sete casos foram de grau I (79%). Os tumores de grau II foram preditores independentes de recrescimento de recidiva (HR: 2,8; $p=0,038$). A expressão elevada de ciclina D1 foi associada ao grau II ($p=0,001$) e expressão baixa de MUTYH com grau I ($p=0,04$). A forte expressão de XPF e XPG foi associada ao grau II ($p=0,002$; $p<0,001$) e à recidiva ($p=0,04$; $p=0,003$). A forte expressão de XPF foi significativamente relacionada a tumores grandes ($p=0,03$). Foram encontradas

associação de ciclina D1, MUTYH e XPF. A sobrevida não foi associada à expressão de nenhuma das proteínas estudadas.

Conclusões: Conhecer o papel das proteínas de reparação do DNA e da síntese celular é importante para entender os processos de origem e desenvolvimento tumoral. Meningiomas grau II e forte expressão de XPF e XPG foram preditores de recorrência ou recrescimento e podem auxiliar no manejo clínico, considerando a alta recorrência de meningiomas e a ausência de consenso em relação ao tratamento.

Palavras-chave: meningiomas, reparo DNA, síntese, recorrência

Abstract

Introduction: Meningiomas are considered the second most common neoplasm of the central nervous system in adults. Most of them are benign with slow growth, frequent in women and with a high recurrence rate. In tumors, DNA error repair processes lose efficacy, providing mutagenesis and genomic instability.

Aim of study: This work evaluated the expression of proteins involved in cell synthesis (cyclin D1) and repair of DNA errors (MUTYH, XPF, XPG) in meningiomas, relating them to clinical, tumor and survival variables.

Materials and methods: This transverse study included 85 patients over 18 years, undergoing resection transcranianapor via a single surgeon (NPF), at a reference hospital in southern Brazil, with a diagnosis of meningioma. The medical records were reviewed to obtain clinical parameters (age, gender, size, location, resection, recurrence or regrowth) and meningiomas classified by grade and subtypes according to the World Health Organization (WHO). The immunohistochemical technique was performed to evaluate protein expression of DNA repair and cell synthesis markers.

Results: The study included 85 patients, with a mean age of 52 ± 13.3 years and most of them women (2:1 ratio). Sixty-seven cases were grade I (79%). Grade II tumors were independent predictors of recurrence-regrowth (HR: 2.8; $p=0.038$). The high expression of cyclin D1 was associated with grade II ($p=0.001$) and low MUTYH expression with grade I ($p=0.04$). Strong expression of XPF and XPG was associated with grade II ($p=0.002$; $p<0.001$) and with recurrence-regrowth ($p=0.04$; $p=0.003$). Strong XPF expression was significantly related to

large tumors ($p=0.03$). An association of cyclin D1, MUTYH and XPF were found. Survival was not associated with the expression of any of the proteins studied.

Conclusion: To know the role of DNA repair proteins and cell synthesis is important for understanding the processes of origin and tumor development. Grade II meningiomas and strong expression of XPF and XPG were predictors of recurrence or regrowth and may assist in clinical management, considering the high recurrence of meningiomas and the absence of consensus regarding treatment.

Keywords: meningiomas, DNA repair, synthesis, recurrence

Lista de abreviaturas

AKT1: homólogo de oncogene viral de timomamurino

Bcl-2: *B-cell leukemia 2*

BER: mecanismo de reparo do tipo excisão de bases

BRIP1: *BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1*

CBTRUS: Central de registros de tumores cerebrais dos Estados Unidos

CCDN1: gene ciclina D1

CDK: quinases dependentes de ciclina

DAB: diaminobenzidinatetraidrocloro

DNA: ácido desoxirribonucleico

E2F: fator de transcrição E2F

eIF4A: inibidor do fator de iniciação da tradução eucariótica 4^a

ERCC1-5: *Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group* tipos 1 ao 5.

FEN: endonucleases flap

GGR: reparo global de DNA

GLTSCR1: *Glioma tumor suppressor candidate region gene 1*

GSK-3 β : glicogênio sintase quinase 3 β

HE: hematotoxilina e eosina

HNTH1: glicosilase

HRP: enzima peroxidase do rábano silvestre

IgG: imunoglobulina G

IH: imuno-histoquímica

IMC: índice de massa corpórea

Ki-67: antígeno de proliferação celular Ki-67

KLF4: fator semelhante a Kruppel 4

MAP: polipose recessiva associada à MUTYH

MCM7: componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomo

MIB-1: *mimdbomb E3 ubiquitin protein ligase 1*

MTH1: fostase mutT homólogo humano 1

MUTYH: DNA glicosilase mutY

NCCN: National comprehensive cancer network

NER: mecanismo de reparo do tipo excisão de nucleotídeo

NF2: neurofibromatose tipo 2

OGG1: DNA glicosilase 8-oxoguanina

OMS: Organização Mundial da Saúde

p53: antígeno tumoral p53

PCNA: antígeno proliferação celular nuclear

PHH3: histona H3

pRb: proteína retinoblastoma

SMO: receptor de classe suavizado

SNC: sistema nervoso central

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

TCR: reparo de DNA acoplado à transcrição

TERT: transcriptase reversa da telomerase

TRAF7: fator de necrose tumoral associado ao receptor 7

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

XP: xeroderma pigmentoso

XPF e G: proteínas do grupo xeroderma pigmentoso do tipo F e G

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração esquemática das meninges.....	17
Figura 2: Principais localizações dos meningiomas.....	18
Figura 3: Exame de imagem (ressonância magnética) de meningioma.....	19
Figura 4: Classificação geral dos meningiomas de acordo com a OMS.....	21
Figura 5: Meningioma meningotelial (grau I).....	21
Figura 6: Meningioma atípico (grau II).....	22
Figura 7: Meningioma anaplásico (grau III).....	23
Figura 8: Via de ativação da ciclina D1 e progressão do ciclo celular.....	33
Figura 9: Estrutura da guanina após oxidação (8-oxoG).....	37
Figura 10: Esquematização da via de reparo da 8-oxoG.....	39
Figura 11: Etapas de ação do mecanismo de reparo NER.....	42
Figura 12: Estrutura do complexo XPF-ERCC1 e ligação com DNA.....	44
Figura 13: Representação esquemática da proteína XPG.....	45
Figura 14: Expressão imuno-histoquímica de ciclina D1 em meningioma.....	48
Figura 15: Ilustração esquemática dos métodos imuno-histoquímicos direto e indireto.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Frequência das principais áreas de localização dos meningiomas...	18
Tabela 2: Classificação de acordo com Simpson quanto ao grau, tipo de ressecção e recorrência dos meningiomas.....	24
Tabela 3: Taxas de sobrevida e recorrência em meningiomas de grau II e III..	25
Tabela 4: Biomarcadores de proliferação celular e prognóstico dos meningiomas.....	31
Tabela 5: Biomarcadores genéticos e prognóstico dos meningiomas.....	32
Tabela 6: Proteínas XP envolvidas na via NER.....	43

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1.1. Meningiomas.....	13
1.1.1. Epidemiologia.....	14
1.1.2. Localização.....	18
1.1.3. Classificação histológica.....	21
1.1.4. Recorrência.....	24
1.1.5. Tratamento.....	27
1.2. Biomarcadores.....	29
1.2.1. Biomarcadores em meningiomas.....	31
1.2.2. Ciclina D1.....	33
1.2.3. MUTYH.....	37
1.2.4. Proteínas grupo xeroderma pigmentoso do tipo F e G.....	42
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3. OBJETIVOS.....	65
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	66
5. CONCLUSÕES.....	101
6. SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	102
7. ANEXOS.....	129
7.1. Parecer do Comitê de Ética UFCSPA e ISCMPA.....	129
7.2. Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	138
7.3. Protocolo de execução da técnica de imuno-histoquímica.....	141
7.4. Certificado de qualificação na XI Jornada da Patologia da UFCSPA..	145
7.5. Certificado de participação na XII Jornada da Patologia UFCSPA.....	146
7.6. Certificado de apresentação na III Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da UFCSPA.....	147
7.7. Certificado de apresentação no Congresso UFCSPA Conectando Saúde e Sociedade.....	148

1. REFERENCIAL TEÓRICO

O presente estudo aborda os meningiomas, tumores do sistema nervoso central (SNC), e possíveis marcadores tumorais a eles associados. O texto a seguir embasa o referencial teórico necessário para a construção dos objetivos do trabalho, iniciando pelo estado atual do conhecimento sobre os meningiomas e suas características, estabelecidas ou controversas, e de novas perspectivas na busca dos mecanismos genéticos envolvidos em sua patogênese. O segundo capítulo aborda biomarcadores com possível papel preditivo na evolução clínica dos pacientes com meningiomas. Nos próximos subtítulos são revisadas as proteínas ciclina D1, MUTYH, XPF e XPG alvos da pesquisa. Elas estão envolvidas com mecanismos de controle celular e reparo de danos do DNA (ácido desoxirribonucleico), foram pouco estudadas (ciclina D1) ou estão inexploradas (MUTYH, XPF e XPG) na literatura, em relação aos meningiomas. Finalizando, destaca-se a imuno-histoquímica, técnica utilizada no desenvolvimento desta pesquisa.

1.1. Meningiomas

Os primeiros casos publicados de meningiomas são do século XVII. Com o advento dos exames por imagem, no século XX, e de novas técnicas cirúrgicas foi possível obter melhores resultados tanto de diagnóstico quanto de tratamento¹.

Os meningiomas são tumores com comportamento benigno e crescimento lento, porém com padrão recorrente. Apresentam incidência

crecente, correspondente à idade, sendo mais frequentes entre a quinta e sexta décadas de vida, com predominância no sexo feminino².

São classificados por grau e subtipos histológicos, sendo os subtipos agressivos mais recorrentes. São tumores sem apresentação sintomática característica, propiciando diagnóstico tardio e tamanhos significativos. Os tumores capazes de comprimir estruturas importantes podem causar sinais e sintomas e tumores removidos em condições ideais podem apresentar cura sem comprometimento neurológico. Além das características descritas, os meningiomas expressam diversos receptores hormonais e o tratamento dos casos recorrentes não é estabelecido³. Diversos estudos buscam identificar possíveis vias de patogênese e biomarcadores úteis no prognóstico, visando obter informações importantes sobre as características deste tumor⁴⁻⁷.

1.1.1 Epidemiologia

De acordo com dados da Central de Registros de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS), entre os anos de 2011 e 2015 os meningiomas corresponderam a 53% dos tumores não malignos e 37% de todos os tumores primários intracranianos². A incidência é de 8,3 a cada 100 mil habitantes, aumentando este índice significativamente após os 65 anos². Porém, estas estimativas podem estar subestimadas, uma vez que existem tumores assintomáticos diagnosticados por necropsias e achados de imagem⁸⁻¹⁰. Os aspectos étnicos também parecem ser relevantes na incidência de meningiomas. Negros não hispânicos têm maior incidência (9,14) quando comparados a brancos (7,40) e asiáticos (7,99)².

Os meningiomas são mais frequentes no sexo feminino, a partir dos 30 anos, antes disso, as frequências entre homens e mulheres são semelhantes. A predominância em mulheres é descrita na proporção 3:1, sugerindo uma influência hormonal na patogênese tumoral, com pico de maior incidência entre a quinta e sexta década de vida².

São tumores raros na população pediátrica, porém com apresentação de casos mais agressivos, e em sua maioria, associados à síndromes hereditárias, principalmente a neurofibromatose tipo 2. Meningiomas múltiplos são pouco observados, ocorrendo em menos de 10% dos casos¹¹.

Os meningiomas são oriundos de células da aracnoide que não expressam receptores de hormônios esteroides^{12,13}. Contudo, a presença de receptores de progesterona e de estrogênios nos meningiomas possibilita explicar a relação entre crescimento tumoral após uso de terapia com estrogênio/progesterona¹⁴. Entretanto, estudo associando terapia de reposição com estrogênio/progesterona e somente estrogênio demonstrou maior risco de meningioma nos casos com reposição única de estrogênio. Além disso, a regressão dos meningiomas foi vista em pacientes após a cessação do agonista de estrogênio, mas não nos pacientes em uso de estrogênio-progesterona¹⁵.

Os meningiomas grau I apresentam maior expressão de receptores de progesterona em relação à meningiomas grau II e III, não havendo diferença entre os gêneros¹⁶. Receptores de progesterona são considerados os mais prevalentes nos meningiomas em relação a receptores de estrogênio e androgênios¹⁷. Segundo Korhonen *et al.* (2006)¹⁸ os receptores de

progesterona estão presentes em 88% dos casos, enquanto os receptores de estrógenos e andrógenos em 40%.

A relação entre o crescimento tumoral e gravidez também é associado a presença de receptores hormonais, em especial, receptores de progesterona. Em estudo de Wiemels *et al.* (2010)¹⁹, observou que pacientes com meningiomas, em períodos de elevados níveis de progesterona, como no ciclo menstrual ou gravidez, apresentavam agravamento dos sintomas clínicos, e após interrupção do agonista de estrogénio, houve diminuição dos sintomas. Wigertz *et al.* (2008)²⁰ sugere que quanto maior o número de gestações com nascidos vivos antes dos 50 anos, maior o risco de meningiomas, corroborando a hipótese do efeito dos hormônios no crescimento tumoral, visto crescimento lento do meningioma e que níveis elevados de estrógenos e progesterona durante a gestação estimulam o crescimento deste tumor.

Diversos são os indicadores positivos da interação entre hormônios sexuais femininos e o desenvolvimento de meningiomas. Inicialmente, a predominância destes tumores em mulheres e o crescimento tumoral em fases lútea do ciclo menstrual e da gravidez são descritos, bem como a regressão do crescimento e de sintomas após o parto e nos anos seguintes¹⁷. O risco elevado de meningioma em mulheres com câncer de mama e a reposição exógena ou endógena de hormônios também é associada aos meningiomas.

O uso de hormônios sexuais exógenos, como anticoncepcionais e de terapias de reposição já foram associados a aumento do risco de meningiomas. Korhonen *et al.* (2010)²¹ observou relação entre uso de hormônios sexuais exógenos femininos e o risco de meningiomas. No estudo, mulheres em uso de contraceptivos por mais de quatro anos e com tumores expressando receptores

estrogênicos apresentaram maior risco. Os autores ainda sugerem que quanto maior o período de exposição a terapias de reposição maior o risco de meningiomas em mulheres pós-menopausa. Em contrapartida, Custer *et al* (2006)²² não observou estes resultados, porém não recomendam terapia de reposição em pacientes com histórico clínico prévio. Cea-Soriano *et al.* (2012)²³ também não observaram esta relação em mulheres, contudo houve relação em homens usuários de análogos de andrógenos, em altas doses e por curto prazo.

Associação com o índice de massa corporal (IMC) elevado e o risco de meningiomas também já foram descritos, sugerindo-se relação entre a adiposidade elevada e ativação da aromatase, enzima fundamental na produção de estrógenos¹⁵. Claus *et al.* (2013)²⁴ também associaram aumento de massa corporal ao risco de meningiomas, bem como associação negativa com a amamentação e tabagismo.

1.1.2 Localização

Os meningiomas são oriundos das células meningoteliais, presentes na aracnoide, formada por fibroblastos justapostos que resultam em um mínimo espaço extracelular com ausência de colágeno, formando uma barreira de células impermeáveis a fluidos, moléculas de alto peso e alguns íons²⁵. A partir desta barreira, surgem trabéculas de fibroblastos que aderem à pia-máter, formando o espaço subaracnoide, composto por líquido, vasos e estruturas neurais (Figura 1).

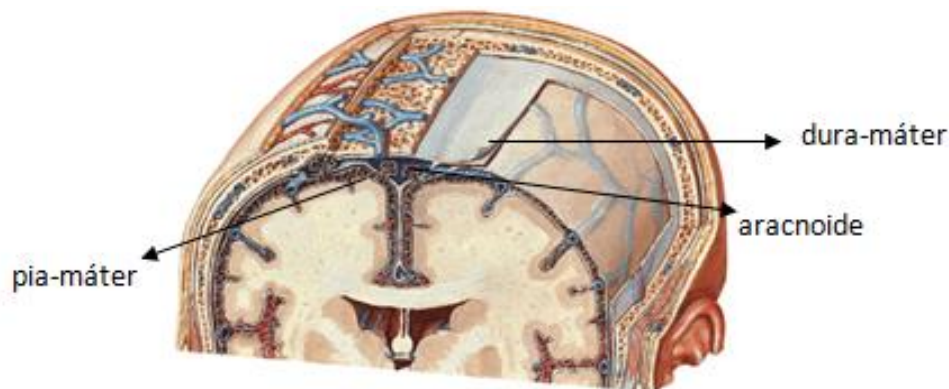


Figura 1. Ilustração esquemática das meninges (Adaptado de Sobotta Atlas de Anatomia Humana, 24 ed)²⁶.

Os meningiomas são frequentemente encontrados nos pontos em que a aracnoide se projeta para o interior da dura-máter, ocorrendo formação dos corpúsculos de Pacchioni, ou acompanhando a saída dos grandes seios venosos²⁷. A região supratentorial é a mais frequente para o desenvolvimento dos meningiomas, possivelmente por maior concentração de células da aracnoide. As localizações mais comuns de crescimento dos meningiomas estão ilustradas na Figura 2.

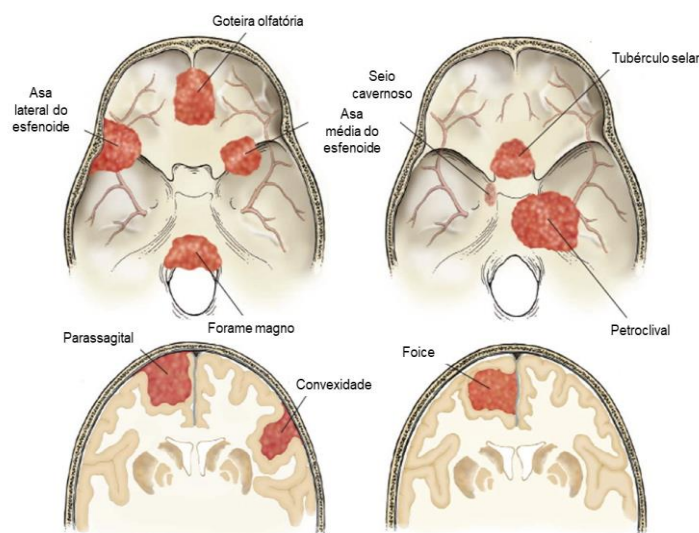


Figura 2. Principais localizações dos meningiomas (Adaptado de Perry, 2017)²⁸.

Os meningiomas também podem ser divididos de acordo com sua localização: central e/ou periférica, de acordo com Splavski *et al.* (2017)²⁹. As frequências das localizações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência das principais áreas de localização dos meningiomas.

Localização	%	Localização	%
Central		Periférica	
Parassagital	15%	Convexidade	32%
Suco olfativo	9%	Esfenoide (pterion)	7%
Foice	6%	Fossa posterior	6%
Esfenoide (clinoidal)	6%	Ângulo ponto cerebelar	5%
Tubérculo selar (suprasselar)	1%	Temporobasal	4%
Seio carvernososo (parasselar)	1%		
Petroclival	<1%	Asa do esfenoide	2%
Forame magno	<1%		
Intraventricular	<1%		

(Adaptado de Splavski e cols., 2017)

A apresentação clínica depende da localização e do tamanho do tumor inicial. Os sintomas mais frequentes são cefaleias, sinais focais e crises epiléticas³⁰. Em virtude do tamanho e da presença/ausência de edema peritumoral, podem causar compressão de estruturas adjacentes ocasionando sintomatologia relacionada à síndrome de hipertensão intracraniana^{23,31}.

Em exames de imagem, meningiomas com bordas irregulares e a presença de edema peri-tumoral podem ser fatores preditivos associados a invasão cerebral e agressividade (Figura 3).

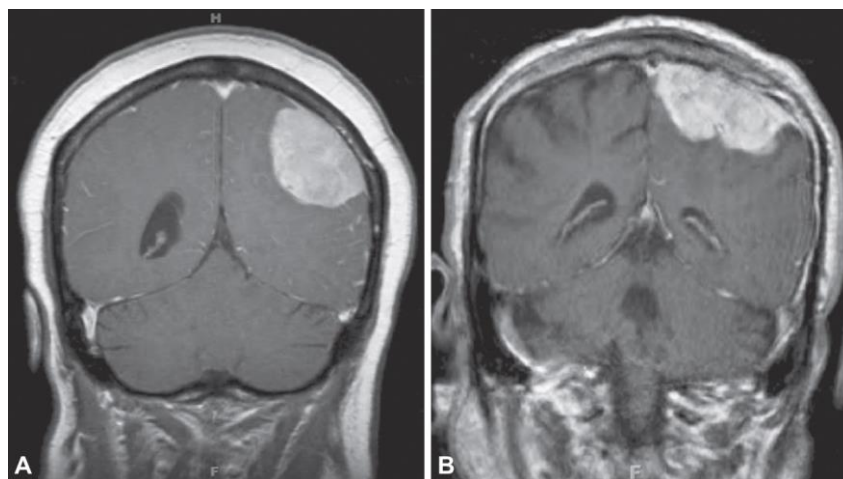


Figura 3. Ressonância magnética de paciente com meningioma. A. Meningioma de convexidade, extra axial, contraste ponderado em T1 com sinal da cauda dural. B. Meningioma atípico, extra axial, contraste ponderado em T1, com sinal da cauda dural e bordas irregulares (Adaptado de Perry, 2017)²⁸.

De acordo com Oya *et al.* (2011)³², a presença de edema, tamanho superior a 2,5 cm de diâmetro, ausência de calcificação, hiperintensidade em T2 e sintomas são fatores importantes para o desenvolvimento tumoral, sugerindo acompanhamento mais próximo destes casos. Em relação ao tamanho do tumor, segundo Karsy *et al.* (2016)³³, consideram-se grandes os casos com tamanho superior a 3 cm.

1.1.3 Classificação histológica

Os meningiomas são massas nodulares ou lobulares, com superfície lisa e estão aderidos internamente à dura-máter, possuem tamanho variável e consistência firme à macroscopia. Ao corte, podem ser observadas áreas vermelho-escuro e áreas translúcidas. Degenerações, cistos, hialinização,

calcificações, bem como ossificações e edemas peritumorais podem ser encontradas²⁷. Microscopicamente, assemelham-se a outros tipos tumorais, tornando as técnicas histológicas auxiliares importantes na correta diferenciação³⁴.

Conhecer a histologia dos tumores é determinante para a identificação e posterior estadiamento das lesões. Em 1931, a primeira classificação oficial foi proposta e, desde então, foram realizadas diversas alterações. A classificação mais aceita é a elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que divide os meningiomas em três grupos: benignos (grau I), atípicos (grau II) e anaplásicos (grau III), de acordo com as características histológicas e citomorfológicas³⁵. Os subtipos histológicos por grau, critérios de classificação e índices de recorrência estão descritos na Figura 4.

Benignos Grau I (80-90%) Recorrência: 7-20%	Atípicos Grau II (5-15%) Recorrência: 30-40%	Anaplásicos Grau III (1-3%) Recorrência: 50-80%
<ul style="list-style-type: none"> • Meningotelial • Fibroblástico • Transicional • Psamomatoso • Angiomatoso • Secretor • Microcístico • Linfoplasmocítico • Metaplásico 	<ul style="list-style-type: none"> • Atípico • Cordoide • Células claras ❖ 4 ou mais mitoses ❖ Invasão celular ❖ Presença de pelo menos 3 itens: aumento de celularidade, nucléolo proeminente, necrose espontânea, proporção núcleo/citoplasma, arquitetura difusa 	<ul style="list-style-type: none"> • Anaplásico • Papilar • Rabdoide ❖ Citologia maligna (Semelhante a sarcoma, melanoma e carcinoma) ❖ 20 ou mais mitoses

Figura 4. Classificação geral dos meningiomas de acordo com a OMS (Adaptado de Harter, 2017)³⁵.

Os subtipos histológicos mais frequentes são de grau I (meningotelial, fibroblástico e transicional) e não estão associados a casos de mortalidade, embora apresentem elevada morbidade, considerando lesões na base do crânio (Figura 5).

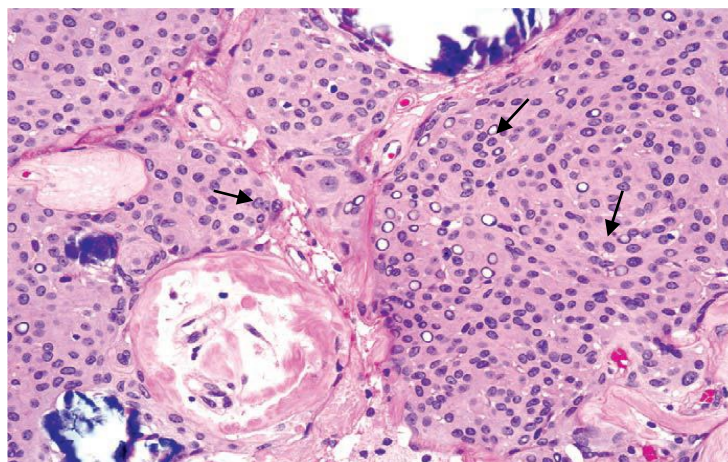


Figura 5. Meningioma meningotelial (grau I). Células uniformes e inclusões intranucleares típicas, coloração de hematoxilina e eosina (HE), 400x (Adaptado de El-Gewely, 2016)³⁶.

A classificação dos meningiomas de grau II e III é baseada em critérios estabelecidos: nucléolo proeminente, alta celularidade, perda da arquitetura fascicular, necrose e células pequenas com alta proporção núcleo/citoplasma. A presença de três destas características classifica o caso como grau II. O número de mitoses (quatro ou mais mitoses em 10 campos com maior celularidade) e a invasão cerebral, incorporada pela última atualização da OMS, isoladamente já podem classificar a lesão como atípica (Figura 6)³⁵.

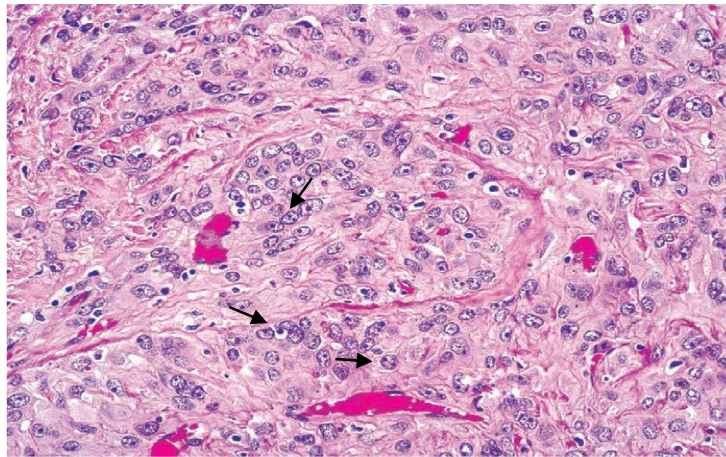


Figura 6. Meningioma atípico (grau II). Perda da arquitetura celular, nucléolos proeminentes, coloração de hematoxilina e eosina (HE), 400x (Adaptado de Perry, 2017)²⁸.

Os meningiomas de grau II e III, além de taxas de mortalidade e morbidade elevadas são frequentemente recorrentes³⁷. As lesões de grau III apresentam elevado índice de mitoses (20 ou mais mitoses em 10 campos de alta celularidade) e invasão tumoral, podendo ocorrer metástases (Figura 7)^{11,35,38}. As metástases são consideradas raras, geralmente são descobertas acidentalmente, em casos com lesões extensas de grau II (5%) e III (30%). Os sítios metastáticos mais comuns são pulmão, fígado, linfonodos cervicais e osso^{39,40}.

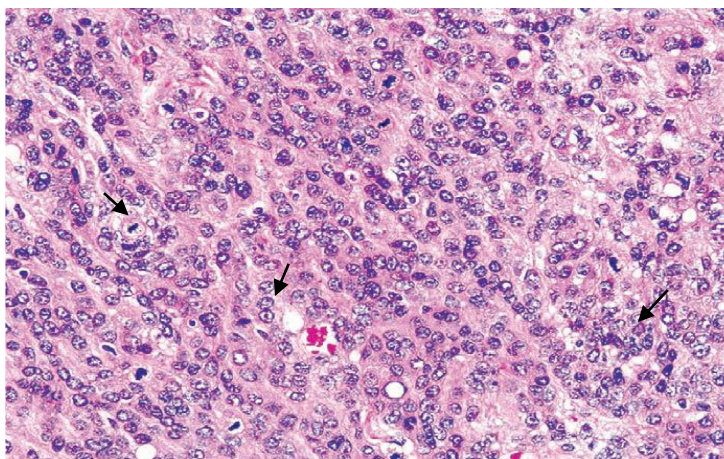


Figura 7. Meningioma anaplásico (grau III). Hiper celularidade devido à alta atividade mitótica, coloração de hematoxilina e eosina (HE), 400x (Adaptado de Riemenschneider, 2006)⁴¹.

1.1.4. Recorrência

Em 1957, Donald Simpson e colegas comprovaram, pela primeira vez, a correlação entre a extensão da remoção cirúrgica e a taxa de recorrência, dividindo os tumores em graus de remoção⁴². A classificação adotada por Simpson ainda é usada e está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de acordo com Simpson quanto ao grau, tipo de ressecção e recorrência de meningiomas.

Grau	Ressecção	Risco de Recorrência
I	Remoção total com ressecção da dura-máter e de ossos anormais;	9%
II	Remoção total com coagulação da inserção dural	16%
III	Remoção total sem coagulação da inserção dural	29%
IV	Remoção subtotal (parcial)	39%
V	Descompressão simples	-

(Adaptado de Simpson., 1957)

A maioria dos meningiomas tem prognóstico favorável a longo prazo, porém os casos recorrentes ainda são desafiadores quanto à conduta terapêutica escolhida. Os tumores ressecados parcialmente apresentam taxas de recorrência de aproximadamente 80%, caindo as taxas para 6-30% nos tumores totalmente ressecados⁴²⁻⁴⁴. Os meningiomas devem ser removidos completamente, incluindo possível adesão à dura-máter e infiltrações ósseas, pois estes são fatores preditivos importantes para a recorrência tumoral, seguidos pelo grau do edema e invasão cerebral⁴⁵.

Outro fator relacionado à recorrência é o grau tumoral elevado. A recorrência dos meningiomas atípicos e anaplásicos é mais prevalente quando comparada com os benignos. Aproximadamente metade dos casos dos meningiomas atípicos (grau II) recorrem na primeira década e a maioria dos casos de tumores anaplásicos em 2 anos^{3,37}. Taxas de recorrência e sobrevida dos tumores atípicos (grau II) e anaplásicos (grau III) estão descritas na Tabela 3. Contudo, a presença de calcificações e fibrose podem ser indicativos de não-recorrência tumoral^{11,46}.

Tabela 3. Taxas de sobrevida e recorrência em meningiomas grau II e III.

	Sobrevida média (anos)	Sobrevida em 5 anos (%)	Média tempo de sobrevida (anos)	Taxa de recorrência 5 anos (%)	Taxa de recorrência 10 anos (%)
Grau II (atípicos)	11-19	80-95	12	23	45
Grau III (anaplásico)	2-7	28-64	2	55	85

(Adaptado de McNeil e cols., 2016)

A relação entre os receptores hormonais sexuais e a recorrência não está estabelecida, porém sugere-se que a presença de receptores de progesterona em meningiomas pode ser útil para avaliar o comportamento

destes tumores. Há relatos na literatura quando a maior expressão de receptores de progesterona em meningiomas grau I em comparação com os meningiomas de graus II e III¹⁶. Hilbig et al (1998)⁴⁷ descreve que a expressão dos receptores de progesterona não é suficiente para predizer a malignidade tumoral, porém útil associada à demais variáveis. A expressão de receptores de progesterona já foi associada com Ki-67, marcador importante de proliferação celular, e demonstrou que os meningiomas benignos, além de elevados níveis de receptores de progesterona, apresentavam baixa expressão de Ki-67. O contrário foi observado em meningiomas grau II, que demonstraram menor expressão de receptores de progesterona e maior marcação de Ki-67⁴⁸. Wahab *et al.* (2003)⁴⁹ sugere menor risco de recorrência em tumores com receptores de progesterona positivos e, segundo Roser *et al.* (2004b)⁵⁰ meningiomas com receptores negativos apresentaram maior vascularização e maiores índices de Ki-67.

Em relação aos receptores de estrógeno e andrógenos, Korhonen et al (2006)¹⁸ avaliaram 510 casos e concluíram que 88% dos meningiomas eram positivos para receptores de progesterona, 40% para os de estrógeno e 39% para os de andrógeno. Contudo, não observaram diferença quanto a expressão dos hormônios entre homens e mulheres, bem como com recorrência tumoral, porém identificou expressão significativamente menor em meningiomas de grau II e III. Konstantinidou *et al.* (2003)⁵¹ também relatou menor expressão de receptores de estrógenos em meningiomas de grau II.

1.1.5 Tratamento

De acordo com o *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology* o diagnóstico de meningiomas deve ser realizado através imagens (tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) e, se necessário, realização de biópsia. Considerando-se que a maioria dos meningiomas são assintomáticos e com crescimento lento, os mesmos devem ser acompanhados periodicamente através da clínica e de imagem, com o objetivo de monitorar sua evolução³³.

Nos casos assintomáticos considerados grandes (maiores que 3 cm) e acessíveis é recomendada a remoção cirúrgica. A cirurgia também é indicada nos casos sintomáticos de qualquer tamanho ou grau tumoral³³. A remoção cirúrgica deve ter como objetivo principal a completa ressecção do meningioma, visando diminuir as chances de recorrência⁴⁵. Outras variáveis também devem ser observadas, como a idade, localização do tumor e histórico clínico, com o intuito de ponderar quanto ao benefício clínico a ser obtido com a cirurgia⁵².

Para as lesões benignas o acompanhamento pós-cirúrgico é indicado por meio de ressonâncias magnéticas nos primeiros três, seis e 12 meses, após isso semestralmente por cinco anos, diminuindo a frequência após os cinco anos. Os casos mais graves devem ser acompanhados mais de perto³³.

Após a remoção cirúrgica, a radioterapia é considerada padrão nos meningiomas anaplásicos (grau III) e opcional para as lesões benignas (grau I) e atípicas (grau II). Para os casos recorrentes ou inoperáveis, devido à localização da lesão ou à falta de condições clínicas, a radioterapia também

deve ser tratamento de escolha, visando estabilizar a progressão tumoral e reduzir os índices de recorrência, contudo seu uso pode causar efeitos colaterais a longo prazo, como neoplasias secundárias e leucoencefalopatias^{28,53,54}.

Para os casos recorrentes e não passíveis de cirurgia e radioterapia, são indicadas três classes de agentes quimioterápicos, testados com resposta positiva em ensaios clínicos: interferon- α , agonista de receptores de somatostatina e inibidores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), independentemente do grau do tumor³³.

Devido à expressão de receptores hormonais, como os receptores de progesterona, frequentemente encontrados, e os receptores de estrógenos, com expressão limitada, vários estudos avaliaram o papel de agentes hormonais no tratamento de meningiomas.

O agonista parcial de progesterona mifepristona mostrou resultados controversos quanto à regressão tumoral^{55,56}. Walter *et al.* (2005)⁵⁷ sugerem que a administração pré-operatória de medroxiprogesterona em pacientes com receptores de progesterona positivos poderia melhorar a resposta clínica em comparação com meningiomas sem expressão destes receptores.

Em estudo utilizando silvestrol (ciclopentabenzofuran), inibidor do fator de iniciação da tradução eucariótica 4A (eIF4A), *in vitro* em meningiomas, o mesmo se mostrou agente antiproliferativo, induzindo paradas no ciclo celular e reduzindo níveis de fatores de tradução de proteínas, sugerindo que terapias bloqueadoras de fatores de tradução poderiam reduzir o potencial proliferativo dos meningiomas^{58,59}.

1.2 Biomarcadores

Atualmente, com o avanço das técnicas diagnósticas que permitem a detecção precoce de doenças e a melhor escolha terapêutica, a busca por marcadores de acurácia comprovada é de extrema relevância^{60,61}. Os marcadores tumorais ou biomarcadores são macromoléculas encontradas no tumor, sangue e em líquidos biológicos, cujo aparecimento ou alteração de concentração se relaciona com o início ou desenvolvimento de tumores. Estas substâncias podem sinalizar a presença de tumor, sendo produzidas pelo mesmo ou sendo uma resposta do organismo às alterações⁶².

Os marcadores tumorais são proteínas ou porções proteicas, quantificados por técnicas bioquímicas (sangue) ou imuno-histoquímicas (tecidos) e por técnicas moleculares para pesquisa de oncogenes e supressores tumorais ou alterações genéticas⁶³. Os marcadores de diagnóstico bioquímico são os mais utilizados na prática clínica, por serem obtidos com relativa facilidade e de amplo acesso⁶⁴.

Biomarcadores associados à tumorigênese (transformação da célula normal em neoplásica), reparação de erros no DNA, regulação de ciclo celular, e densidade celular podem ser úteis para escolha correta dos tratamentos e uso de medicamentos específicos, além de detectar casos com maior probabilidade de recorrência^{65,66}. Pode-se utilizar marcadores para identificação precoce de pacientes com alto risco de desenvolver uma doença, principalmente as doenças assintomáticas em fases iniciais, possibilitando a intervenção médica adequada, evitando ou retardando manifestações mais graves^{62,67}.

A utilização de marcadores deve ser feita de forma complementar a outros exames diagnósticos e clínicos e seus resultados avaliados de forma personalizada⁶⁸. A associação de marcadores com dados clínicos permite conhecer a dinâmica e a interação de diferentes vias de desenvolvimento dos tumores. A informação oriunda destes painéis tem ampliado a avaliação e acompanhamento dos pacientes.

1.2.1 Biomarcadores em meningiomas

Os pacientes com meningiomas, devido à frequência de casos recorrentes, podem apresentar um quadro desfavorável e ainda não se estabeleceu consenso de tratamento para estes casos⁴⁹. Um dos usos dos marcadores em meningiomas é a obtenção de um perfil dos casos recorrentes e não-recorrentes, identificando características clínicas e genéticas que auxiliem na conduta médica⁶⁹.

Apesar da maioria dos casos serem benignos, a recorrência é observada em todos os graus e subtipos histológicos. O índice de recorrência é avaliado a partir do tipo de ressecção cirúrgica e dos índices mitóticos (número de mitoses por campo com maior número de células), considerados preditores de tempo de sobrevida livre de recorrência e agressividade do tumor. O índice mitótico também é utilizado pela OMS na classificação quanto ao grau tumoral dos meningiomas³⁵. Valores elevados dos marcadores proliferativos relacionam-se com comportamento agressivo e pior prognóstico. Os principais biomarcadores de proliferação celular em meningiomas estão descritos na Tabela 4⁷⁰⁻⁷³.

Tabela 4. Biomarcadores de proliferação celular e prognóstico dos meningiomas.

Proteínas	Gene	Atuação	Prognóstico
Ki-67	<i>MKI67</i>	Proliferação celular	Crescimento tumoral, alto risco de recorrência
p53	<i>TP53</i>	Regulação do ciclo celular	Risco de recorrência e agressividade
Bcl-2	<i>BCL2</i>	Anti-apoptótico	Risco de recorrência e agressividade
PHH3	<i>HIST3H3</i>	Ciclo celular (mitose)	Risco de recorrência
MCM7	<i>MCM7</i>	Controle do ciclo celular	Risco de recorrência
PCNA	<i>PCNA</i>	Síntese de DNA	Recorrência e agressividade
Ciclina D1	<i>CCDN1</i>	Controle do ciclo celular	Recorrência, agressividade e invasividade

Legendas: Ki-67: marcador de proliferação Ki-67; p53: antígeno tumoral p53; Bcl-2: *B-cell leukemia 2*; PHH3: Histona H3; MCM7: Componente 7 do complexo de manutenção de minicromossomo; PCNA: antígeno de proliferação celular nuclear; CCDN1: *gene* ciclina D1 (Adaptado de Kim e cols., 2001; Panagopoulos e cols., 2008; Cheng e cols., 2015; Tirapelli e cols., 2017)

Com o avanço das técnicas moleculares, os biomarcadores se mostram ferramentas úteis na pesquisa de alterações e mutações genéticas presentes nos meningiomas. Estas estão associadas a alguns subtipos histológicos distintos e sua localização anatômica⁷⁴, como por exemplo, os meningiomas secretores (grau I) frequentemente apresentam mutações no KLF4 (fator semelhante a *Krüppel* 4) e TRAF7 (fator de necrose tumoral associado ao receptor 7), enquanto nos meningiomas fibroblásticos observa-se mutação no NF2. Nos meningiomas de região de convexidade e da base posterior do crânio relata-se mutações inativadoras em NF2 e monossomia do cromossomo 22, enquanto meningiomas da base anterior e lateral do crânio tendem a ter mutações em SMO (receptor de classe suavizado) ou AKT1 (homólogo de oncogene viral de timomamurino)^{75,76}. As alterações genômicas mais frequente encontradas nos meningiomas são a deleção no braço longo do cromossomo 22 e a inativação do gene supressor tumoral NF2⁷⁷. Os biomarcadores

associados às mutações genéticas mais comuns e clinicamente relevantes em meningiomas estão descritos na Tabela 5⁶⁹.

Tabela 5. Biomarcadores genéticos e prognóstico dos meningiomas.

Alteração molecular	Mutação/proteína	Grau tumoral	Prognóstico
TRAF7	Múltiplas, pontuais	I-III	Dependente da co-mutação
AKT1	E17K	I	Risco baixo de recorrência (prognóstico favorável)
SMO	W535L L412F	I	Risco moderado de recorrência
TERT	C228T	I-III	Alto risco de recorrência (prognóstico ruim)
NF2	Deleções e mutações pontuais	I-III	Deleção (prognóstico ruim) Mutação (risco moderado de recorrência)
Proteínas reguladoras (checkpoints)	PD-L1 TIM-3 LAG-3	III	Alto risco de recorrência (prognóstico ruim)

TRAF7: fator associado ao receptor de necrose tumoral 7; AKT1: homólogo de oncogene viral de timomamurino 1; SMO: receptor de classe suavizado; TERT: transcriptase reversa da telomerase; NF-2: Neurofibromatose tipo 2. (Adaptado de Proctor e cols.,2018)

Em estudo caso-controle, avaliando a presença de polimorfismos, com 631 casos de meningiomas, foi demonstrada associação significativa com gene BRIP1 e meningiomas⁷⁸. Rajamarann *et al.* (2010)⁷⁹, observou aumento do risco de meningioma na presença de polimorfismos GLTSCR1 (Glioma tumor suppressor candidate region gene 1), ERCC4 (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 4), PCNA e MUTYH.

1.2.2. Ciclina D1

A proteína ciclina D1, codificada pelo gene *CCDN1* (cromossomo 11q13), pertence à família das ciclinas, juntamente com as ciclinas D2 e D3 e está presente ao longo do ciclo celular, sendo intimamente relacionada à regulação e ao controle⁸⁰⁻⁸². As ciclinas são formadas por uma sequência de 100 aminoácidos, onde o domínio N-terminal proporciona a ligação com as CDKs (quinases dependentes de ciclina) e o domínio C-terminal é responsável pela estabilidade proteica⁸³.

A partir de sinais ou vias de transdução extracelulares, como por exemplo fatores de crescimento ou mitógenos, observa-se o aumento da transcrição, tradução e estabilidade proteica da ciclina D1, permitindo a formação de complexos ativos com as CDK4 e CDK6 no núcleo e consequentemente a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). Após isso, ocorre a dissociação do complexo pRb/E2F, permitindo a liberação do E2F (fator de transcrição E2F) e a progressão do ciclo celular (transição da fase G1, na qual a célula passa por processos de crescimento, diferenciação e produção de substâncias, para a fase S, na qual ocorre a duplicação do material celular) (Figura 8). Nas células que não estão em processo de divisão celular, a pRb encontra-se hipofosforilada, inibindo o ciclo celular através da formação de um complexo inativo com o E2F⁸³⁻⁸⁶.

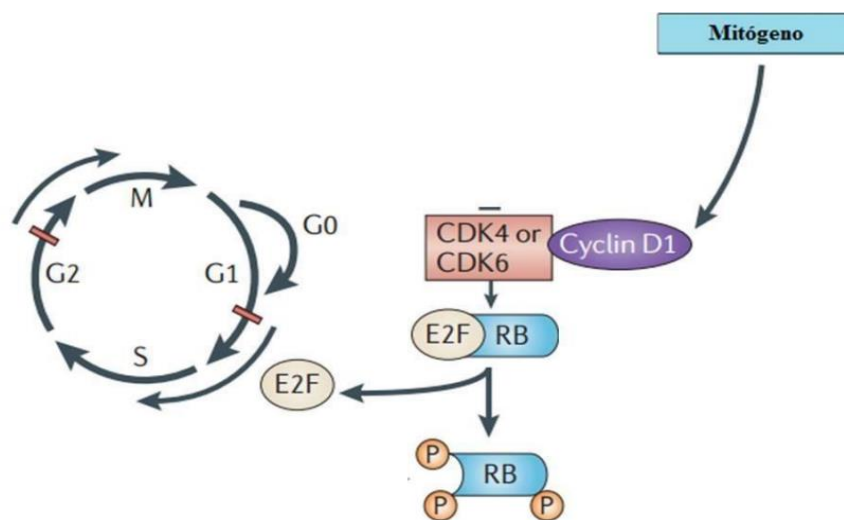


Figura 8. Via de ativação da ciclina D1 e progressão do ciclo celular (Adaptado de Leemans e colaboradores, 2011)⁸⁷.

O complexo ciclina/CDK é mantido enquanto há presença de fatores indutores de mitose e, na ausência destes fatores, a ciclina D1 é rapidamente transportada do núcleo para o citoplasma pela proteína glicogênio sintase quinase 3-beta ($GSK-3\beta$), onde é marcada com ubiquitina para ser degradada via proteossoma^{87,88}. Ao final da fase G1 é realizado um *checkpoint* (ponto de restrição), no qual observa-se possíveis alterações celulares, resultando na autorregulação, replicação do DNA e progressão contínua do ciclo celular⁸⁶. No crescimento de células tumorais ocorre a superexpressão das ciclinas D1 e aumento na ativação de CDKs.

A expressão aumentada da ciclina D1 é comum nas células em divisão celular e observada em determinados tipos de neoplasias, como mama, bexiga, adenomas de hipófise, entre outros, e está associada à alteração na amplificação e translocação do gene *CCND1* e/ou na degradação deficiente da ciclina D1^{89,90}.

A análise da tumorigênese relaciona a superexpressão de ciclina D1 com um elevado grau de instabilidade genômica, propiciando o desenvolvimento tumoral, redução da sobrevida livre de doença e mau prognóstico⁹¹⁻⁹⁴.

As alterações genômicas associadas à ciclina D1 podem variar desde polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), como o G870A (troca do nucleotídeo guanina por uma adenina na posição 870), considerado o mais relevante devido à capacidade de formar isoformas variantes da proteína^{95,96}, até translocações cromossômicas importantes (justaposição do gene *CCND1* e da imunoglobulina em linfomas), ocasionando a superexpressão desta proteína⁹⁷. Relacionando a ciclina D1 com genes supressores tumorais (*RUNX1T1*), observou-se que a baixa expressão dos mesmos com a alta expressão de ciclina D1 e p53, ambas associadas à proliferação, poderiam ser fatores contribuintes no crescimento dos meningiomas³⁶.

A expressão proteica da ciclina D1 foi estudada em meningiomas e demonstrou relação significativa com o marcador de proliferação MIB-1 (*mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1*) e elevada expressão em meningioma grau II e III, sugerindo que essa combinação pode definir os meningiomas com maior potencial agressivo⁹⁸. Em relação ao grau tumoral, a ciclina D1 demonstrou maior expressão nos graus mais elevados (II e III) e nos casos de grau I com recorrência, corroborando a hipótese da ciclina D1 induzir comportamento mais agressivo e predizer casos recorrentes⁷¹. Segundo Milenković *et al.* (2008)⁹⁹, estudo comparativo entre marcadores proliferativos como ciclina D1, Ki-67, PCNA (antígenos nucleares de proliferação celular)

mostrou expressão muito similar entre eles, sugerindo que a ciclina D1 pode ser usada como um marcador proliferativo em meningiomas.

1.2.3. MUTYH

O DNA é uma molécula orgânica de alta complexidade, responsável por armazenar informações genéticas que devem ser mantidas de uma geração para outra e, para isso, a integridade da molécula deve ser conservada. Apesar da sua capacidade de se manter estável, a constante exposição a agentes com potencial de danificar seu material genético pode produzir lesões em sua estrutura e prejudicar os processos de replicação ou de transcrição gênica¹⁰⁰.

Os agentes nocivos ao DNA são inúmeros, podendo ser ambientais (como radiações ultravioletas), físicos e químicos (como quimioterápicos e intermediários de processos celulares normais). A oxidação, alquilação e desaminação das bases são os principais processos endógenos celulares responsáveis por danificar o DNA¹⁰¹. Tais danos são comuns e inevitáveis, pois ocorrem a partir da sua instabilidade natural ou de reações intracelulares que geram produtos ou metabólitos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio¹⁰². Para evitar que estes agentes danifiquem o DNA, os mecanismos de reparo são fundamentais, assegurando a completa transmissão das informações gênicas.

O mecanismo de reparo do DNA é dividido em quatro vias: reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo de pareamento errôneo e reparo de quebra de fita dupla. O mecanismo de reparo do tipo excisão de bases (BER) é a principal via de reparo de DNA, pois corrige lesões

que não causam alterações na estrutura da dupla hélice, porém modificam bases individuais¹⁰⁰, sendo esta a via de reparo da proteína MUTYH.

A BER é composta por proteínas do tipo glicosilases, endonucleases, polimerases e ligases, que atuam através da excisão e substituição da base, removendo as alterações no DNA e restaurando seu estado original. O reconhecimento da base danificada é realizado por uma DNA glicosilase, específica para cada base modificada¹⁰³.

O produto da oxidação da guanina (8-oxoG) é o resultado da introdução de um oxigênio no carbono de posição 8 (C8) e um hidrogênio no nitrogênio de posição 7 (N7) (Figura 9). Esta lesão é considerada a mais abundante no DNA, estima-se que aproximadamente 10^3 lesões são formadas diariamente em uma célula normal, sendo este número aumentado em tecidos tumorais¹⁰⁴. Estas características permitem a utilização da 8-oxoG como biomarcador de dano por estresse oxidativo¹⁰⁵.

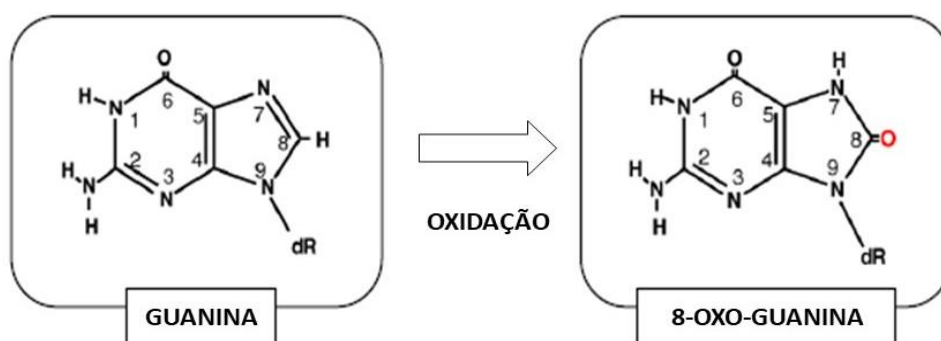


Figura 9. Estrutura da guanina após oxidação (8-oxoG) (Adaptado de Nakabeppu, 2014)¹⁰⁶.

A via de reparo da 8-oxoG é composta pelas enzimas OGG1 (DNA glicosilase 8-oxoguanina), MUTYH (DNA glicosilase muty) e MTH1 (mutT homólogo humano 1 fosfatase). A OGG1 é uma glicosilase considerada bifuncional, pois reconhece e remove a lesão quando pareada com a citosina (8-oxoG:C). Após a remoção da base oxidada, o sítio abásico (apurínico ou apirimidínico) será reestabelecido (G:C). Contudo, se a replicação acontecer sem a remoção da 8-oxoG pela OGG1, ocorre a formação de um par de bases incorreto (8-oxoG:A), visto que as DNA polimerases replicativas pareiam preferencialmente adeninas com as lesões 8-oxoG.

A proteína MUTYH é composta por 546 aminoácidos, codificada pelo gene homólogo mutY, localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32.1) e é formada por 16 éxons. A função da MUTYH é reconhecer o par de bases alterado (8-oxoG:A) e remover a adenina. Os processos seguintes são realizados por enzimas polimerases de reparo que realizam o pareamento 8-oxoG:C, gerando novo substrato para a enzima OGG1¹⁰⁷.

Um processo fundamental na via da 8-oxoG é a eliminação das bases oxidadas do *pool* de nucleotídeos. Esse processo é realizado pela enzima MHT1 que hidrolisa a base oxidada, impedindo sua incorporação no DNA pelas polimerases e a ativação da glicosilase MUTYH¹⁰⁸. A Figura 10 ilustra a via 8-oxoG.

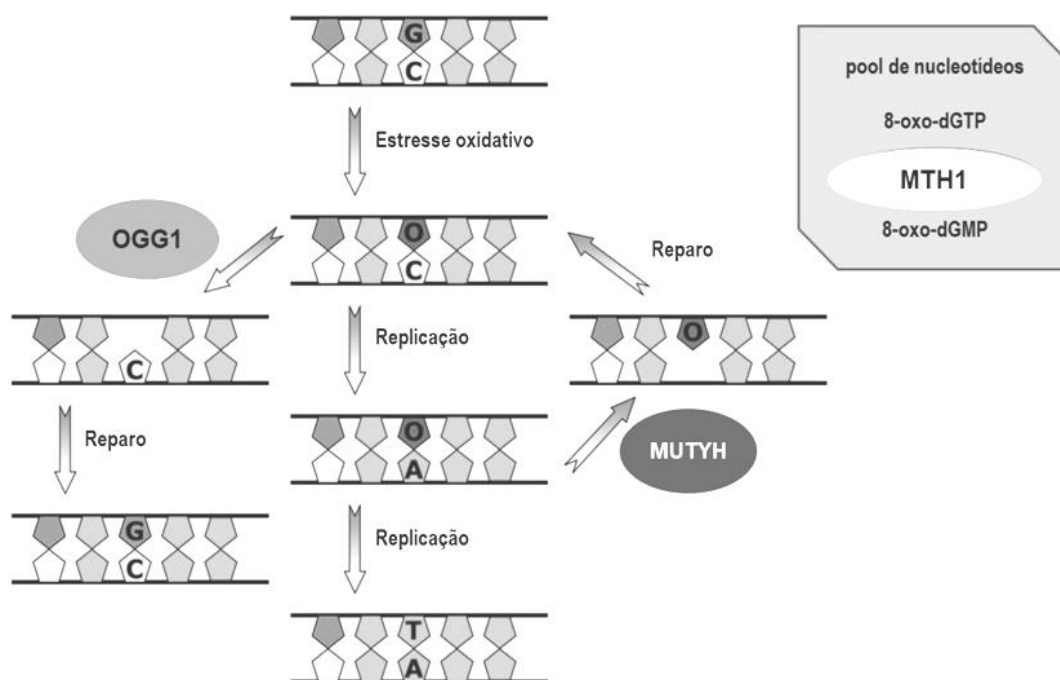


Figura 10. Esquematização da via de reparo da 8-oxoG (Adaptado de David e colaboradores, 2007)¹⁰⁹.

Como resultado das falhas durante a remoção das lesões 8-oxoG, observam-se mutações do tipo transversão, ou seja, a troca de um par G:C por um T:A. Quando ocorrem várias lesões muito próximas no material genético, a capacidade de reparo pode ser alterada, ocasionando perda de eficiência. Estas lesões causam grande instabilidade do genoma, e podem interferir em outras vias de reparo e na quebra da filha dupla de DNA¹⁰⁹.

Estudos citogenéticos têm sugerido que, quando ocorrem perdas em alelos ligados ao cromossomo 1, há maiores chances de progressão de doença e recorrência tumoral. Em meningiomas, a perda alélica no braço curto do cromossomo 1 é uma das anormalidades mais frequentes, seguida pela deleção no cromossomo 22 e a inativação de NF2¹¹⁰. O gene codificante da proteína MUTYH está localizado no gene homólogo mutY, no braço curto do cromossomo 1 (1p32.1). A perda do cromossomo 1 ocorre em todos os graus

tumorais, porém a frequência está aumentada nos graus II e III, relacionando a provável presença de gene supressor tumoral nesta região e seu envolvimento com a progressão tumoral¹¹¹.

O uso da imuno-histoquímica como técnica preditiva para avaliação da presença de mutações em tumores ainda é recente. A análise protéica, em pacientes com polipose recessiva associada à MUTYH (MAP), condição clínica caracterizada por múltiplos adenomas colorretais, câncer e presença de mutações bialélicas no gene *MUTYH*, permitiu identificar pacientes com esta mutação através de marcação imuno-histoquímica específica (ausência de marcação nuclear e marcação citoplasmática forte), sugerindo o uso da técnica como forma de rastreamento de MAP¹¹². Contudo, Van der Post *et al.* (2009)¹¹³ e O'Shea *et al.* (2008)¹¹⁴ não observaram associação entre expressão imuno-histoquímica, características patológicas e a presença de mutações em pacientes com MAP e adenomas colorretais. Segundo Riegert-Johnson *et al.* (2011)¹¹⁵ nenhum fator clínico, histórico familiar ou presença de pólipos, foi capaz de prever a presença de mutações. Em tumores gástrico, a baixa expressão de MUTYH, em comparação com o epitélio normal, foi associada com piores características tumorais e sobrevida¹¹⁶. Até o presente momento, não há descrição na literatura quanto à expressão protéica de MUTYH em meningiomas.

1.2.4. Proteínas do grupo xeroderma pigmentoso do tipo F e G (XPF e XPG)

O reparo do DNA também ocorre pelo mecanismo do tipo excisão de nucleotídeos (NER). Nesta via, agem aproximadamente 30 proteínas que atuam de forma organizada e processam lesões que modificam a estrutura da dupla hélice, como as causadas por radiações ultravioletas e exposição a produtos químicos e agentes alquilantes¹¹⁷.

A ação da NER pode ser dividida em dois processos: reparo global de DNA (GGR) e reparo de DNA acoplado à transcrição (TCR). O GGR é considerado relativamente lento e menos eficaz, pois seu mecanismo percorre toda a extensão do DNA, removendo lesões por inteiro, como os dímeros de pirimidina, que são responsáveis por distorcer a dupla hélice. Em contrapartida, o TCR remove lesões causadas por fotoprodutos, como pirimidinas e pirimidonas, nas fitas transcritas do DNA, bloqueando o processo de transcrição¹¹⁸.

Os processos de reparo da via NER ocorrem em cinco etapas: reconhecimento da lesão, abertura da dupla hélice, incisão e retirada dos nucleotídeos danificados, nova síntese e ligação das fitas¹¹⁸. Estes processos são ilustrados na Figura 11.

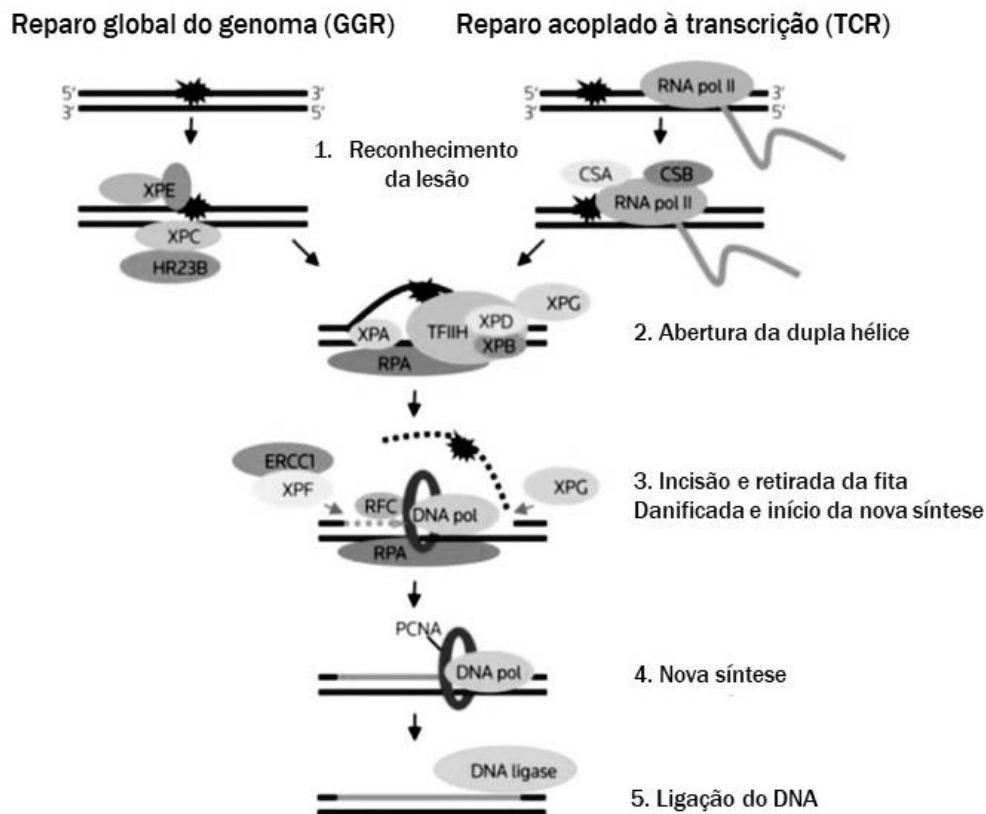


Figura 11. Etapas de ação do mecanismo de reparo NER (Adaptado de Lima-Bessa e colaboradores, 2009)¹¹⁹.

Existem doenças associadas às alterações genéticas hereditárias e à NER, sendo elas xeroderma pigmentoso (XP), síndrome de Cockayne e tricotiodistrofia. O xeroderma pigmentoso é uma doença rara, que afeta a reparação do DNA após mínima exposição à radiação ultravioleta, caracterizando-se por fotossensibilidade e predisposição a câncer de pele em idade jovem. Mutações nas proteínas da via NER resultam em anormalidades no reparo do DNA e no aparecimento de diferentes fenótipos da doença: fotossensibilidade, poiquilodermia (atrofia da pele e hiperpigmentação), lentigos solares (manchas escuras), câncer de pele, neurodegeneração e tumores

cerebrais¹²⁰. Deste modo, o XP tornou-se o modelo principal no estudo de lesões não reparadas e de mutações causadas por agentes genotóxicos¹²¹.

As proteínas XPF e XPG são endonucleases específicas, que atuam no processo de incisão da fita danificada 3' e 5', respectivamente. A Tabela 6 descreve as funções das proteínas XP envolvidas no mecanismo de reparo tipo NER¹²².

Tabela 6. Proteínas XP envolvidas na via de reparo NER

Proteína (Gene)	Função	Componentes de interação
XPA (XPA)	Identificação do dano	RPA, TFIIH, XPF, DDB2, PCNA
XPB (ERCC3)	DNA helicase	XPC, XPA, XPG, XPF
XPC (XPC)	Reconhecimento da lesão	XPA, TFIIH, RAD23B, DDB2
XPB (ERCC3)	DNA helicase	XPC, XPA, XPG, XPF
XPE (UV-DDB1/2)	Reconhecimento de lesão UV	XPC, RPA, XPA
XPF (ERCC1/ERCC4)	Endonuclease	TFIIH, XPA, ERCC1
XPG (ERCC5)	Endonuclease	XPA, TFIIH, PCNA, XPD
XPV (POLH)	Desvio de dano	PCNA

Legendas: XP: proteínas xerodermapigmentoso, RPA: proteína de replicação A, TFIIH: fator de transcrição geral, DDB2: proteína de ligação ao dano no DNA UV2, PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular, RAD23B: proteína de reconhecimento do dano no DNA UV (Adaptado de Koch e colaboradores, 2016).

A reparação do DNA, realizada pela endonuclease XPF, é codificada pelo gene *ERCC4* (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 4*), localizado no cromossomo 16p13.12, formado por 11 éxons. A proteína XPF é formada por 916 aminoácidos, formando um complexo enzimático estável com a proteína ERCC1 (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 1*), atuante na reparação e recombinação das fitas do DNA¹²³.

O complexo ERCC1-XPF realiza a clivagem de estruturas específicas próximas às junções das fitas simples e duplas de DNA na porção 5' da fita simples danificada. Dentro do complexo ERCC1-XPF, a proteína XPF é considerada sítio ativo da endonuclease, está envolvida na ligação ao DNA e possibilita a interação de proteínas adicionais no processo. A estrutura e os domínios do complexo XPF-ERCC1 estão ilustrados na Figura 12. O complexo homodímero XPF-XPF também pode ser formado, mostrando-se mais estável que o complexo heterodímero ERCC1-XPF¹²⁴.

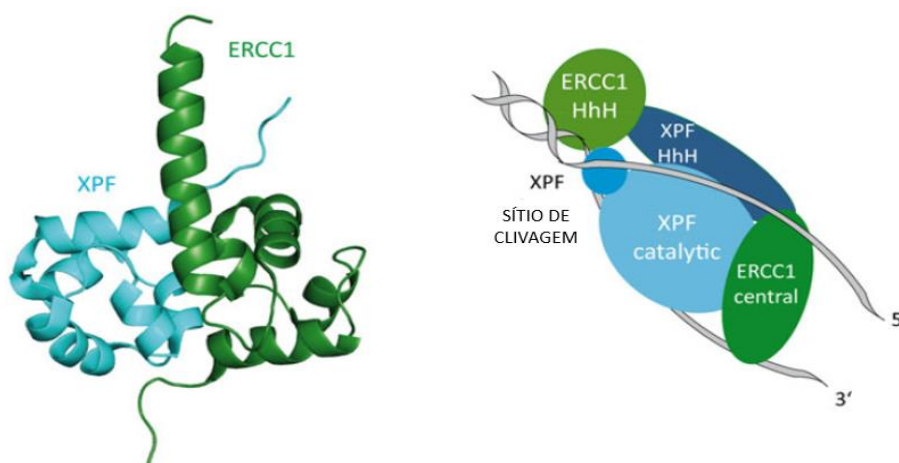


Figura 12. Estrutura do complexo XPF-ERCC1 e ligação com DNA (Adaptado de Koch e colaboradores, 2016)¹²².

A proteína XPG, codificada pelo gene *ERCC5* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*) e pertencente à família das endonucleases FEN (*flap endonucleases*), atua na cadeia simples do DNA. É composta por 1186 aminoácidos e interage com diversas proteínas da via NER. As mutações envolvendo esta proteína estão relacionadas com hipersensibilidade à radiação ultravioleta e à Síndrome de

Cockayne, caracterizada por graves defeitos no crescimento e complicações mentais¹²⁰.

Outras alterações genéticas estão associadas à presença de polimorfismos e aumento do risco de aparecimento de tumores¹²⁵. O polimorfismo Asp1558His está associado ao desenvolvimento de meningiomas e gliomas, com maior risco nos casos de meningiomas¹²⁶.

A estrutura da proteína XPG contém dois domínios (N e I), evolutivamente conservados e separados por uma longa porção de 600 aminoácidos (Figura 13). Esta porção conservada não está envolvida nos processos catalíticos da XPG, porém desempenha papel importante na clivagem, recrutamento e correto posicionamento da proteína em lesões da dupla hélice¹²⁷.



Figura 13. Representação esquemática da proteína XPG (Adaptada de Koch e colaboradores, 2016)¹²².

A XPG age na clivagem do DNA, perto da junção da fita simples com a dupla, sendo necessários mais de cinco pares de bases abertos para que o processo de clivagem seja eficiente. A presença da XPG é essencial para o recrutamento do complexo XPF-ERRC1, porém o mecanismo pelo qual a proteína realiza o reconhecimento do DNA não é conhecido.

As proteínas envolvidas com a reparação de lesões atuam em múltiplos processos e vias de reparo¹²⁸. As proteínas da via NER podem estar associadas às atividades da via BER, as proteínas da via NER funcionam como um *back-up* do processo de reparo, quando proteínas da via BER estão defeituosas^{129,130}. A proteína XPG pode ser uma das proteínas NER envolvidas no reparo das lesões oxidativas, como relatado por Wang *et al.* (2010)¹³¹, que avaliou a atividade desta proteína em pacientes portadores da doença XP, observando que o reparo das lesões estava deficiente nestes pacientes.

Na via NER, a interação com fatores de transcrição é necessária para localizar a XPG nos sítios de lesão, enquanto na via BER, a proteína XPG funciona como um potencial cofator de ligação das glicosilases no DNA danificado¹¹⁷.

A expressão imuno-histoquímica da proteína XPG já foi validada em tecidos normais e vários tipos tumorais, apresentando diferentes padrões de marcação nuclear e citoplasmática¹³². Até o presente momento, não há estudos na literatura sobre a expressão da proteína XPF e XPG em meningiomas.

2. REFERÊNCIAS

1. Czarnetzki A, Schwaderer E, Pusch CM. Fossil record of meningioma. *Lancet Lond Engl.* 2003;362(9381):408.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(4):1-86.
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
4. Hashiba T, Hashimoto N, Maruno M, Izumoto S, Suzuki T, Kagawa N et al. Scoring radiologic characteristics to predict proliferative potential in meningiomas. *Brain Tumor Pathol.* 2006;23(1):49-54.
5. Abbritti RV, Polito F, Cucinotta M, LoGiudice C, Caffo M, Tomasello C et al. Meningiomas and Proteomics: Focus on New Potential Biomarkers and Molecular Pathways. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13(5):369-79.
6. Freitag D, McLean AL, Simon M, Koch A, Grube S, Walter J, et al. NANOG overexpression and its correlation with stem cell and differentiation markers in meningiomas of different WHO grades. *Mol Carcinog.* 2017;56(8):1953-64.

7. Shivapathasundram G, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. Tumourstemcells in meningioma: A review. *J Clin Neurosci*. 2018;47:66-71.
8. Rausing A, Ybo W, Stenflo J. Intracranial meningioma--a population study of ten years. *Acta Neurol Scand*. 1970;46(1):102-10.
9. Nakamura M, Roser F, Michel J, Jacobs C, Samii M. The natural history of incidental meningiomas. *Neurosurgery*. 2003;53(1):62-71.
10. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJPE, Hofman A, Krestin GP et al. Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med*. 2007;357(18):1821-8.
11. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E et al. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):153-71.
12. Claus EB, Black PM, Bondy ML, Calvocoressi L, Schildkraut JM, Wiemels JL, et al. Exogenous hormone use and meningioma risk: what do we tell our patients? *Cancer*. 2007;110(3):471-6.
13. Leães CG, Meurer RT, Coutinho LB, Ferreira NP, Pereira-Lima JF, Oliveira MC. Immunohistochemical expression of aromatase and estrogen, androgen and progesterone receptors in normal and neoplastic human meningeal cells. *Neuropathology*. 2010;30(1):44-9.
14. Laviv, Y, Ohla V, Kasper EM. Unique features of pregnancy-related meningiomas: lessons learned from 148 reported cases and theoretical implications of a prolactin modulated pathogenesis. *Neurosurgical Review*. 2016;41(1):95-108.

15. Benson VS, Pirie K, Green J, Casabonne D, Beral V. Million Women Study Collaborators Life style factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *Br J Cancer*. 2008;99(1):185-90.
16. Roser F, Nakamura M, Bellinzona M, Rosahl SK, Ostertag H, Samii M. The prognostic value of progesterone receptor status in meningiomas. *J Clin Pathol*. 2004a;57(10):1033-7.
17. Vadivelu S, Sharer L, Schulder M. Regression of multiple intracranial meningiomas after cessation of long-term progesterone agonist therapy. *J Neurosurg*. 2010;112(5):920-4.
18. 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;80(1):1-7.
19. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol*. 2010;99(3):307-14.
20. Wigertz A, Lonn S, Hall P, Auvinen A, Christensen HC, Johansen C, et al. Reproductive factors and risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(10):2663-70.
21. Korhonen K, Raitanen J, Isola J, Haapasalo H, Salminen T, Auvinen A. Exogenous sex hormone use and risk of meningioma: a population-based case-control study in Finland. *Cancer Causes Control*. 2010;21(12):2149-56.

22. Custer B, Longstreth WT Jr, Phillips LE, Koepsell TD, Van Belle G. Hormonal exposures and the risk of intracranial meningioma in women: a population based case-control study. *BMC Cancer*. 2006;6:152-5.
23. Cea-Soriano L, Wallander MA, García Rodríguez LA. Epidemiology of meningioma in the United Kingdom. *Neuroepidemiology*. 2012;39(1):27-34.
24. Claus EB, Calvocoressi L, Bondy ML, Wrensch M, Wiemels JL, Schildkraut JM. Exogenous hormone use, reproductive factors, and risk of intracranial meningioma in females. *J Neurosurg*. 2013;118(3):649-56.
25. Haines DE, Harkey HL, al-Mefty O. The "subdural" space: a new look at a out dated concept. *Neurosurgery*. 1993;32(1):111-20.
26. Sobotta J. Encéfalo e medula espinhal. In: Paulsen F, Waschke J. Sobotta Atlas de anatomia humana. 24° edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. v3. p.295-317.
27. Barbosa-Coutinho LM, Hilbig, A. Patologia dos Meningiomas. In: Aguiar PHP, Ramina R; Veiga JCE; Tella Jr O. Meningiomas - Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico - aspectos gerais. 1ª edição. Brasil: Revinter; 2006. p. 11-4.
28. Perry A. Meningiomas In: Perry A, Brat DJ. Practical surgical neuropathology a diagnostic approach. Philadelphia: Churchill Living stone Elsevier, 2017. p. 259-96.
29. Splavski B, Hadzic E, Bagic I, Vrtaric V, Splavski B Jr. Simple Tumor Localization Scale for Estimating Management Outcome of Intracranial Meningioma. *World Neurosurg*. 2017;104:876-82.

30. Moradi A, Semnani V, Djam H, Tajodini A, Zali AR, Ghaemi K et al. Pathodiagnostic parameters for meningioma grading. *J Clin Neurosci.* 2008;15(12):1370-5.
31. Drummond KJ, Zhu JJ, Black PM. Meningiomas: updating basic Science management, and outcome. *Neurologist.* 2004;10(3):113-30.
32. Oya S, Kim S-H, Sade B, Lee JH. The natural history of intracranial meningiomas. *J Neurosurg.* 2011;114(5):1250-6.
33. Karsy M, Guan J, Cohen A, Colman H, Jensen RL. Medical Management of Meningiomas: Current Status, Failed Treatment and Promising Horizons. *Neurosurg Clin N Am.* 2016;27(2):249-60.
34. Pitella JR, S; Hahn, MD; Chimelli, L; Grinberg, LT; Andrade, MPG, Heisen, H; Neder, L. *Sistema Nervoso.* In: Luigi; Brasileiro Filho G. *Patologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 1008-9.
35. Harter PN, Braun Y, Plate KH. Classification of meningiomas-advances and controversies. *Chin Clin Oncol.* 2017;6(1):S2.
36. El-Gewely MR, Andreassen M, Walquist M, Ursvik A, Knutsen E, Nystad M et al. Differentially Expressed MicroRNAs in Meningiomas Grades I and II Suggest Shared Biomarkers with Malignant Tumors. *Cancers (Basel).* 2016;8(3):E31.
37. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin.* 2016;34(4):981-98.
38. Rogers L, Gilbert M, Vogelbaum MA. Intracranial meningiomas of atypical (WHO grade II) histology. *J Neurooncol.* 2010;99(3):393-405.
39. Enam SA, Abdulrauf S, Mehta B, Malik GM, Mahmood A. Metastasis in meningioma. *Acta Neurochir (Wien).* 1996;138(10):1172-8.

40. Akay A, Ruksen M, Cetingoz R, Islekei S. Systemic tumour metastasis to cerebral meningioma: literature review with a case report. *J Neurol Sci.* 2017;34(2):123-35.
41. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. 2006;12(5):1045-54.
42. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1957;20(1):22-39.
43. Takeuchi H, Kubota T, Kabuto M, Kitai R, Nozaki J, Yamashita J. Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg Neurol.* 1997;48(5):501-6.
44. Kim MS, Kim KH, Lee EH, Lee YM, Lee SH, Kim HD et al. Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas. *J Neurosurg.* 2014;121(5):1189-200.
45. Mason WP, Gentili F, McDonald DR, Hariharan S, Cruz CR, Abrey LE. Stabilization of disease progression by hydroxyurea in patients with recurrent or unresectable meningioma. *J Neurosurg.* 2002;97(2):341-6.
46. Nakasu S, Fukami T, Jito J, Nozaki K. Recurrence and regrowth of benign meningiomas. *Brain Tumor Pathol.* 2009;26(2):69-72.
47. Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr.* 1998;56(2):193-9.
48. Shanthi V, Grandhi B, Mohan Rao N, Sundar Rao BS, Reddy VM. Assessing the Prognostic Importance of ER, PR Expression in

- Meningiomas by Comparing with Proliferative Rate Using Ki67. *IJPRP*. 2017;6(2):431-4.
49. Wahab M, Al-Azzawi F. Meningioma and hormonal influences. *Climacteric*. 2003;6(4):285-92.
50. Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M. The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004b;146(1):37-44.
51. Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Mahera H, Kotsiakis X, Hranioti S, Eftychiadis C et al. Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology*. 2003;43(3):280-90.
52. Ausman JI. Meningiomas the future: is 2020 here? *Surg Neurol*. 2003;59(2):140-1.
53. Fathi AR, Roelcke U. Meningioma. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(4):337.
54. Winther TL, Torp SH. MCM7 expression is a promising predictor of recurrence in patients surgically resected for meningiomas. *J Neurooncol*. 2017;131(3):575-83.
55. Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA, et al. Longterm administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Invest* 2006;24(8):727-33.
56. Cossu G, Levivier M, Daniel RT, et al. The role of mifepristone in meningiomas management: a systematic review of the literature. *Biomed Res Int*. 2015;2015:267831.

57. Walter LM, Rogers PA, Girling JE. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction*. 2005;129(6):765-77.
58. Oblinger JL, Burns SS, Huang J, Pan L, Ren Y, Shen R et al. Overexpression of eIF4F components in meningiomas and suppression of meningioma cell growth by inhibiting translation initiation. *Exp Neurol*. 2018;299(Pt B):299-307.
59. Todt D, et al. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2018;157:151-8.
60. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*. 2015;372(9):793-5.
61. Wilson JL, Altman RB. Biomarkers: Delivering on expectation of molecularly driven, quantitative health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):313-22.
62. Chambliss AB, Chan DW. Precision medicine: from pharmacogenomics to pharmacoproteomics. *Clin Proteomics*. 2016;13:25-33.
63. Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol*. 2001;27(6):321-8.
64. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6.
65. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AA. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):305-16.

66. Akyildiz EU, Oz B, Comunoglu N, Aki H. The relationship between histomorphological characteristics and Ki-67 proliferation index in meningiomas. *Bratisl Lekárske Listy*. 2010;111(9):505-9.
67. Amur S, LaVange L, Zineh I, Buckman GS, Woodcock J. Biomarker qualification: toward a multiple stakeholder framework for biomarker development, regulatory acceptance, and utilization. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(1):34-46.
68. Zucarri D, Berton CR, Terzian ACB, Ruiz CM. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias - importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina - estudo comparativo. *Arq Ciênc Saúde* 2008;15(4):189-98.
69. Proctor DT, Ramachandran S, Lama S, Sutherland GR. Towards Molecular Classification of Meningioma: Evolving Treatment and Diagnostic Paradigms. *World Neurosurg*. 2018;119:366-73.
70. Tirapelli DP, Menezes SB, Franco IM, Lustosa IL, Rodrigues AR, Novais PC et al. High expression of anti-apoptotic genes in grade I and II meningiomas. *Arq Neuro Psiquiatr*. 2017;75(4):209-15.
71. Cheng G, Zhang L, Lv W, Dong C, Wang Y, Zhang J. Overexpression of cyclin D1 in meningioma is associated with malignancy grade and causes abnormalities in apoptosis, invasion and cell cycle progression. *Med Oncol*. 2015;32(1):439-47.
72. Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol*. 2008;89(1):73-87.

73. Kim CH, Cheong JH, Bak KH, Kim JM, Oh SJ. Expression of the proliferating cell nuclear antigen and clinicopathological features in intracranial meningiomas. *J Clin Neurosci*. 2001;8(1):44-8.
74. Abedalthagafi M, Bi WL, Aizer AA, Merrill PH, Brewster R, Agarwalla PK et al. Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro Oncol*. 2016;18(5):649-55.
75. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K et al. Genomic analysis of NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science*. 2013;339(6123):1077-80.
76. Reuss DE, Piro RM, Jones DT. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol*. 2013;125(3):351-8.
77. Sulman EP, White PS, Brodeur GM. Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene*. 2004; 23(4):1014-20.
78. Bethke L, Murray A, Webb E, Schoemaker M, Muir K, McKinney P et al. Comprehensive analysis of DNA repair gene variants and risk of meningioma. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):270-6.
79. Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S, Black PM, Fine HA, Loeffler JS et al. DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro Oncol*. 2010;12(1):37-48.
80. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(5):187-90.
81. Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J*. 1999;13(8):773-80.

82. Gijtenbeek JM, Boots-Sprenger SH, Franke B, Wesseling P, Jeuken JW. Cyclin D1 genotype and expression in sporadic hemangioblastomas. *J Neurooncol.* 2005;74(3):261-6.
83. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(12):1313-26.
84. Hanken H, Gröbe A, Cachovan G, Smeets R, Simon R, Sauter G et al. CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Oral Investig.* 2014;18(1):269-76.
85. Ramakrishna A, Shreedhar B, Narayan T, Mohanty L, Shenoy S, Jamadar S. Cyclin D1 na early biomarker in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013;17(3):351-7.
86. Ramos-García P, Gil-Montoya JA, Scully C, Ayén A, González-Ruiz L, Navarro-Triviño FJ et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis.* 2017;23(7):897-912.
87. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
88. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 2000;14(24):3102-14.
89. Hibberts NA, Simpson DJ, Bicknell JE, Broome JC, Hoban PR, Clayton RN et al. Analysis of cyclin D1 (CCND1) allelic imbalance and overexpression in sporadic human pituitary tumors. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2133-9.

90. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*. 2006;25(11):1620-8.
91. McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, Parr AH, Thomas MD et al. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene*. 1995;11(5):885-91.
92. Drobnjak M, Osman I, Scher HI, Fazzari M, Cordon-Cardo C. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1891-5.
93. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013;183(1):3-9.
94. Casimiro MC, Di Sante G, Crosariol M, Loro E, Dampier W, Ertel A et al. Kinase-independent role of cyclin D1 in chromosomal instability and mammary tumorigenesis. *Oncotarget*. 2015;6(11):8525-38.
95. Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res*. 2003;63(21):7056-61.
96. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*. 2003;278(32):30339-47.
97. Küppers R, Dührsen U, Hansmann ML. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):e435-46.
98. Alama A, Barbieri F, Spaziante R, Bruzzo C, Dadati P, Dorcaratto A et al. Significance of cyclin D1 expression in meningiomas: a preliminary study. *J Clin Neurosci*. 2007;14(4):355-8.

99. Milenković S, Marinkovic T, Jovanovic MB, Djuricic S, Berisavac II, Berisavac I. Cyclin D1 immunoreactivity in meningiomas. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(6):907-13.
100. Friedberg EC. A history of the DNA repair and mutagenesis field: I. The Discovery of enzymatic photoreactivation. *DNA Repair (Amst).* 2015;33:35-42.
101. Zharkov DO, Grollman AP. The DNA trackwalkers: principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases. *Mutation Research.* 2005;577(1-2):24-54.
102. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169-85.
103. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583.
104. Van Loon B, Markkanen E, Hübscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst).* 2010;9(6):604-16.
105. Neeley WL, Essigmann JM. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(4):491-505.
106. Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or thymine pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12543-57.
107. Michaels ML, Pham L, Nghiem Y, Cruz C, Miller JH. MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(13):3841-5.

108. Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabata S, Maki H et al. Cloning and expression. of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1993;268(31):23524-30.
109. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* 2007;447(7147):941-50.
110. Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest.* 1997;77(6):601-6.
111. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A et al. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res.* 1995;55(20):4696-701.
112. Di Gregorio C, Frattini M, Maffei S, Ponti G, Losi L, Pedroni M et al. Immunohistochemical expression of MYH protein can be used to identify patients with MYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2006;131(2):439-44.
113. Van der Post RS, Kets CM, Ligtenberg MJ, van Krieken JH, Hoogerbrugge N. Immunohistochemistry is not an accurate first step towards the molecular diagnosis of MUTYH-associated polyposis. *Virchows Arch.* 2009;454(1):25-9.
114. O'Shea AM, Cleary SP, Croitoru MA, Kim H, Berk T, Monga N, Riddell RH et al. Pathological features of colorectal carcinomas in MYH-associated polyposis. *Histopathology.* 2008; 53(2):184-94.

115. Riegert-Johnson DL1, Johnson RA, Rabe KG, Wang L, Thomas B, Baudhuin LM et al. The value of MUTYH testing in patients with early onset microsatellite stable colorectal cancer referred for hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome testing. *Genet Test.* 2007 Winter;11(4):361-5.
116. Shinmura K, Goto M, Suzuki M, Tao H, Yamada H, Igarashi H et al. Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer. *J Pathol.* 2011;225(3):414-23.
117. Melis JP, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(18):2409-19.
118. Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(12):958-70.
119. Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chiganças V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(2):303-12.
120. Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.* 2016;10(2):139-44.
121. Saldivar JS, Lu KH, Liang D, Gu J, Huang M, Vlastos AT et al. Moving to Ward individualized therapy based on NER polymorphisms that predict platinum sensitivity in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2007;107(1):223-9.

122. Koch SC, Simon N, Ebert C, Carell T. Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum (XP) proteins. *Q Rev Biophys.* 2016;49:e5.
123. Shi TY, He J, Qiu LX, Zhu ML, Wang MY, Zhou XY et al. Association between XPF polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *PLoSOne.* 2012;7(7):e38606.
124. Das D, Folkers GE, van Dijk M, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Kaptein R et al. The structure of the XPF-ssDNA complex underscores the distinct roles of the XPF and ERCC1 helix-hairpin-helix domains in ss/ds DNA recognition. *Structure.* 2012;20(4):667-75.
125. Zhao J, Chen S, Zhou H, Zhang T, Liu Y, He J, Zhu J, Ruan J. XPG rs17655 G>C polymorphism associated with cancer risk: evidence from 60 studies. *Aging (Albany NY).* 2018;10(5):1073-88.
126. Luo KQ, Mu SQ, Wu ZX, Shi YN, Peng JC. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of glioma and meningioma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(1):449-52.
127. Hohl M, Dunand-Sauthier I, Staresinic L, Jaquier-Gubler P, Thorel F, Modesti M et al. Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(9):3053-63.
128. Staresinic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* 2009;28(8):1111-20.

129. Shafirovich V, Kropachev K, Anderson T, Liu Z, Kolbanovskiy M, Martin BD et al. Base and nucleotide repair of oxidatively generated guanine lesions in DNA. *J Biol Chem*. 2016;291(10):5309-19.
130. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesio. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:110-24.
131. Wang HT, Choi B, Tang MS. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photo products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(27):12180-5.
132. Aracil M, Dauffenbach LM, Diez MM, Richeh R, Mono V, Leal JF, et al. Expression of XPG protein in human normal and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):199-211.
133. Meredith DM. Advances in diagnostic immunohistochemistry for primary tumors of the central nervous system. *Adv Anat Pathol*. 2019. Epub.
134. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol*. 2014;51(1):42-87.
135. Petersen K, Pedersen HC. Detection methods. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods*. 6 ed. Dinamarca: Agilent Technologies Company; 2013. p. 68-94.

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a presença das proteínas de reparo de DNA (ciclina D1, MUTYH, XPF e XPG) em amostras de pacientes com meningioma e relacionar com aspectos clínicos e desenvolvimento de recorrência ou recrescimento.

ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer o padrão de marcação das proteínas ciclina D1, MUTYH, XPF e XPG pela técnica imuno-histoquímica em meningiomas de diferentes graus (I, II e III).
- b) Avaliar a expressão das proteínas ciclina D1, MUTYH, XPF e XPG e associá-las com características clínicas e tumorais: idade, sexo, grau tumoral, localização, tamanho e seguimento clínico.
- c) Relacionar o tipo de ressecção cirúrgica realizada nos meningiomas com recorrência ou recrescimento tumoral.
- d) Determinar o tempo de sobrevida livre de recorrência ou recrescimento tumoral em pacientes com meningioma e associar com a expressão das proteínas estudadas.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

*“DNA REPAIR AND CELL SYNTHESIS PROTEINS:
IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION AND CORRELATION WITH
RECURRENCE-REGROWTH IN MENINGIOMAS”*

Camila Batista de Oliveira Silva

Bárbara Roberta Ongaratti

Geraldine Trott

Bruna Araújo

Carolina Soares Leães Rech

Lígia Barbosa Coutinho

Nelson Pires Ferreira

Miriam da Costa Oliveira

Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima

Enviado para publicação na Revista “Journal of Molecular Histology”

**DNA REPAIR AND CELL SYNTHESIS PROTEINS:
IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION AND CORRELATION WITH
RECURRENCE-REGROWTH IN MENINGIOMAS**

Camila Batista de Oliveira Silva^{1,2}, MsC, Bárbara Roberta Ongaratti^{1,2}, MsC, Geraldine Trott ^{1,2}, PhD, Bruna Araújo¹, MD, Carolina Soares Leães Rech¹, PhD, Lígia Barbosa Coutinho^{1,2}, PhD, Nelson Pires Ferreira, PhD, Miriam da Costa Oliveira^{1,2}, PhD, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima^{1,2}, PhD.

¹ Neuroendocrinology Center, Santa Casa of Porto Alegre, Brazil,

² Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author:

Camila Batista de Oliveira Silva

Department of Pathology

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Sarmiento Leite, 245

CEP 90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-98313-2778

Fax: + 55-51-33038703

milaabatistar@gmail.com

Authors contributions:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Silva CBO, Ongaratti B, Trott Geraldine, Araújo B. The first draft of the manuscript was written by Pereira-Lima JFS and Oliveira MC and all authors commented on previous versions of the manuscript. Ferreira NP and Rech CSL also contributed in analysis of medical records and Barbosa Coutinho L was the pathologist responsible for the histopathological diagnosis of the cases. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Meningiomas are considered the second most common neoplasm of the central nervous system in adults. Most of them are benign with slow growth, frequent in women and with a high recurrence rate. In tumors, DNA error repair processes lose efficacy, providing mutagenesis and genomic instability. This work evaluated the expression of proteins involved in cell synthesis (cyclin D1) and repair of DNA errors (MUTYH, XPF, XPG) in meningiomas, relating them to clinical, tumor and survival variables. The study included 85 patients, with a mean age of 52 ± 13.3 years and most of them women (2:1 ratio). Sixty-seven cases were grade I (79%). Grade II tumors were independent predictors of recurrence-regrowth (HR: 2.8; $p=0.038$). The high expression of cyclin D1 was associated with grade II ($p=0.001$) and low MUTYH expression with grade I ($p=0.04$). Strong expression of XPF and XPG was associated with grade II ($p=0.002$; $p<0.001$) and with recurrence-regrowth ($p=0.04$; $p=0.003$). Strong XPF expression was significantly related to large tumors ($p=0.03$). An association of cyclin D1, MUTYH and XPF were found. Survival was not associated with the expression of any of the proteins studied. To know the role of DNA repair proteins and cell synthesis is important for understanding the processes of origin and tumor development. Grade II meningiomas and strong expression of XPF and XPG were predictors of recurrence or regrowth and may assist in clinical management, considering the high recurrence of meningiomas and the absence of consensus regarding treatment.

KEYWORDS: meningiomas, recurrence, cyclin D1, MUTYH, xeroderma proteins

INTRODUCTION

Meningiomas are the second most common neoplasm of the central nervous system in adults. Most of them are benign and with slow and asymptomatic evolution; still, the recurrence rate is high, some cases show aggressive behavior and unfavorable prognosis (Abbritti et al. 2016). According to epidemiological data, meningiomas represent 37% of intracranial primary tumors with an incidence of 8.3 cases per 100,000 inhabitants, increasing these values after 65 years (Harter et al 2017; Ostrom et al. 2018).

Despite the evolutions affected in neurosurgery and radiotherapy, the prevalence of recurrence-regrowth remains high. The treatment of recurrent cases remains under discussion, with research being necessary to identify possible biomarkers and therapeutic targets (Norden et al. 2015).

Alterations in DNA can cause modifications in cell replication and transcription processes, leading to genetic instability and carcinogenesis. The removal of lesions, caused by radiation or endogenous processes, is performed by repair mechanisms formed by specific proteins to maintain the correct functioning and ensure the transmission of genetic information (Friedberg 2015). Understanding the behavior of cell repair proteins may represent a new path in the development of biomarkers predictors of carcinogenesis and tumor recurrence, especially in meningiomas (Proctor et al. 2018).

Cyclin D1 acts in the DNA synthesis, is closely related to the cell cycle control and its overexpression is related to genomic instability and malignant transformation (Kanter et al. 2016; Ramos Garcia et al. 2019). The proteins MUTYH, XPF, and XPG are involved in the DNA repair mechanism. MUTYH is involved in the base excision repair (BER) pathway and XPF and XPG with nucleotides excision repair (NER) pathway (Koch et al. 2016; Banda et al. 2017).

Currently, it seeks to clarify the genetic mechanisms involved in the development of meningiomas, thus, this study aims to study the role of proteins involved in cell synthesis and DNA repair (cyclin D1, MUTYH, XPF, and XPG) relating to clinicopathological variables, providing useful information for the prognosis and management of patients, besides assisting in the development of new therapies.

METHODS

This cross-sectional study involved 85 patients above 18 years, undergoing transcranial resection by a single surgeon (NPF) in a reference hospital in southern Brazil diagnosed with a meningioma. The samples were included for convenience from 2016 to 2019. All patients signed the informed consent and the study was approved by the Institutional Ethics Committee (Report n° 1.446.130 and 1.509.852) and conducted following the Helsinki Declaration.

The slides, with tissue from surgery, were stained with hematoxylin and eosin (HE) to confirm the presence of the tumor. All cases were analyzed by an experienced neuropathologist (LBC) and classified according to the histological pattern in grade and subtypes. For the classification of atypical cases, the presence of mitoses (4 or more), prominent nucleoli, and altered nucleus/cytoplasm ratio were considered. After confirming the presence of tumor, grade, and subtypes, the immunohistochemical technique was performed using commercial antibodies.

The medical records were reviewed to obtain clinical parameters (age, gender, tumor size, location, the extension of resection, recurrence-regrowth). Meningiomas were classified as tumor grade in benign (grade I), atypical (grade II) and anaplastic (grade III) and histological subtype, according to the World Health Organization (WHO) (Louis et al. 2006).

The tumor size was defined as the largest dimension to preoperative imaging (magnetic resonance imaging or computed tomography). Tumors with a size greater than 3 cm were considered large cases (Oya et al. 2011; Karsy et al. 2016). As for location, the tumors were divided regarding the central or peripheral position within the cranial cavity to facilitate the approach management in clinical evaluation, as propose by Splavisk (Splavisk et al 2017). Falcine, parasagittal, olfactory groove, tuberculum sellae (suprasellar), cavernous sinus (parasellar), sphenoid ridge (clinoidal), petroclival, foramen magnum, intraventricular were considered central location. Convexity, orbital roof, cerebellopontine angle, posterior fossa, temporobasal, sphenoid ridge

(pteryonal and alar) were considered peripheral location (Splavskiet al. 2017). The tumors were also classified according to the position in the skull-base and non-skull base (Zada et al. 2017).

The surgical extension was determined by Simpson's classification, based on the surgical description and postoperative imaging analysis. Considering complete resection: Simpson grade I-II, absence of tumor residue visible in surgical description and absence of lesion in image performed three months after surgery and, partial resection: Simpson grade III-V, presence of tumor residue visible in the surgical description and/or presence of a lesion in image performed three months after surgery (Simpson 1957; Splavski et al. 2017).

Recurrence was defined as the appearance of a new tumor after complete surgical resection and regrowth as an increase in tumor residue after partial resection. Follow-up included patients with at least six months of medical monitoring after surgery. The clinical outcome evaluated was recurrence-regrowth-free survival, defined as the time between the date of surgery and the date of recurrence-regrowth, or the last record during follow-up, considered the most appropriate method for the evaluation of tumor growth (Rose et al. 2015; Azar et al. 2017).

IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUES

The samples were fixed in formalin 10% and included in paraffin. The paraffin blocks were sectioned at 4 μm . The streptavidin-biotin (Vector Laboratories

kit®, USA) method was used to detect all biomarkers. Antigenic recovery was performed with citrate (pH=6) for cyclin D1 and Tris-EDTA (pH=9) for MUTYH, XPF, and XPG, both at 92°C for 40 minutes. Endogenous peroxidase was inactivated using H₂O₂ (30V) dissolved in methanol (5%) for ten minutes (three times). Non-specific proteins were blocked using BSA (bovine serum albumin) 1% for an hour at room temperature. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C, and diluted as previously tested: 1:100 (monoclonal, cyclin D1), 1:50 (monoclonal, MUTYH), 1:200 (polyclonal, XPF and XPG). All antibodies were manufactured by Abcam® (Cambridge, UK). Esophagus, lung cancer, tonsillin and ovarian carcinoma were used as positive controls for cyclin D1, MUTYH, XPF, and XPG proteins, respectively, as described by the manufacturer.

As a negative control, primary antibodies were replaced by a saline solution. The slides were washed with PBS solution (phosphate-buffered saline) and incubated with secondary and tertiary antibodies for 40 minutes each at room temperature. The reaction was revealed with DAB (3,3-diaminobenzidine) and counter-stained with Harris hematoxylin. The blades were finished and assembled with Entellan® (Darmstadt, Germany)

Nuclear cell staining was considered positive in all markers evaluated.

All cell counts were performed by two independent observers, who were blinded concerning the characteristics of the patients, with the final result being the mean result among them.

As for cyclin D1, four hot spots were randomly chosen under an optical microscope, an increase of 100X. The cell count for cyclin D1 was performed in an increase of 400X with the aid of the Software Image J®. Areas with necrosis, fibrosis, and artifacts were excluded. The mean percentage was recorded in percentage and the high expression was defined as more than 50% of positive nuclei (Cheng et al., 2015).

For the counting of the other markers, complete scans were performed on each slide by both observers.

MUTYH protein expression was classified according to the percentage of nuclei marked at: 0=unmarked, 1=<10%, 2=10-30%, 3=31-50% and 4=>50% (Gao et al., 2004), being considered a high expression >50% of positive nuclei.

The marking for XPF and XPG proteins was classified as a percentage of positive nuclei in: 0=unmarked, 1=<10%, 2=10-50%, 3=50-80% and 4=>80%, regarding the intensity of the marking: 0=unmarked, 1=weak marking, 2=moderate marking and 3=strong marking. The final result was obtained from the product between the two counts, being 12 the maximum value (Hatch et al., 2014).

STATISTICAL ANALYSIS

The concordance analyses among observers were determined using the intraclass or Kappa correlation coefficient, with the definition of absolute agreement. The quantitative variables were described as mean and standard or

median deviation and interquartile interval (p25-p75), according to their distribution, according to the Kolmogorov-Smirnov normality test; qualitative variables through frequency and percentage. The correlations between the quantitative variables were verified by Spearman's correlation test and among the qualitative variables, the Chi-square or Fisher Exact Test tests were used. Comparisons between quantitative and qualitative variables were evaluated by the Mann-Whitney Student or U t-test, according to the distribution. The estimate of recurrence-regrowth-free survival time (RFS) and survival charts were generated through Kaplan-Meier curves. The associations between the clinical and pathological characteristics with recurrence-regrowth-free time were evaluated through Cox regression analysis, uni and multivariate with the respective Hazard Ratios (HR), with a confidence interval of 95%. In the multivariate analysis, the variables with $p < 0.20$ observed in the univariate were included. The level of significance adopted was $p < 0.05$. The analyses were performed with SPSS version 25.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Of the 85 cases undergoing surgery with a confirmed diagnosis of meningioma, 67 (78.8%) were grade I, 17 (20%) grade II, and 1 (1.2%) grade III. The mean age was 52 ± 13.3 years, ranging from 18 to 82 years, with higher frequency in women (67.9%), in the 2:1 ratio.

The most frequent subtypes were meningothelial (37.6%), transitional (24.7%), and atypical (20%). The most common location was peripheral (63%) and non-skull base (54.7%). Fifth-five (67.7%) tumors were considered large, with a mean of 3.4 ± 3 cm. There was a statistical relationship between tumor grade and size, with grade II being bigger ($p=0.02$).

Regarding surgical extension, 47 (56%) were submitted to complete surgical resection, 38 (80.8%) remained without lesion, and 9 (19.4%) presented tumor recurrence. Thirty-seven patients underwent partial surgical resection (44.7%), 25 (67.5%) remained with stable lesion and in 12 (32.4%) there was tumor regrowth. In total, 21 (24.7%) recurrence-regrowth cases, all occurring in the primary site. Of these, three patients with grade I meningiomas underwent one reintervention and one grade II case two reinterventions and radiotherapy. Thirteen patients died, of these 7 (58.3%) patients with meningiomas grade I with no information on the cause of death. Five (41.6%) patients with grade II died ($p=0.034$), of these 2 cases due to post-surgical complications, 1 due cardiac disease and 2 during the follow-up time with no information on the cause of death. The patient with meningioma grade III died after three months due to postoperative complications.

Clinical, tumor characteristics, and the result of univariate analysis are described in Table 1. The patient with meningioma grade III was not included in statistical analysis.

The median follow-up was 24 months (range: 6 to 95 months). The mean RFS was 67 months (95% CI: 57.8-76.6). According to the Kaplan-Meier curve, the RFS rates were 94.4% in 1 year, 76.6% in 2 years, and 64.7% in 3 years and 49.4% in 5 years (Figure 1).

Female gender, age >50 years, central location, size >3 cm, and partial resection represented an increased risk of recurrence-regrowth but were not significant. Tumor grade was significantly associated with increased risk in 2.54 ($p < 0.05$) and shorter survival time. In the multivariate analysis, tumor grade (HR: 2.8; 95% IC: 1.06-7.63; $p = 0.038$) remained as predictor independent of recurrence-regrowth. The Kaplan-Meier curve demonstrated that the mean survival time in grade II patients was shorter than in grade I (48 versus 71 months, log-rank test $p = 0.04$) (Figure 2).

Survival and recurrence rates, according to tumor grade, are described in Table 2.

Grade II meningiomas showed a statistically significant relationship with a complete surgical extension ($p = 0.044$) and large tumors (> 3 cm) ($p = 0.02$) when compared with grade I cases.

Regarding immunohistochemistry, there was an agreement between the readings of the two observers for all markers, with the Kappa coefficient of agreement of 0.94 for cyclin D1 and 0.80 for MUTYH and Intraclass correlation coefficients of 0.97 for XPF and 0.98 for XPG.

Cyclin D1 was positive in 71 cases (84.5%), with a median of 57.8%, ranging from 9.3 to 93.6%. Forty-six cases (54.8%) showed high expression (>50% of positive nuclei). There was a significant association between cyclin D1 with high expression and grade II, and no statistically significant association was found with other clinical, tumor, and survival variables.

Concerning MUTYH, positivity was found in 53 cases (63%). Fourteen cases (26.4%) marked <10%, 28 (52.8%) 10-50% and 11 (20.7%) >50%. We observed a significant association between MUTYH with expression <50% and grade I meningiomas ($p=0.04$). No statistically significant association was found between MUTYH and other clinical variables or survival time.

XPF protein was positive in 75 cases (89.2%). Thirty-four cases (45.3%) with strong expression, 21 (28.0%) moderate and 20 (26.6%) weak. A statistically significant relationship was found between XPF with strong expression in grade II meningiomas ($p=0.003$), size >3 cm ($p=0.04$), and recurrence-regrowth ($p=0.04$). No statistically significant association was found between XPF and other clinical variables or survival time.

XPG protein was positive in 81 cases (96.4%). Twenty-one cases (25.9%) with strong expression, 26 (32%) moderate and 34 (41.9%) weak. A statistically significant relationship was found between XPG with strong expression in grade II meningiomas ($p=0.002$) and recurrence-regrowth ($p=0.003$). No statistically significant association was found between XPG and other clinical variables or survival time.

Figure 3 illustrates the nuclear expression of the proteins studied.

There was a statistically significant association between the nuclear intensity of cyclin D1 (<50%) and MUTYH (<10%) ($p<0.001$), cyclin D1 (>50%) and XPF with strong expression ($p=0.04$), MUTYH (>50%) and XPF with strong expression ($p=0.02$). There was no association between XPG nuclear intensity and other proteins.

DISCUSSION

This study evaluated the expression of proteins involved in DNA repair and cell synthesis in meningiomas using the immunohistochemical technique. From our knowledge, this is the first study that evaluates the expression of these repair proteins (MUTYH, XPF, and XPG) in meningiomas through this methodology.

The present study analyzed a series of 85 meningiomas with age, gender, and histology according to the literature (Wiemels et al. 2010; Perry et al. 2018; Zouaoui et al. 2018). The association between meningiomas and the female gender is based on hormonal influence on carcinogenesis, due to the presence of tumor receptors, especially those of progesterone (Custer et al. 2006). Studies relate age >50 years, central location, size >3.5 cm with shorter survival time in grade II meningiomas (Eksi et al. 2019; Garzon-Muvdi et al. 2017).

Most of the meningiomas evaluated in this study, in agreement with the study of Splavisk (2017), were located in the peripheral region. Tumors located in brain

convexities present favorable outcomes due to non-proximity to important structures (Zada et al., 2017; Almeida et al., 2017).

Surgical extension, according to Simpson's grade, is a relevant factor for the clinical evolution of patients. Complete removal of the tumor should be performed, whenever possible, due to high recurrence-regrowth rates and unpredictable outcomes associated with aggressiveness, especially in grade II, as observed in our cohort (Moon et al 2012; Garzon-Muvdi et al. 2017; Gallagher et al. 2016).

Our study was composed more frequently by large meningiomas, which can cause compression of adjacent structures, increased intracranial pressure, and symptoms (Karsy et al. 2016). The number of large cases observed in this study could be explained by the selection bias, as we are a reference hospital in neurosurgery. We found a significant association between size >3 cm and grade II tumors, according to Magill (2018), suggesting that large tumors present unfavorable biological behavior (Magill et al. 2018).

The mean recurrence-regrowth of this study was 23.5%, according to Karimi (2017) and Bumrungrachpukdee (2014), with an average of approximately 22%, higher than that of Voß (13%) and Nowak (10%) (Karimi et al. 2017; Bumrungrachpukdee et al. 2014; Voß et al. 2017; Nowak et al. 2015). Our median follow-up after surgery was 24 months (range 6 to 95 months). In the literature, the mean follow-up time was 20 to 110 months (range 2 to 221) (Kalani et al. 2015; Di Franco et al. 2017; Romani et al. 2018). Although our

follow-up time is similar to the other studies, it remains short, being a possible limiting factor in survival analysis.

According to the Kaplan-Meier curve, the mean RFS was 67 months, similar to the studies of Tao (2018) and Nowak (2015). As for recurrence-regrowth, we found rates of 94.4% (1 year), 64.7% (3 years) and 49.4% (5 years), according to the study of Tao (2018), 87.5% (1 year), 59.8% (3 years) and 41.8% (5 years), but lower than those found by Nowak (2015), 97.3% (3 years), 93.9% (5 years), years) and 85.2% (10 years) (Nowak et al. 2015; Tao et al. 2018). Atypical and anaplastic meningiomas are commonly related to recurrence and aggressive pattern, within shorter RFS and higher rates of recurrence (45% in atypical and 85% anaplastic) when compared to benign cases (Mc Neil et al. 2016).

Studies that evaluated apoptotic markers in meningiomas demonstrated a relationship with tumor recurrence and aggressiveness (Uzüm et al. 2008). In addition to the classification criteria based on histological and immunohistochemical changes, genetic factors such as methylations and mutations in promoter genes, such as telomerase reverse transcriptase (TERT), can be relevant prognostic tools for assessing tumor aggressiveness. In meningiomas, mutations in the TERT gene were observed in the minority of cases, most frequently in grades II and III (Koelsche et al. 2016), however, a recent meta-analysis described the presence of changes in the TERT gene in all grades, suggesting potential aggressiveness, regardless of the tumor grade (Mirian et al. 2020). In addition to the relationship observed with the tumor

grade, Bertero (2019) demonstrated a significant association between a mutation in TERT and mortality in meningiomas and with tumor recurrence, confirming a relationship with unfavorable outcomes (Sahm et al. 2016; Bertero et al. 2019).

Alterations in the cell cycle may compromise the efficacy of repair mechanisms, increasing the occurrence of mitoses and, consequently, predisposition to mutations. One of the most important regulatory proteins in the cell cycle is cyclin D1, described as an oncogene capable of stimulating cell growth by activating transcription genes, inhibiting apoptosis and radiation resistance (Ravikumar et al. 2014).

In the present study, cyclin D1 expression was observed in 84.7% of cases, most with high nuclear expression. Variations in gene expression of cyclin D1 are related to overexpression of protein and associated with unfavorable prognostic prognosis in several tumors, including meningiomas (He et al 2017). The present study found no statistical relationship with tumor recurrence-regrowth, according to Cheng (2015), however, was observed a significant association with grade II, following previous studies (Milenković et al 2008; Kim et al 2014; Cheng et al. 2015). El-Gewery and colleagues demonstrated high expression of cyclin D1 in meningiomas compared to normal arachnoid tissue, suggesting an interaction of this protein in tumor behavior and progression (El-Gewery et al 2016). We found no association with survival, which differs from reported in other tumors (He et al. 2017; Krawczyk et al. 2019).

In meningiomas, the presence of polymorphisms and mutations in repair genes is associated with tumor onset and progression (Jiricny 2000; Rajamarann et al 2010; Luo et al 2013), one of the polymorphisms described occurs in the MutY (MUTYH protein encoder) on chromosome 1 (1p32.1), acting on the base excision repair (BER) (Friedberg, 2015). Allelic losses in chromosome 1 are frequent genetic abnormalities, especially in grade II and III meningiomas, increasing the risk of progression and recurrence (Sulmann et al. 2004).

The nuclear expression of MUTYH protein was observed in 63% of cases, being the majority with expression. <50%, with a significant association of low nuclear marking with grade I, suggesting possible reduced activation of the BER pathway. The high expression of protein and the presence of polymorphisms described in previous studies are associated with the worst outcome in tumors (Chen et al., 2017; Su et al., 2015). Possibly, grade I meningiomas have a lower risk of tumor progression related to polymorphisms in this gene, considering the low protein expression of MUTYH, the absence of association with higher grade, recurrence-regrowth, and survival.

The proteins of the xeroderma group XPF and XPG are endonucleases acting in the repair route by excision of nucleotides (NER), responsible for cleavage of damaged DNA tape, generating specific substrates for the continuity of the repair process (Staresincic et al 2009; Jimeno et al. 2017). Mutations in these genes result in defective protein and consequent abnormalities in DNA repair and different phenotypes (Black 2016). Like the MutY gene, the ERRC4 and ERRC5 genes, which encode XPF and XPG proteins, were associated with

polymorphisms and increased risk of development of meningiomas (Luo et al. 2013).

We found nuclear positivity of XPF in 89%, being the majority with strong expression and, statistically significant association with grade II and tumors >3 cm. Regarding XPG, we found nuclear positivity in 96%, most of which were moderate to strong, with a statistically significant relationship between grade II and strong expression. Both proteins presented a significant association with tumor recurrence-regrowth, similar to reported in melanomas, gastric tumors, and pulmonary carcinomas, resulting in worse clinical outcomes (Koyama et al. 2010; Hatch et al 2014; Deng et al. 2014). In a recent meta-analysis by Wu (2019), evaluating several tumors such as neuroblastoma, breast, and prostate demonstrates that the altered expression (upregulation) of the XPF tumor suppressor gene is related to carcinogenesis, suggesting that gene modifies the action of proteins and their repairability.

We did not observe an association with lower RFS, similar to the study with molecular and immunohistochemical analysis of Deloia (2012) in ovarian carcinoma. Study by Jimenno (2017), in human cell culture, demonstrated that the high expression of XPG causes genomic instability due to the accumulation of errors and substrates toxic to DNA, suggesting that XPG protein can be used as a tool in the detection of carcinogenic processes.

We describe predominant nuclear marking, in agreement with an immunohistochemical study by Aracil that investigated the expression of XPG in

normal and tumor tissues, describing the absence of expression in normal cerebellar, pituitary, and fibroblastic samples (Aracil et al 2013).

The association between cyclin D1, MUTHY, and XPF found in our study corroborates the hypothesis that genetic susceptibility to cancer may be related to changes in BER and NER pathway repair, since the high expression of repair proteins and cell synthesis are related to DNA instability (Huang et al 2017). In addition, studies reveal that BER and NER pathway proteins, although autonomous and specific, can act simultaneously as backup mechanisms, ensuring error repair and correct transmission of genetic information.

In this study, including a representative series of meningiomas, we found high protein expression of cyclin D1 in grade II meningiomas, as well as high MUTHY expression in grade I meningiomas, with no relation to recurrence-regrowth or other variables. Concerning XPF and XPG proteins we found strong expression in grade II and significant relationship with tumor recurrence-regrowth. Large tumors presented a significant association with strong XPF expression. Regarding survival analyses, we did not observe a relationship with any of the markers studied, however, the significant relationship of XPF and XPG with recurrence-regrowth points to a greater influence of these proteins on the progression of the disease, suggesting the possible use of these biomarkers in clinical evolution.

In our study, we considered as a possible limitation the small number of grade III cases, however, the low frequency of this tumor grade in meningiomas

occurs even in surgical series. Concerning the tumoral size, the big number of large tumors could be explained by the selection bias, as we are a reference hospital in neurosurgery. Regarding the follow-up time, despite the time evaluated and the slow pattern of tumor growth of meningiomas, cases of regrowth and recurrence were observed in percentages similar to those in the literature. In addition, this study was composed of samples from patients operated by the same neurosurgeon and hospital, increasing the strength in relation to resection and recurrence/regrowth of cases.

To know, the role of DNA repair proteins and cell synthesis is important for understanding the processes of origin and tumor development. Grade II meningiomas and the strong expression of XPF, and XPG were predictors of recurrence-regrowth and may assist in clinical management, considering the high recurrence of meningiomas and the absence of consensus regarding the treatment.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001

REFERENCE

Abbritti RV, Polito F, Cucinotta M et al (2016) Meningiomas and proteomics: focus on new potential biomarkers and molecular pathways. *Cancer Genomics Proteomics* 13:369-379

Harter PN, Braun Y, Plate KH (2017) Classification of meningioma advances and controversies. *Chin Oncol* 6:S2. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.05.02>

Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2018) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol* 20:1-86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>

Norden AD, Ligon KL, Hammond SN et al (2015). Phase II study of monthly pasireotide LAR (SOM230C) for recurrent or progressive meningioma. *Neurology* 84:280-286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001153>

Friedberg EC (2015) A history of the DNA repair and mutagenesis field: I. The Discovery of enzymatic photoreactivation. *DNA Repair (Amst)* 33:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.06.007>

Proctor DT, Ramachandran S, Lama S, Sutherland GR (2018) Towards Molecular Classification of Meningioma: Evolving Treatment and Diagnostic Paradigms. *World Neurosurg* 119:366-373. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.08.019>

Kanter M, Turan G, Usta C et al (2016) Survivin and cyclin D1 expressions are associated with malignant potential in mucinous ovarian neoplasms. *J Mol Histol* 47:145-152.

Ramos-García P, González-Moles MÁ, Ayén Á, González-Ruiz L, Gil-Montoya JA, Ruiz-Ávila I (2019) Predictive value of CCND1/cyclin D1 alterations in the malignant transformation of potentially malignant head and neck disorders: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 41:3395-3407.

Koch SC, Simon N, Ebert C, Carrel T (2016) Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum (XP) proteins. *Q Ver Biophys* 49:e5.

Banda DM, Nunez NN, Burnside MA, Bradshaw KM, David SS (2017) Repair of 8-oxoG: A mismatches by the MUTYH glycosylase: Mechanism, metals and medicine. *Free Radic Biol Med* 107:202-215.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Oya S, Kim S-H, Sade B, et al (2011) The natural history of intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 114:1250-1256. <https://doi.org/10.3171/2010.12.JNS101623>

Karsy M, Guan J, Cohen A, et al (2016) Medical management of meningiomas: current status, failed treatment and promising horizons. *Neurosurg Clin N Am* 27:249-260. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2015.11.002>

Splavski B, Hadzic E, Bagic I, et al (2017) Simple tumor localization scale for estimating management outcome of intracranial meningioma. *World Neurosurg* 104:876-882. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.05.039>

Zada G, Başkaya MK, Shah MV (2017) Introduction: surgical management of skull base meningiomas. *Neurosurg Focus* 43:Intro. <https://doi.org/10.3171/2017.10.FocusVid.Intro>.

Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22-39. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.22>

Rose PG, Java J, Whitney CW et al (2015) Nomograms predicting progression-free survival, overall survival, and pelvic recurrence in locally advanced cervical cancer developed from an analysis of identifiable prognostic factors in patients from oncology/gynecologic oncology group randomized trials of chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 33:2136-2142. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.7122>

Azar M, Kazemi F, Jahanbakhshi A et al (2017) Gamma knife radiosurgery for cavernous sinus meningiomas: analysis of outcome in 166 patients. *Stereotact Funct Neurosurg* 95:259-267. <https://doi.org/10.1159/000478024>

Cheng G, Zhang L, Lv W, Dong C, Wang Y, Zhang J (2015) Overexpression of cyclin D1 in meningioma is associated with malignancy grade and causes abnormalities in apoptosis, invasion and cell cycle progression. *Med Oncol* 32:439. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0439-0>

Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM (2004) Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G1070-G1077. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.0010.1152/ajpgi.00228.2004>

Hatch SB, Swift LP, Caporali S et al (2014) XPF protein levels determine sensitivity of malignant melanoma cells to oxaliplatin chemotherapy: suitability as a biomarker for patient selection. *Int J Cancer* 134: 1495-1503. <https://doi.org/10.1002/ijc.28454>

Wiemels J, Wrensch M, Claus EB (2010) Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 99:307-314. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0386-3>

Perry A (2018). Meningiomas In: Perry A, Brat DJ (ed) Practical surgical neuropathology a diagnostic approach, Churchill Living stone Elsevier, Philadelphia, pp 259-296.

Zouaoui S, Darlix A, Rigau V et al (2018) Descriptive epidemiology of 13,038 newly diagnosed and histologically confirmed meningiomas in France: 2006-2010. *Neurochirurgie* 64:15-21. [https://doi.org/ 10.1016/j.neuchi.2014.11.013](https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2014.11.013)

Custer B, Longstreth WT Jr, Phillips LE, Koepsell TD, Van Belle G (2006) Hormonal exposures and the risk of intracranial meningioma in women: a population based case-control study. *BMC Cancer* 6:152-5. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-152>

Eksi MS, Canbolat Ç, Akbaş A et al (2019) Elderly Patients with Intracranial Meningioma: Surgical Considerations in 228 Patients with a Comprehensive Analysis of the Literature. *World Neurosurg* S 19:32306-X. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.08.150> PMID: 31476477

Garzon-Muvdi T, Yang W, Lim M, Brem H, Huang J (2017) Atypical and anaplastic meningioma: outcomes in a population based study. *J Neurooncol* 133:321-330. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2436-6>

Almeida AN, Pereira BJA, Pires Aguiar PH et al (2017). Clinical outcome, tumor recurrence, and causes of death: a long-term follow-up of surgically treated meningiomas. *World Neurosurg* 102:139-143. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.03.009>

Moon HS, Jung S, Jang WY, Jung TY, Moon KS, Kim IY (Intracranial meningiomas, WHO Grade II: prognostic implications of clinic pathologic features. *J Korean Neurosurg Soc* 52: 14-20. <https://doi.org/10.3340/jkns.2012.52.1.14>

Gallagher MJ, Jenkinson MD, Brodbelt AR, Mills SJ, Chavredakis E (2016) WHO grade 1 meningioma recurrence: Are location and Simpson grade still relevant? *Clin Neuro Neurosurg* 141:117-121. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.01.006>

Magill ST, Young JS, Chae R, Aghi MK, Theodosopoulos PV, McDermott MW (2018) Relationship between tumor location, size, and WHO grade in meningioma. *Neurosurg Focus* 44:E4. <https://doi.org/10.3171/2018.1.FOCUS17752>

Karimi S, Vyas MV, Gonen L, et al (2017) Prognostic significance of preoperative neutrofilia on recurrence free survival in meningioma. *Neuro Oncol* 19:1503-1510. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox089>

Bumrungrachpukdee P, Pruphetkaew N, Phukaoloun M, Pheunpathom N (2014) Recurrence of intracranial meningioma after surgery: analysis of influencing factors and outcome. *J Med Assoc Thai* 97:399-406.

Voß KM, Spille DC, Sauerland C et al (2017) The Simpson grading in meningioma surgery: does the tumor location influence the prognostic value? *J Neurooncol* 133:641-651. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2481-1>

Nowak A, Dziedzic T, Krych P, Czernicki T, Kunert P, Marchel A (2015) Benign versus atypical meningiomas: risk factors predicting recurrence. *Neurol Neurochir Pol* 49:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.pjnns.2014.11.003>

Kalani MY, Cavallo C, Coons SW et al (2015). Long-term follow-up of surgical resection of microcystic meningiomas. *J Clin Neurosci* 22:713-717. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.12.004>

Di Franco R, Borzillo V, Ravo V et al (2017). Radiosurgery and stereotactic radiotherapy with cyber knife system for meningioma treatment. *The Neuroradiology Journal* 31:18-26. <https://doi.org/10.1177/1971400917744885>

Romani R, Ryan G, Benner C, Pollock J (2018) Non-operative meningiomas: long-term follow-up of 136 patients. *Acta Neurochir (Wien)* 160:1547-1553. <https://doi.org/10.1007/s00701-018-3554-4>

Tao X, Dong J, Hou Z et al (2018) Clinical features, treatment, and prognostic factors of 56 intracranial and intraspinal clear cell meningiomas. *World Neurosurgery* 111:880–887. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.12.173>

Mc Neil KA (2016) Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 34:981-998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>

Uzüm N, Ataoğlu GA (2008) Histopathological parameters with Ki-67 and bcl-2 in the prognosis of meningiomas according to WHO 2000 classification. *Tumori* 94:389-397. <https://doi.org/10.1177/030089160809400316>

Koelsche C, Sahm F, Capper D et al (2013) Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 126:907-915.

Mirian C, Duun-Henriksen AK, Juratli T (2020) Poor prognosis associated with TERT gene alterations in meningioma is independent of the WHO classification: an individual patient data meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91:378-387. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322257>

Bertero L, Dalla Dea G, Osella-Abate S et al (2019) Prognostic Characterization of Higher-Grade Meningiomas: A Histopathological Score to Predict Progression and Outcome. *J Neuropathol Exp Neurol* 78: 248–256. PMID: 30689922

Sahm F, Schrimpf D, Olar A, et al (2016) TERT promoter mutations and risk of recurrence in meningioma *J Natl Cancer Inst* 108:djv377.

Ravikumar G, Ananthamurthy A (2014) Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. *J Cancer Res Ther* 10:671-675. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.138135>

He Q, Wu J, Liu XL et al (2017) Clinicopathological and prognostic significance of cyclin D1 amplification in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J Buon* 22:1209-1216.

Milenković S, Marinkovic T, Jovanovic MB, Djuricic S, Berisavac II, Berisavac I (2008) Cyclin D1 immunoreactivity in meningiomas. *Cell Mol Neurobiol* 28:907-913. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9278-x>

El-Gewely MR, Andreassen M, Walquist M et al (2016). Differentially expressed microRNAs in meningiomas grades I and II suggest shared biomarkers with malignant tumors. *Cancers (Basel)*. 8:E31. <https://doi.org/10.3390/cancers8030031>

Krawczyk MA, Karpinsky G, Izycka-Swieszewska E et al (2019) Immunohistochemical assessment of cyclin D1 and p53 is associated with survival in childhood malignant peripheral nerves sheath tumor. *Cancer Biomark* 24:351-361. <https://doi.org/10.3233/CBM-181572>

Jiricny J (2000) Mediating mismatch repair. *Nat Genet* 24:6-8. <https://doi.org/10.1038/71698>

Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S et al (2010). DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro Oncol* 12:37-48. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop012>

Luo KQ, Mu SQ, Wu ZX et al (2013) Polymorphisms in DNA repair genes and risk of glioma and meningioma. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:449-452. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.1.449>

Sulman EP, White PS, Brodeur GM (2004) Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene* 23:1014-1020. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206623>

Chen SY, Chen HH, Huang YC et al (2017) Polymorphism and protein expression of MUTYH gene for risk of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disord* 7:69. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1437-0>

Su Y, Zhang H, Xu F, Kong J, Yu H, Qian B (2015) DNA Repair Gene Polymorphisms in Relation to Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Cell Physiol Biochem* 36:1419-29.

Staresinic L, Fagbemi AF, Enzlin JH et al (2009) Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J* 28:1111-1120. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.49>

Jimeno S, Herrera-Moyano E, Ortega P, Aguilera A (2017) Differential effect of the overexpression of Rad2/XPG family endonucleases on genome integrity in yeast and human cells. *DNA Repair (Amst)* 57:66-75. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.06.030

Black JO (2016) Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol* 10:139-144. <https://doi.org/10.1007/s12105-016-0707-8>

Koyama Y, Higashimoto M, Gonda K et al (2010) Expression of Xeroderma Pigmentosum Group G (XPG) in Sporadic Breast Carcinoma. *Ann Cancer Res Therap* 18:37-42. <https://doi.org/10.4993/acrt.18.37>

Deng N, Liu JW, Sun L et al (2014) Expression of XPG Protein in the Development, Progression and Prognosis of Gastric Cancer. *PLoS One* 9:e108704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108704>

Wu H, Li S, Hu X et al (2019) Associations of mRNA expression of DNA repair genes and genetic polymorphisms with cancer risk: a bioinformatics analysis and meta-analysis. *J Cancer* 10:3593-3607. <https://doi.org/10.7150/jca.30975>

Aracil M, Dauffenbach LM, Diez MM et al (2013) Expression of XPG protein in human normal and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 6:199-211.

Maxwell M, Galanopoulos T, Antoniades H (1996) Expression of cyclin D1 proto-oncogene mRNA in primary meningiomas may contribute to tumorigenesis. *Int J Oncol* 9:1213-1237

Huagn J, Liu X, Ling-Ling T et al (2017) XPG gene polymorphisms and cancer susceptibility: evidence from 47 studies. *Oncotarget* 8:37263-37277. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16146>

TABLES

Table 1. Univariate analysis of clinical and tumor characteristics.

Characteristics	Total (%)	p-value	HR	95% IC
Gender				
Male	27 (32.1%)		1	
Female	57 (67.9%)	0.69	1.21	0.45 - 3.23
Age				
>50 years	40 (47.6%)		1	
≤50 years	44 (52.4%)	0.66	1.21	0.51 - 2.87
Grade				
I	67 (78.8%)		1	
II	17 (20.2%)	0.05*	2.54	0.97 - 6.5
Location				
Peripheral	53 (63%)		1	
Central	31 (37%)	0.30	1.57	0.66 - 3.74
Location				
Skull	38 (45.2%)		1	
Non-Skull	46 (54.7%)	0.20	1.85	0.72 - 4.74
Tumor size				
≤ 3 cm	29 (34.1%)		1	
>3 cm	55 (67.7%)	0.36	1.53	0.60 - 3.88
Surgical extension				
Complete	47 (56%)		1	
Parcial	37 (44%)	0.18	1.81	0.75 - 4.35

*: p<0.05; HR: hazard ratio; IC: confidence interval

Table 2. Survival and recurrence rates in meningiomas grade I and II

Grade	Recurrence- regrowth (n/%)	Median time survival (months)	Survival (1 year)	Survival (3 years)	Survival (5 years)
I	15 (19.4%)	71.4±5	96.6%	68.7%	62.3%
II	6 (33.3%)	48.2±9*	83.0%	58.0%	21.8%

* p-value <0.05

FIGURES

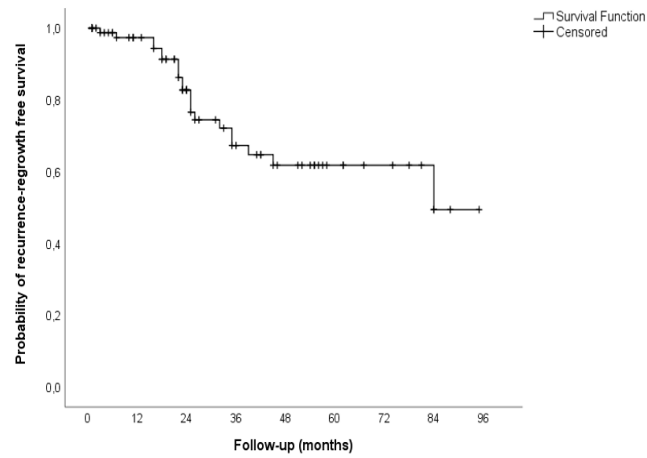


Figure 1. Kaplan-Meier curve demonstrating RFS time in patients with meningiomas.

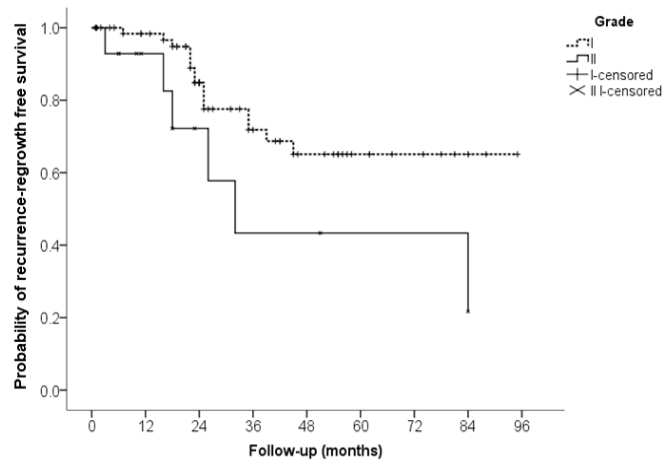


Figure 2. Kaplan-Meier curve demonstrating RFS in patients with meningioma according to tumor grade.

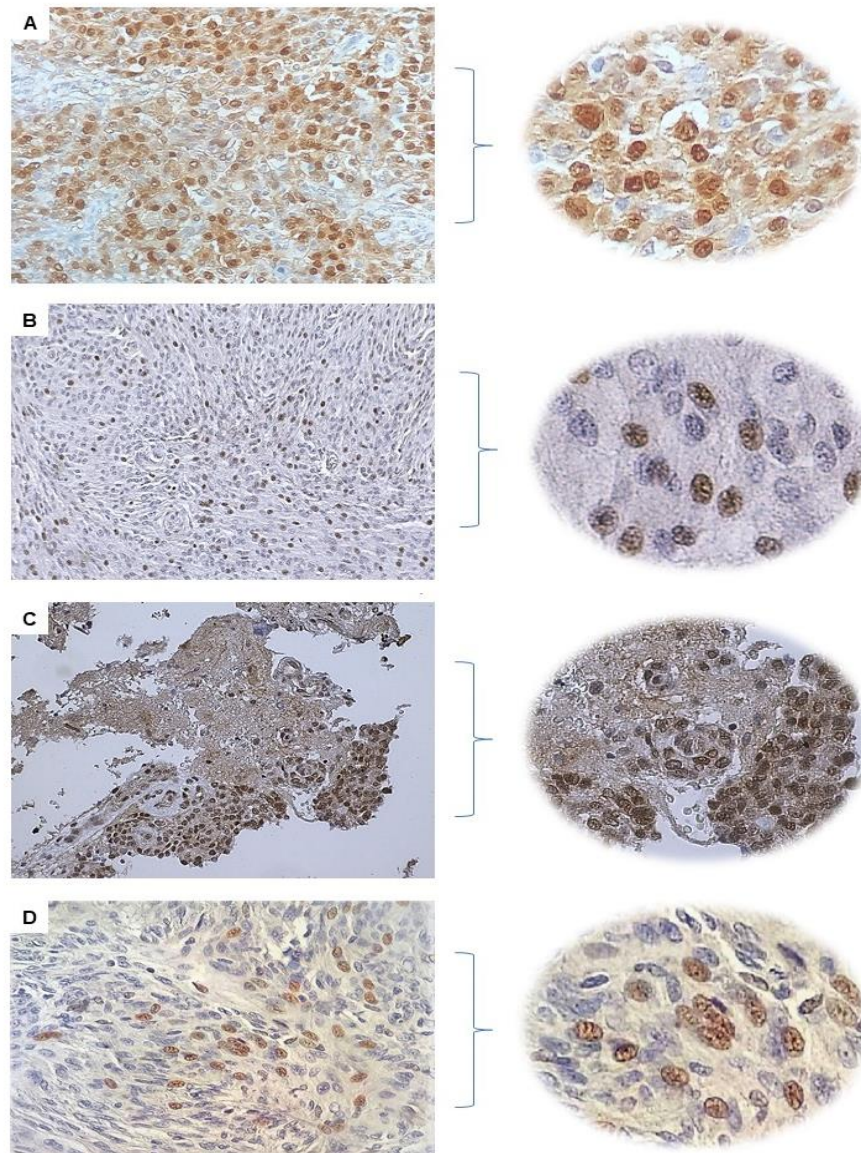


Figure 3. Nuclear expression. of cyclin D1 (A, atypical meningioma with pleomorphic nucleus and prominent nucleoli), MUTYH (B, meningothelial meningioma), XPF (C, atypical meningioma with invasion of nerve tissue) and XPG (D, atypical meningiomas with nuclear inclusions) (arrows; 400x).

5. CONCLUSÕES

Concluimos, neste estudo, que há expressão proteica dos marcadores estudados em meningiomas, com predominância do padrão nuclear e maior expressão em meningiomas grau II, demonstrando ativação das vias de reparo e síntese celular.

Meningiomas grau II foram preditores independentes de recorrência ou recrescimento. Encontramos associação significativa entre ciclina D1, MUTYH e XPF. Expressão elevada de ciclina D1 e expressão forte de XPF e XPG foram associadas com tumores grau II, enquanto expressão baixa da proteína MUTYH com tumores grau I. Encontramos associação entre expressão forte de XPF em tumores grandes. As proteínas XPF e XPG apresentaram relação com recorrência ou recrescimento tumoral.

A recorrência ou recrescimento foi observada em 24,7% da amostra, sem relação estatística com o tipo de extensão cirúrgica. Meningiomas grau II apresentaram relação significativa com tumores grandes, extensão cirúrgica completa.

A sobrevida média livre de recorrência ou recrescimento foi de 67 meses, sem relação significativa com nenhuma das proteínas avaliadas.

Meningiomas grau II e expressão forte de XPF e XPG foram preditores de recorrência ou recrescimento, podendo auxiliar no manejo clínico, considerando a elevada recorrência dos meningiomas e a ausência de consenso quanto ao seu tratamento.

6. SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

*“PREOPERATIVE HEMATOLOGICAL INFLAMMATORY MARKERS
ASSOCIATED WITH RECURRENCE-REGROWTH IN MENINGIOMAS”*

Camila Batista de Oliveira Silva

Bruna Araújo

Tainá Mafalda dos Santos

Carolina Garcia Soares Leães Rech

Nelson Pires Ferreira

Miriam da Costa Oliveira

Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima

**Enviado para publicação na revista “*International Journal of Laboratory
Hematology*”**

**PREOPERATIVE HEMATOLOGICAL INFLAMMATORY MARKERS
ASSOCIATED WITH RECURRENCE-REGROWTH IN MENINGIOMAS**

Camila Batista de Oliveira Silva^{1,2}, Bruna Araújo², Tainá Mafalda dos Santos²,
Carolina Garcia Soares Leães Rech², Nelson Pires Ferreira², Miriam da Costa
Oliveira^{1,2}, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima^{1,2}

¹ Post Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of
Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

² Neuroendocrinology Center, Santa Casa of Porto Alegre (ISCOMPA/UFCSPA),
Brazil.

Corresponding Author:

Camila Batista de Oliveira Silva
Department of Pathology
Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)
Sarmiento Leite, 245
CEP 90050-170
Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: +55-51-98313-2778
Fax: + 55-51-33038703
milaabatistar@gmail.com

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Silva CBO, Araújo B, Santos TM and Leães Rech CGS. The first draft of the manuscript was written by Pereira-Lima JFS, Ferreira NP and Oliveira MC and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

Background: Meningiomas represent the most frequently diagnosed intracranial tumors. Inflammatory cells present in the tumor can modulate both antitumor and protumor functions, and modify the therapeutic response. Hematological inflammatory parameters have provided prognostic information useful in the treatment and clinical evaluation of several tumors. The aim of this study was to evaluate preoperative hematological markers in blood count and leukogram of patients with meningiomas and to relate them to recurrence-regrowth free survival and clinical variables.

Methods: Eighty-nine patients without corticosteroid therapy were included. Blood test results and tumor characteristics were collected from medical records. Associations between clinical characteristics and the recurrence-regrowth free survival (RFS) was evaluated using Cox proportional hazard analysis and Kaplan-Meier curves.

Results: Of the 89 cases, 73 (82%) were grade I and 16 (18%) grade II. The mean age was 53 ± 13.9 years, with higher the frequency in women, in a 2:1 proportion. Anemia was observed in 23.6% and neutrophilia in 42% of the patients. In univariate analysis, anemia ($p=0.04$), neutrophilia ($p=0.02$) and neutrophils/lymphocytes ratio (NLR) ($p=0.02$) were associated with an increased risk of recurrence-regrowth and shorter RFS. In multivariate analysis, the interaction between anemia and $NLR > 4.1$ represented a higher risk of recurrence-regrowth ($p=0.003$).

Conclusion: The preoperative presence of anemia, neutrophilia, and $NLR > 4.1$ was associated with a worse prognosis in meningiomas. This study suggests the preoperative evaluation of hematological markers, blood count and leukogram, as a clinical routine in patients with meningiomas.

KEY-WORDS: meningiomas, survival, hematological markers, prognosis, recurrence, recurrence-regrowth

INTRODUCTION

Meningiomas are tumors that originate from arachnoid meningotheial cells and represent 37% of primary intracranial tumors. Prevalent in women, with an incidence of 8.3 cases per 100.000 inhabitants, increasing these values after 65 years [1]. Despite the high prevalence of benign cases and slow progression, meningiomas recur even after complete resection, demonstrating aggressive behavior and poor prognosis [2].

According to WHO, the tumor grade and type of surgical resection remain important predictors of recurrence [1]. Besides the preoperative imaging exams, few parameters have previously evaluated the outcome of meningiomas, including male gender and young age [3,4]. Thus, preoperative markers able to predict tumor recurrence or regrowth are considered important instruments for clinical practice.

Inflammation is related to carcinogenic processes, being considered a relevant epigenetic factor, as it allows the formation of a tumor microenvironment favorable to the occurrence of mutations [5,6]. Studies describe that inflammatory cells present in the tumor can perform a dual function, anti and pro-tumor, and may modify the therapeutic responses [7,8]. In several tumor types, such as intracranial, pulmonary, gastrointestinal, among others, hematological inflammatory markers were able to provide prognostic information useful in the management or therapeutic evaluation [9,10].

Meningiomas frequently present peritumoral edema and cellular stromal infiltration, related to the immune and inflammatory response, with a consequent poorer prognosis [11]. The evaluation of hematological inflammatory markers in meningiomas showed promising, allowing the identification of more aggressive cases (grade II and III) and worse clinical evolution [12-14].

This study aimed to evaluate preoperative hematological inflammatory markers in blood count and leukogram in patients with meningiomas and to relate them to clinical, tumoral variables and recurrence-regrowth free survival.

PATIENS AND METHODS

This cross-sectional study involved 102 patients above 18 years, undergoing transcranial resection by a single surgeon (NPF) in a reference hospital in southern Brazil diagnosed with meningioma. The samples were included for convenience between 2016 and 2019. All patients signed the free and informed consent form, the study was approved by the Institutional Ethics Committee (Report n° 1.446.130 and 1.509.852) and conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

The slides, with tissue from surgery, were stained with hematoxylin and eosin (HE) to confirm the presence of tumor, tumor grade and subtypes and analyzed by an experienced pathologist (LBC).

The medical records were reviewed to obtain clinical (age, gender, tumor size and location, the extension of resection, recurrence-regrowth) and preoperative hematological parameters (blood count and leukogram), including 89 patients without preoperative use of corticosteroids and no history of radiotherapy or chemotherapy.

Blood tests were conducted by a specialized laboratory of clinical analysis in reference hospital, considering normal ranges: erythrocyte (4-5,6 million/ μ L), hemoglobin (11,6-15,6 g/dL), leukocyte (3600-11000/ μ L), neutrophil (1500-7000/ μ L), lymphocyte (1000-4500/ μ L), monocyte (100-1000/ μ L), basophils (0-220/ μ L), eosinophils (0-500/ μ L), platelet (150000-440000/ μ L). Meningiomas were classified according to tumor grade in benign (grade I), atypical (grade II) and anaplastic (grade III) and according to histological subtype, following the World Health Organization (WHO) [15].

Tumor size was defined as the highest dimension at preoperative imaging (magnetic resonance or computed tomography). Tumors with a size greater than 3 cm were considered large [16,17]. Regarding location, tumors were divided according to central or peripheral regions [18].

The surgical extension was determined by Simpson's classification, based on the surgical description and postoperative imaging analysis. Considering complete resection: Simpson grade I-II, absence of tumor residue visible in surgical description and absence of lesion in image performed three months after surgery and, partial resection: Simpson grade III-V, presence of tumor

residue visible in surgical description and/or presence of lesion in image performed three months after surgery [18,19]. Recurrence was defined as the appearance of a new tumor after complete surgical resection and regrowth as an increase of tumor residue after partial resection. Follow-up included patients with at least six months of medical monitoring after surgery.

STATISTICAL ANALYSES

The data were presented by frequency and percentage, mean and standard deviation. The correlations between the quantitative variables were verified by the Spearman correlation test. The Chi-square or Fisher's exact test were used for qualitative variables when necessary. The clinical outcome evaluated was recurrence-regrowth free survival, considering the time elapsed between the date of surgical removal and the date of disease progression or the last follow-up record. The Kaplan-Meier curves were used to estimate the recurrence-regrowth free survival time.

Associations between clinical and tumor characteristics with recurrence-free survival time or regrowth were evaluated using multivariate Cox proportional hazards analysis (HR), the multivariate analysis included the dependent variables that were significant in the univariate analysis ($p < 0.20$). The statistical significance adopted was 5% ($p < 0.05$) and the analysis were performed in the Software SPSS version 25 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA).

RESULTS

We evaluated 89 patients with confirmed diagnosis of meningioma, of these 73 (82%) were grade I and 16 (18%) grade II. The mean age was 53 ± 13.9 years, ranging from 18 to 82 years, with higher frequency in women (69.7%) in the proportion 2:1. The most frequent subtypes were meningothelial (40.4%), transitional (23.5%) and atypical (17.9%). As for location, the more common was the peripheral (64%) and most tumors (64%) were larger than 3 cm with a mean of 3.52 ± 2.13 cm. Tumor characteristics and univariate analysis are described in Table 1.

Regarding surgical extension, 49 (55.1%) underwent complete resection, 40 (81.6%) remained without lesion and 9 (18.3%) presented tumor recurrence. Forty patients underwent partial resection (44.9%), 29 (72.5%) remained with stable lesion and 11 (25%) had tumor regrowth. In total, 20 (22.4%) cases of recurrence-regrowth were observed. The median follow-up at the time of data analysis was 22 months, ranging from 6 to 96 months. Gender, age, grade, location, size and extent of surgical resection were not predictive factors for shorter RFS. The survival mean time was 62 months (95% CI: 52.2 to 72.0) and, according to Kaplan-Meier, survival rates were 96.1% at 1 year, 67.4% by 3 years and 51.2% in 5 years (Figure 1).

The presence of anemia was observed in 23.6% of the sample, 18 (25%) grade I and 3 (19%) grade II. Neutrophilia was present in 42%, 28 (39%) grade I and 9

(56%) grade II. There was no statistically significant difference between anemia, neutrophilia and tumor grade.

The preoperative presence of anemia and neutrophilia, in separate, was related to the increased risk of recurrence by 3.4 times ($p=0.02$) and regrowth by 2.6 times ($p=0.04$) (Table 1). The Kaplan-Meier curve demonstrated that the median time to RFS in patients with anemia was 38 months ((95% CI 25-50) and in patients without anemia was 66 months (95% CI: 55-76). In patients with neutrophilia the RFS was 50 months (95% CI 35-65) and those patients without neutrophilia was 69 months (95% CI: 57-81) (Figure 2).

A significant association was found between lymphopenia and neutrophilia ($p=0.004$) and lymphopenia and anemia ($p=0.018$). Leukocytosis, lymphopenia and monocytosis were not predictive factors associated with shorter RFS.

The median ratio between neutrophil and lymphocyte (N/L) was 4.1 (range 0.9-28.4), which was considered the cutoff point for the other analysis. The $N/L > 4.1$ was related to increased risk of recurrence-regrowth by 2.79 times ($p=0.02$) (Table 1), the Kaplan-Meier curve demonstrated that the median RFS in patients with $N/L > 4.1$ was 48 months (95% CI: 32-64) and with $N/L < 4.1$ was 70 months (95% CI: 58-81) (Figure 3).

Positive correlations were found between neutrophils and leukocytes ($r= 0.95$; $p<0.001$) and between neutrophils and $N/L > 4.1$ ($r=0.78$; $p<0.001$) and negative correlation between lymphocytes and $N/L > 4.1$ ($r=-0.70$; $p<0.001$) (Figure 4).

The relationship between platelets and N/L>4.1, between platelets and lymphocytes, or between lymphocytes and monocytes in the preoperative period were not predictive factors associated with poor RFS. A statistical trend was observed between N/L> 4.1 and the male gender ($p=0.06$).

In multivariate analysis, only patients with anemia and N/L> 4.1 had an increased risk of tumor recurrence-regrowth by 7.13 times ($p=0.003$) (Table 2).

The Kaplan-Meier curve demonstrated that the mean RFS in patients with anemia and N/L> 4.1 was 35 months (95% CI: 16-54) and in patients with only one parameters or neither anemia nor N/L>4.1 was 65 months (95% CI: 55-75) (Figure 5).

DISCUSSION

This study aimed to identify parameters capable of evaluating the recurrence-regrowth profile of meningiomas prior to surgery. We evaluated a series of 89 cases with mean age, female predominance, tumor grade I and subtypes according to previous studies [20,21].

The peripheral region was more prevalent, in agreement with other studies [16, 18]. According to Apra and colleagues [22], central location is associated with worse prognosis due to proximity to important structures, requiring more attention and balance between surgical removal and brain injuries. Partial

surgical extension, as well as tumor size >3 cm, have been shown to be a risk factor for recurrence-regrowth [23, 24].

Preoperative evaluation of hematological markers may be useful for the prognosis of patients with different tumor types [4, 25]. The possible associations between clinical, tumoral and inflammatory features in the prognosis of meningiomas are poorly studied.

The clinical outcome evaluated in our study was RFS, considered the most appropriate method for tumor growth assessment [26-28]. Our RFS mean time was 62 months, similar to that found in other series, from 47 to 57 months [29-31]. Regarding recurrence, the rate observed was 22.4%, as described by other groups, from 10.2% to 32.2% [29-31].

In the present study, the hematological parameters significantly associated shorter RFS were anemia, neutrophilia, and N/L>4.1.

Anemia, as well as alteration in iron metabolism and erythropoiesis, is considered an unfavorable prognostic factor in patients with various tumors, including brain [32,33]. Anemia and hypoxia may interfere in tumor behavior; studies associate hypoxia with the occurrence of genetic instability, resulting in increased angiogenesis, less response to apoptosis and oxidized free radicals, as well as radiation resistance [34]. Subeikshanan and colleagues, in a study with intra and extra-axial tumors, including meningiomas, observed a reduction in hemoglobin levels compared to the control group [35].

In our study, the prevalence of anemia was 23% and represented a significant increase in the risk of recurrence regrowth, similar to data from Karimi's group in a study with meningiomas (21%) [12]. The Kaplan-Meier curve showed a reduction in survival time in patients with and without anemia (38 versus 66 months). Karimi found no association between anemia and shorter survival time [12].

Our study showed no significant association between anemia and the other clinical and tumor variables. A multicenter study of 672 meningiomas describes a significant increase in hemoglobin levels in grade II and III [14].

Neutrophils are traditionally described as important cells of defense against microorganisms, as well as regulators of chronic processes and producers of pro-inflammatory cytokines and growth factors [36,37]. Nevertheless, studies show that neutrophils may also play a significant role in tumor development, presenting a pro-tumorigenic phenotype [38]. High neutrophil count is reported in several tumors and appointed as a clinically relevant prognostic marker [39,40].

In our study, the prevalence of neutrophilia was 42%, higher than the study by Karimi in meningiomas (23%) [12]. Studies by Zheng and Kayhan described a significant increase in neutrophil count in meningiomas compared to neuromas and controls [41,42]. We found no significant association between neutrophilia and the other clinical and tumor variables. Studies by Liang and Ling observed a significant increase in neutrophils in grade II and III meningiomas [13,14].

Neutrophilia represented a significant increase in the risk of recurrence-regrowth and shorter time of RFS (50 versus 69 months), according to Karimi [12]. Other authors did not perform analyses of survival for comparisons [13,14,41,42].

Our data showed a positive correlation between neutrophils and leukocytes, an expected result considering their role in inflammation and infection [43]. Meningiomas are tumors with frequent presence of inflammatory infiltrate, formed by different subpopulations of lymphocytes, macrophages, and natural killer cells [11, 44]. Polyzoidis and colleagues associated the presence of mast cells in the infiltrate with aggressiveness in meningiomas [45].

A significant association between lymphopenia and, anemia and neutrophilia was observed. Lymphopenia is an important marker related to poor prognosis and survival rates in several diseases, and also common in immunodeficient patients [46]. It can occur in different subpopulations of T and B lymphocytes, resulting in an altered composition of the immune infiltrate, an important component in tumor growth control [47].

Lymphopenia and anemia were related to unfavorable prognosis in patients with colorectal tumors and lymphoma [48,49]. Patients with anemia and lymphopenia have shorter survival due to resistance to radio and chemotherapy [50]. To date, there is no description in the literature of the association between lymphopenia and anemia in meningiomas.

The N/L ratio represent the equilibrium between pro-tumor inflammatory response (neutrophils) and anti-tumor immune response (lymphocytes), and has recently been cited as a marker of systemic inflammatory, meaning worse clinical outcome [6, 51]. Mei, in a recent systematic review with 66 studies and 24536 patients with various tumors, describes an increase in N/L ratio in advanced tumors and worse overall survival rates [52]. In the present study, to evaluate RFS, the N/L ratio cutoff point of 4.1 was used, according to a meta-analysis of 28 studies and 7203 patients with different tumors that described mean cutoff point of 5.0, ranging from 2.0 to 7.7 [10]. The $N/L > 4.1$ represented increased risk and shorter RFS (48 versus 70 months). Results similar to those observed by Subeikshanan and Kayhan in meningiomas, despite the use of different cutoff points (2.1 and 4.8) [35, 42]. In the study of Karimi, N/L was not associated with a worse prognosis [12].

We observed positive correlation between neutrophils and $N/L > 4.1$ and negative correlation between lymphocytes and $N/L > 4.1$, as described in other tumors [51, 53] and previously described in meningiomas [14, 35].

Multivariate analysis showed a significant interaction between anemia and $N/L > 4.1$, associating it with increased risk and shorter RFS (35 versus 65 months). In the study by Gorphe, in multivariate analysis, similar interaction was found in laryngeal carcinoma [54]. In a small cell lung tumor series, normal hemoglobin and $N/L < 5$ were associated with higher survival rates confirming the possible role of these markers with tumor progression [55]. There are no reports in the literature about this interaction in meningiomas.

The authors describe possible limitations in this study, such as conducting data collection retrospectively. Our study presents a small number of cases and absence of tumors grade III, although, we obtained statistically significant results with clinical repercussions. Therefore, we suggest a prospective and multicenter study to expand the number of cases, increasing the strength of the results obtained.

In conclusion, the preoperative presence of anemia, neutrophilia, and N/L > 4.1 were related to a significant increase in risk and RFS reduction. Preoperative evaluation of hematological inflammatory markers is suggested as a routine, considering the ease of implementation of this practice and the outcomes related to tumor recurrence in patients with meningiomas.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001

POTENCIAL CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest and have full control of all primary data and agree to allow the journal to review their data if requested.

REFERENCE

Abbritti RV, Polito F, Cucinotta M, et al (2016) Meningiomas and proteomics: focus on new potential biomarkers and molecular pathways. *Cancer Genomic Proteomic*. 13:369-379

Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, et al (2018) CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol* 20:1-86

Balasubramanian SK, Sharma M, Silva D, et al (2017) Longitudinal experience with WHO Grade III (anaplastic) meningiomas at a single institution. *J Neurooncol* 131:555-563

Zhao X, Zhao D, Wu Y, et al (2018) Meningioma in the elderly: Characteristics, prognostic factors, and surgical strategy. *J Clin Neurosci* 56:143-149

Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19:1423-1437

Wang PF, Meng Z, Song HW, et al (2018) Preoperative changes in hematological markers and predictors of glioma grade and survival. *Front Pharmacol* 9:886

Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444

Shiao SL, Ganesan AP, Rugo HS, et al (2011) Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes Dev* 25:2559-2572

Kozak MM, von Eyben R, Pai JS, et al (2017) The prognostic significance of pretreatment hematologic parameters in patients under going resection for colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 40:405-12

Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, et al (2014) Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 106:124.

Domingues P, González-Tablas M, Otero Á, et al (2016) Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain Behav Immun*. 53:1-15.

Karimi S, Vyas MV, Gonen L, et al (2017) Prognostic significance of preoperative neutrophilia on recurrence free survival in meningioma. *Neuro Oncol* 19:1503-1510

Liang RF, Li M, Li JH, et al (2019) The significance of preoperative hematological inflammatory markers in patients with meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg* 182:1-4

Lin M, Hu T, Yan L, et al (2019) Can systemic inflammatory markers be used to predict the pathological grade of meningioma before surgery? *World Neurosurg* 127:677-684

Harter PN, Braun Y, Plate KH (2017) Classification of meningioma advances and controversies. *Chin Oncol* 6:S2

Karsy M, Guan J, Cohen A, et al (2016) Medical management of meningiomas: current status, failed treatment and promising horizons. *Neurosurg Clin N Am* 27:249-260

Oya S, Kim S-H, Sade B, et al (2011) The natural history of intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 114:1250-1256

Splavski B, Hadzic E, Bagic I, et al (2017) Simple tumor localization scale for estimating management outcome of intracranial meningioma. *World Neurosurg* 104:876-882

Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22-39

Perry A (2017) Meningiomas. In: Perry A (ed) Brat DJ (ed). *Practical surgical neuropathology a diagnostic approach*. 3rd edn. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, pp259-96.

Zouaoui S, Darlix A, Rigau V, et al (2018) Descriptive epidemiology of 13,038 newly diagnosed and histologically confirmed meningiomas in France: 2006-2010. *Neurochirurgie* 64:15-21

Apra C, Peyre M, Kalamarides M (2018) Current treatment options for meningioma. *Expert Rev Neurother* 18:241-249

Champeaux C, Dunn L (2016) World health organization grade II meningioma: a 10-year retrospective study for recurrence and prognostic factor assessment. *World Neurosurg* 89:180-186

Winther TL, Torp SH (2017) Significance of the extent of resection in modern neurosurgical practice of world health organization grade I meningiomas. *World Neurosurg* 99:104-110

Xia L, Hu G, Guzzo TJ (2017) Prognostic significance of preoperative anemia in patients under going surgery for renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Anticancer Res* 37:3175-3181

Machado K, Katz A, Buyse M, et al (2010) Sobrevida global e outros desfechos clínicos em câncer de mama: situação atual e controvérsias. *Rev Assoc Med Bras* 56:493-516

Rose PG, Java J, Whitney CW, et al (2015) Nomograms predicting progression-free survival, overall survival, and pelvic recurrence in locally advanced cervical cancer developed from an analysis of identifiable prognostic factors in patients from oncology/gynecologic oncology group randomized trials of chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 33:2136-2142

Azar M, Kazemi F, Jahanbakhshi A, et al (2017) Gamma knife radiosurgery for cavernous sinus meningiomas: analysis of outcome in 166 patients. *Stereotact Funct Neurosurg* 95:259-267

Nowak A, Dziedzic T, Krych P, et al (2015) Benign versus atypical meningiomas: risk factors predicting recurrence. *Polish J Neurol Neurosurg* 49:1-10

Mansouri A, Klironomos G, Taslime S, et al (2008). Surgically resected skull base meningiomas demonstrate a divergent post operative recurrence compared with non-skull base meningiomas. *J neurosurg* 125:431-440

Hua L, Zhu H, Li J, et al (2018) Prognostic value of estrogen receptor in WHO Grade III meningioma: a long-term follow-up study from a single institution. *J Neurosurg* 128:1698-1706

Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, et al (2004) The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer* 40:2293-2306

Vaupel P, Mayer A (2005) Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* 12:5-10

Gaspar BL, Sharma P, Das R (2015) Anemia in malignancies: pathogenetic and diagnostic considerations. *Hematology* 20:18-25

Subeikshanan V, Dutt A, Basu D, et al (2016) A prospective comparative clinical study of peripheral blood counts and indices in patients with primary brain tumors. *J Postgrad Med* 62:86-90

Chen JH, Zhai ET, Yuan YJ, et al (2017) Systemic immune-inflammation index for predicting prognosis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 23:6261-6272

Albini A, Bruno A, Noonan D, et al (2018) Contribution to tumor angiogenesis from innate immune cells within the tumor microenvironment: implications for immunotherapy. *Front Immunol* 9:527

Seigneur C, Phillipson M (2017) The multitasking neutrophils and their involvement in angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 24:3-8

Schernberg A, Mezquita L, Boros A, et al (2018) Neutrophilia as prognostic biomarker in locally advanced stage III lung cancer. *PLoS One* 13(10):e0204490

Wang DP, Kang K, Lin Q, et al (2019) Prognostic significance of preoperative systemic cellular inflammatory markers in gliomas: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Sci* 24:1-10

Zheng SH, Huang JL, Chen M et al (2018) Diagnostic value of preoperative inflammatory markers in patients with glioma: a multi center cohort study. *J Neurosurg* 129:583-592

Kayhan A, Korkmaz TS, Baran O et al (2018) Preoperative systemic inflammatory markers in different brain pathologies: an analysis of 140 patients. *Turk Neurosurg* 29:1-5

Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A et al (2017) Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol Cancer* 16:137

Du Z, Brewster R, Merrill PH, et al (2018) Meningioma transcription factors link cell lineage with systemic metabolic cues. *Neuro Oncol* 20:1331-1343

Polyzoidis Z, Koletsa T, Panagiotidou S et al (2015) Mast cells in meningiomas and brain inflammation. *J Neuroinflammation* 12:170

Ménétrier-Caux C, Ray-Coquard I, Blay JY, et al (2019) Lymphopenia in cancer patients and its effects on response to immunotherapy: an opportunity for combination with cytokines? *J Immunother Cancer* 7:85

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306

Caro JJ, Salas M, Ward A (2001) Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer. *Cancer* 91:2214-2221

Jiang H, Li H, Li A, et al (2016) Preoperative combined hemoglobin, albumin, lymphocyte and platelet levels predict survival in patients with locally advanced colorectal cancer. *Oncotarget* 7:72076-72083

Cho O, Chun M, Oh YT, et al (2017) Prognostic implication of simultaneous anemia and lymphopenia during concurrent chemo radiotherapy in cervical squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 39:1010428317733144

Forget P, Khalifa C, Defour JP, et al (2017) What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes* 10:12

Mei Z, Shi L, Wang B, et al (2017) Prognostic role of pretreatment blood neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced cancer survivors: a systematic review and meta-analysis of 66 cohort studies. *Cancer Treat Rev* 58:1-13.

Chowdhary M, Switchenko JM, Press RH, et al (2018) Post-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts for overall survival in brain metastases treated with stereotactic radiosurgery. *J Neurooncol* 139:689-697

Gorphe P, Bouhir S, Garcia GCTE, et al (2019) Anemia and neutrophil-to-lymphocyte ratio in laryngeal cancer treated with induction chemotherapy. *Laryngoscope* 00:1-7

Cata JP, Gutierrez C, Mehran RJ, et al (2016) Preoperative anemia, blood transfusion, and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Microenviron* 3:e1116

TABLES

TABLE 1

Characteristics	Total (%)	p-value	HR	IC 95%
Gender				
Male	27 (30.3%)		1	
Female	62 (69.7%)	0.22	1.85	0.6 – 5.0
Age				
>50 years	40 (44.9%)		1	
≤50 years	49 (55.2%)	0.78	1.13	0.4 – 2.7
WHO grade				
I	73 (82%)		1	
II	16 (18%)	0.27	1.77	0.6 – 5.0
Localization				
Peripheral	57 (64.3%)		1	
Central	32 (36.2%)	0.66	1.24	0.4 – 3.3
Extent of resection				
Complete	49 (55.1%)		1	
Parcial	40 (44.9%)	0.50	1.34	0.5 – 3.3
Anemia				
Absent	68 (76.4%)		1	
Present	21 (23.6%)	0.02*	3.4	1.1 – 10.1
Leukocytosis				
Absent	18 (25.7%)		1	
Present	52 (74.3%)	0.26	1.74	0.6 – 4.6
Neutrophilia				
Absent	51 (58.6%)		1	
Present	37 (42.3%)	0.04*	2.6	1.0 – 6.4
Lymphopenia				
Absent	67 (76.1%)		1	
Present	21 (23.9%)	0.77	1.17	0.3 – 3.5
Monocytosis				
Absent	75 (85.2%)		1	
Present	13 (14.8%)	0.65	0.71	0.1 – 3.1
RatioNL				
Median	4.12		1	
		0.02*	2.79	1.1 – 7.0

* p <0.05; HR: Hazard Ratio, IC: Confidence Interval

TABLE 2

Hematological parameters	p-value	HR	IC (95%)
Absent		1	
Present of anemia	0.490	2.12	0.2 – 18.0
Present of N/L>4,1	0.127	2.27	0.8 – 6.5
Present of anemia and N/L>4,1	0.003*	7.13	2.0 – 25.9

* p <0.05; HR: Hazard Ratio, IC: Confidence Interval

CAPTIONS

Table 1. Univariate analysis of clinical, tumor and hematological characteristics.

Table 2. Multivariate analysis of hematological parameters anemia and N/L>4.1 with tumor recurrence-regrowth.

FIGURES

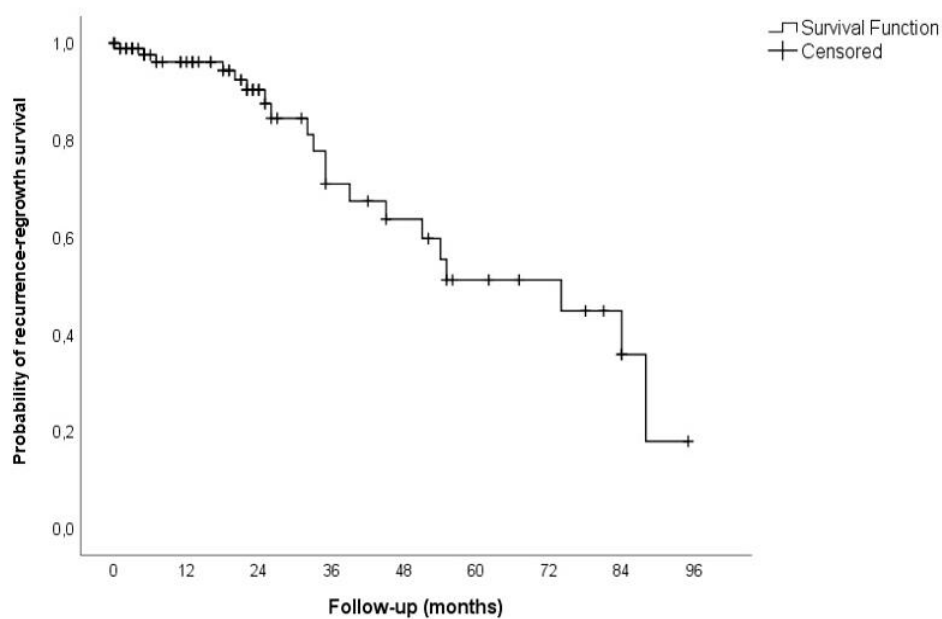


Fig. 1 Kaplan-Meier curve demonstrating recurrence-regrowth free survival rate in meningiomas

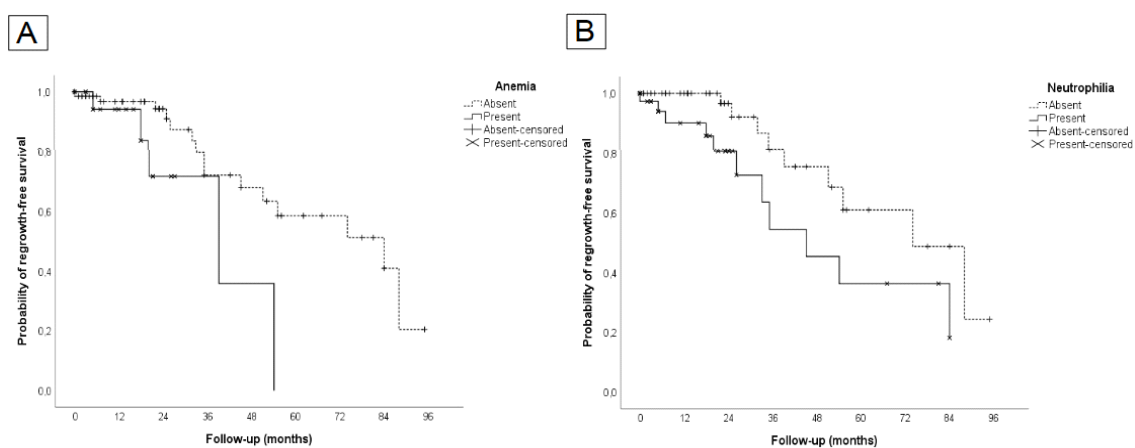


Fig. 2 Kaplan-Meier curve demonstrating recurrence-regrowth free survival in patients with (A) anemia and (B) neutrophilia

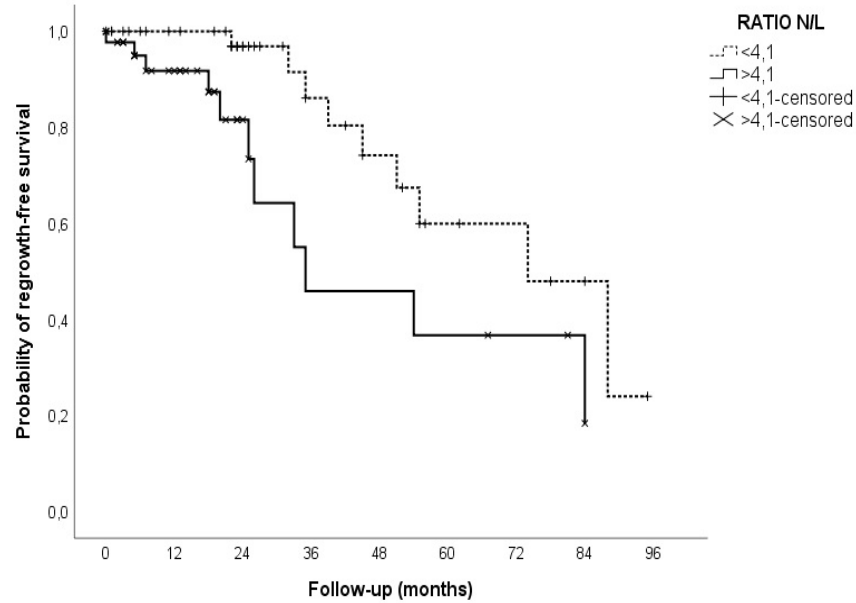


Fig 3. Kaplan-Meier curve demonstrating recurrence-regrowth free survival in patients with N/L and lower than the cutoff ($N/L > 4.1$ and $N/L < 4.1$)

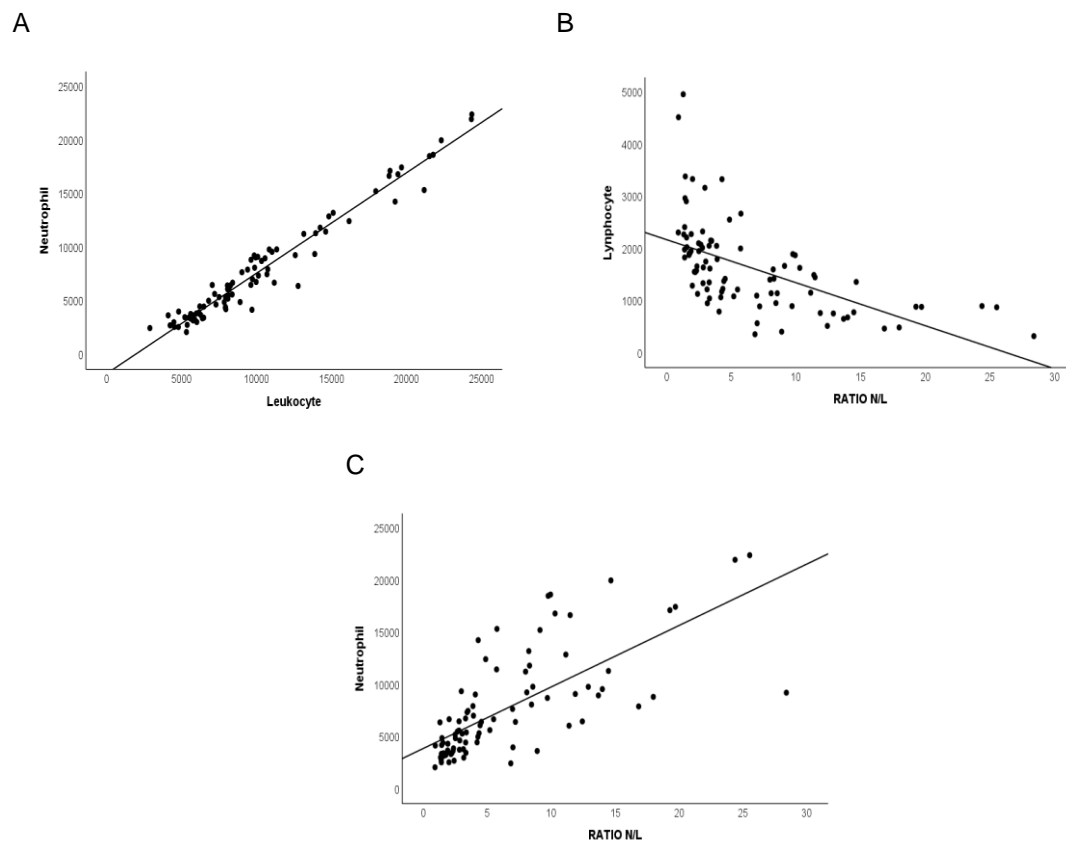


Fig. 4 Significant correlation between (A): neutrophils and leukocytes; (B): neutrophils and $N/L > 4.1$; (C): lymphocytes and $N/L > 4.1$

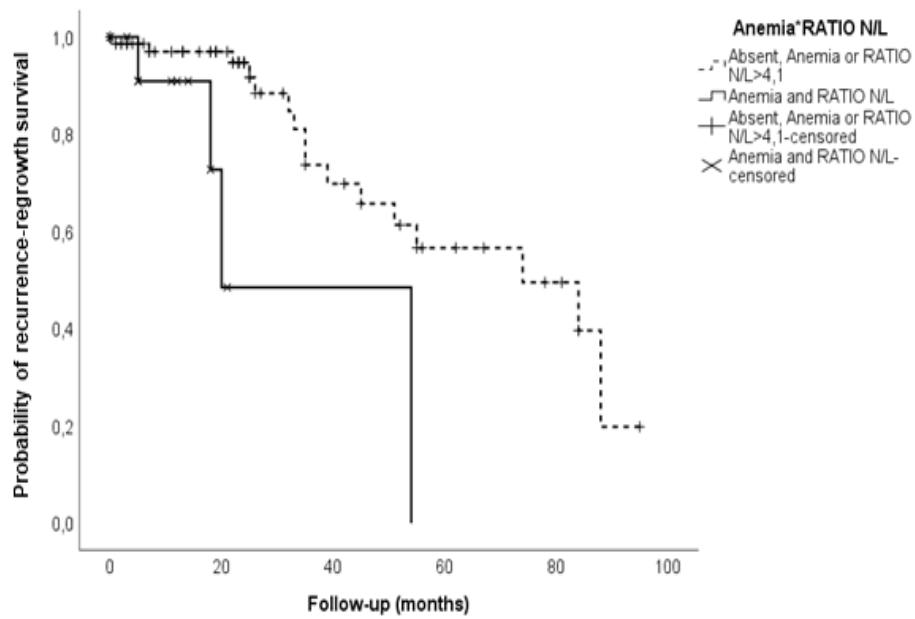


Fig. 5 Kaplan-Meier curve demonstrating recurrence-regrowth free survival rate and interaction between anemia and N/L > 4.1

7. ANEXOS

7.1. Parecer do Comitê de Ética da ISCMPA e UFCSPA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de alterações genômicas em meningiomas benignos, atípicos e anaplásicos associadas à tumorigênese.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51849515.3.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.446.130

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, estudo caso-controle, o qual será realizado com pacientes maiores de 18 anos consecutivos, internados no Hospital São José (ISCMPA), com diagnóstico pré-operatório de meningioma, confirmado no material anátomo-patológico pela técnica imuno-histoquímica. As amostras de sangue do grupo controle serão coletadas na UFCSPA, e as análises serão realizadas nos laboratórios de Patologia e Biologia Molecular da mesma universidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar associações entre polimorfismos (SNPs) ERCC4 (Ser835Ser, rs1799801), ERCC5 (Asp1104His, rs17655), MUTYH (Ser326Cys; rs3219466) e CCND1 (G870A, rs603965) na tumorigênese dos meningiomas.

Objetivos Específicos:

1. Estimar as frequências genotípicas dos SNPs selecionados nos genes ERCC4(Ser835Ser, rs1799801), ERCC5 (Asp1104His, rs17655), MUTYH (Ser326Cys; rs3219466) e CCND1 (G870A, rs603965) em pacientes com meningiomas e controles sadios através da técnica PCR em tempo real.

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.446.130

2. Avaliar a expressão proteica de ERCC4 (XPF), ERCC5 (XPG), MUTYH (MUY) e CCND1 (Ciclina D1) através de método imuno-histoquímico.
3. Associar os resultados obtidos com as técnicas PCR em tempo real e imunohistoquímica.
4. Relacionar os resultados encontrados a partir das técnicas realizadas (PCR em tempo real e imunohistoquímica) com as variáveis: idade, sexo, graduação anátomo-patológica, localização, tratamento e seguimento clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram identificados de forma distinta para os dois grupos de participantes: casos e controles, sendo que não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina pré e pós-operatória para a coleta dos materiais (sangue e tumor) do grupo caso, não havendo, portanto, riscos adicionais aos inerentes do procedimento cirúrgico. Já para o grupo controle, o risco descrito refere-se a coleta de sangue, hematoma e desconforto. Deste modo e conforme a Resolução Nº 466 de 12/12/12, foi apresentado pelo pesquisador manejo adequado para intervir em tais situações. Quanto aos benefícios, os participantes do estudo (casos e controles) não terão benefício direto, entretanto, a realização do mesmo se justifica pela possibilidade de contribuir com informações importantes para comunidade científica sobre os meningiomas, através de uma investigação mais detalhada e, por consequência, ajudando outros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo dos meningiomas será realizado por meio da técnica imuno-histoquímica (IHQ). A técnica de PCR em tempo real será utilizada para as análises moleculares das amostras de sangue coletadas. Identificamos critérios de exclusão/inclusão para os participantes (grupo caso e grupo controle); a amostragem será por conveniência, estima-se a análise de 150 casos confirmados de meningioma. O orçamento apresentado é compatível com o estudo, sendo que os custos serão subsidiados pela UFCSPA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificamos que os termos de apresentação obrigatória foram devidamente anexados à Plataforma Brasil e, de acordo com a Resolução Nº 466, de 12/12/12, não haverá dispensa do TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Verificamos que as alterações feitas no TCLE melhoraram os aspectos críticos sinalizados no parecer 1.382.053. Também foi apresentada justificativa para o fato de não haver termo de consentimento da chefia do serviço de neurocirurgia que, segundo a pesquisadora responsável, o

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.446.130

mesmo é "membro da pesquisa e está de pleno acordo".

Considerações Finais a critério do CEP:

Após a re-avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634297.pdf	22/01/2016 11:03:40		Aceito
Outros	justificativa_chefia_versao_1_1.pdf	22/01/2016 11:02:06	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_participantes_versao_1_1.pdf	22/01/2016 10:59:53	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_versao_1_1.pdf	22/01/2016 10:59:20	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:44:49	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Formulario_de_inscricao_de_projeto_de_pesquisa.pdf	07/12/2015 10:56:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL.pdf	06/12/2015 13:25:05	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.446.130

Cronograma	Cronograma.pdf	06/12/2015 13:22:17	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Convite_projeto.pdf	27/11/2015 13:27:51	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	FICHA_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:27:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_utilizaca o_de_dados_e_prontuarios.pdf	27/11/2015 13:26:45	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_e_publicacao_de_d ados.pdf	27/11/2015 13:24:02	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Uso_de_dados_e_mate riais.pdf	27/11/2015 13:23:35	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Isencao_de_onus_a_ins tituicao.pdf	27/11/2015 13:23:02	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Confidencialidade_do_s ujeito_no_estudo.pdf	27/11/2015 13:22:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_entrega _de_relatorio_semetral_ou_final.pdf	27/11/2015 13:20:50	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_pato.pdf	27/11/2015 13:19:37	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_biomol.pdf	27/11/2015 13:19:09	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Analise_de_alteracoes_genomic as_em_meningiomas_benignos_atipicos _e_anaplasticos_assocaiadas_a_tumorig enese.pdf	27/11/2015 13:13:26	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escl arecido_pacientes.pdf	27/11/2015 13:12:05	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escl arecido_controles.pdf	27/11/2015 13:11:55	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	27/11/2015 13:10:09	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.446.130

PORTO ALEGRE, 10 de Março de 2016

Assinado por:
Carlos Henrique Munhoz Olea
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de alterações genômicas em meningiomas benignos, atípicos e anaplásicos associadas à tumorigênese.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51849515.3.3001.5345

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.509.852

Apresentação do Projeto:

Meningiomas são tumores de comportamento benigno, porém recorrentes. São neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC), correspondendo a 36% dos tumores intracranianos. Estes tumores apresentam incidência crescente, correspondente a idade, sendo mais frequentes entre a sexta e sétima décadas de vida, com predominância no sexo feminino. Habitualmente, os meningiomas apresentam crescimento lento e causam poucos sintomas, principalmente quando estas neoplasias se encontram em estágio inicial. Desta forma, os meningiomas são diagnosticados em estágios avançados e com tamanho significativamente grande, capazes de comprimir estruturas cerebrais importantes e causar sinais e sintomas. Em células normais, os danos ocorridos no DNA são reconhecidos por mecanismos celulares e, uma das principais respostas para evitar a propagação de erros e, conseqüentemente, o crescimento de tumores é o reparo do DNA. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP single nucleotide polymorphism) são considerados as principais variações encontradas no genoma humano. Os SNPs podem ocorrer em seqüências genéticas codificadoras, resultando em proteínas com atividade irregular. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo pode aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores, uma vez que, alterações nas funções proteicas são capazes de desregular o equilíbrio (homeostase) celular. Os genes ERCC4, ERCC5, MUTYH e ciclina-D1 foram associados ao aumento

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.509.852

no risco da ocorrência dos meningiomas, em virtude de sua ação nos mecanismos de reparo do DNA e de regulação do ciclo celular. Mais estudos são necessários, uma vez que, os resultados encontrados são inconclusivos e a patogênese deste tumor permanece não esclarecida.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar associações entre polimorfismos (SNPs) ERCC4 (Ser835Ser, rs1799801), ERCC5 (Asp1104His, rs17655), MUTYH (Ser326Cys; rs3219466) e CCND1 (G870A, rs603965) na tumorigênese dos meningiomas. Objetivo Secundário: Estimar as frequências genotípicas dos SNPs selecionados nos genes ERCC4 (Ser835Ser, rs1799801), ERCC5 (Asp1104His, rs17655), MUTYH (Ser326Cys; rs3219466) e CCND1 (G870A, rs603965) em pacientes com meningiomas e controles sadios através da técnica PCR em tempo real. 2. Avaliar a expressão proteica de ERCC4 (XPF), ERCC5 (XPG), MUTYH (MUY) e CCND1 (Ciclina D1) através de método imuno-histoquímico. 3. Associar os resultados obtidos com as técnicas PCR em tempo real e imuno-histoquímica. 4. Relacionar os resultados encontrados a partir das técnicas realizadas (PCR em tempo real e imuno-histoquímica) com as variáveis: idade, sexo, graduação anátomo-patológica, localização, tratamento e seguimento clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos: Pacientes: Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos.

Controles: A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do voluntário. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tontura durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, você será orientado a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar. **Benefícios:** Ao participar desta pesquisa o voluntário não terá benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os meningiomas, proporcionando uma investigação mais detalhada e ajudando mais pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto já aprovado no CEP da Santa Casa, bem embasado e adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos ok

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 1.509.852

Recomendações:

aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências ou inadequações

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634297.pdf	22/01/2016 11:03:40		Aceito
Outros	justificativa_chefia_versao_1_1.pdf	22/01/2016 11:02:06	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_participantes_versao_1_1.pdf	22/01/2016 10:59:53	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_versao_1_1.pdf	22/01/2016 10:59:20	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634297.pdf	09/12/2015 09:46:03		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:44:49	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Formulario_de_inscricao_de_projeto_de_pesquisa.pdf	07/12/2015 10:56:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL.pdf	06/12/2015 13:25:05	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	06/12/2015 13:22:17	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Convite_projeto.pdf	27/11/2015 13:27:51	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	FICHA_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:27:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_utilizacao_de_dados_e_prontuarios.pdf	27/11/2015 13:26:45	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_e_publicacao_de_dados.pdf	27/11/2015 13:24:02	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Uso_de_dados_e_materiais.pdf	27/11/2015 13:23:35	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 1.509.852

Outros	Declaracao_de_Isencao_de_onus_a_instituicao.pdf	27/11/2015 13:23:02	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Confidencialidade_do_sujeito_no_estudo.pdf	27/11/2015 13:22:29	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_entrega_de_relatorio_semetral_ou_final.pdf	27/11/2015 13:20:50	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_pato.pdf	27/11/2015 13:19:37	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_biomol.pdf	27/11/2015 13:19:09	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Analise_de_alteracoes_genomicas_em_meningiomas_benignos_atipicos_e_anaplasicos_associaadas_a_tumorigenese.pdf	27/11/2015 13:13:26	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_pacientes.pdf	27/11/2015 13:12:05	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_controles.pdf	27/11/2015 13:11:55	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	27/11/2015 13:10:09	Camila Batista de Oliveira Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Abril de 2016

Assinado por:
Airton Tetelbom Stein
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

7.2. Termo de Consentimento livre e esclarecido

Análise de alterações genômicas em meningiomas benignos, atípicos e anaplásicos associadas à tumorigênese (Versão 26/11/2015)

(Nome completo do PACIENTE – preencher em letra de forma)

Os meningiomas são tumores benignos que ocorrem nas meninges do cérebro, com alta taxa de recorrência. Desta forma, torna-se importante avaliar a tumorigênese (origem) e progressão deste tumor.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **Análise de alterações genômicas em meningiomas benignos, atípicos e anaplásicos associadas à tumorigênese**, que objetiva ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos relacionados à evolução deste tipo de tumor.

No dia anterior à cirurgia, serão coletadas amostras de sangue como procedimento de rotina, será separada uma parte de 4ml para esta pesquisa. Este material será encaminhado ao laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre para análises. O material retirado durante a cirurgia (o tumor) será encaminhado ao laboratório de patologia do hospital para identificação do tipo de tumor (procedimento de rotina), após este procedimento, o material será utilizado para o presente estudo, a análise será realizada no laboratório de patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Os dados clínicos serão obtidos através dos prontuários médicos.

Ao participar desta pesquisa o voluntário não terá benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os meningiomas, proporcionando uma investigação mais detalhada e ajudando mais pacientes.

Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos.

É garantido que todo o material coletado será analisado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre não gerando ônus ao paciente e à Santa Casa. Os gastos para a realização da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo e você não receberá nenhuma compensação financeira por participar.

É dada à liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa, sem que isso traga prejuízos. Ressaltamos que a concordância ou não em participar desse estudo não implica em qualquer modificação no tratamento médico já estabelecido, visto que se trata de uma participação voluntária.

É dada a garantia da não identificação do paciente e de ser mantido o caráter confidencial das informações em todas as etapas da pesquisa. Os dados serão utilizados apenas pela equipe da pesquisa e autoridades regulatórias da área da saúde. É assumido o compromisso de fornecer ao paciente informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade em continuar participando.

Para casos de eventos adversos ou dúvidas referentes à pesquisa deve ser contatada a Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima (investigador principal) pelo telefone (51) 3303.8779. Para questões sobre a pesquisa e

sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa deve ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação Dr. Carlos Olea, pelo telefone 3214.8571 ou pelo e-mail: cep@santacasa.tche.br e/ou o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pelo telefone (51) 3303-8804.

Estou ciente que não serão violados os segredos profissionais obtidos durante a pesquisa e autorizo a utilização do material coletado para futuras pesquisas. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima. A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização ao coordenador do estudo, aos Comitês de Ética do hospital e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, e à organização governamental de saúde para utilização dos dados obtidos quando necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma)

Data: __/__/____

Assinatura do Sujeito de Pesquisa

Nome do Pesquisador (letra de forma)

Data: __/__/____

Assinatura e Carimbo do Pesquisador

7.3. Protocolo de execução da técnica de imuno-histoquímica

TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

1- PREPARO DO BLOCO:

- Corte do bloco parafinado com espessura de 4 µm, com micrótomo.
- Fixar o corte em lâminas com organossilano.

2- DESPARAFINIZAR:

- Em estufa em aproximadamente 70°C por 30 minutos, mergulhar as lâminas em xilol por 5 minutos; em álcool absoluto (4x), esperar 5 minutos no último álcool para retirar o xilol e lavar em água destilada.

3- RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA:

- Colocar as lâminas em cubetas de plástico contendo solução de citrato de sódio (pH 6,0) ou Tris-EDTA (Tabela 1) e aquecer até a fervura (micro-ondas).
- Banho-maria (aproximadamente 98°C) por 40 minutos. Retirar e esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente.
- Lavagem das lâminas (3x) com PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7), em agitação. Descartar o PBS após o processo.

4- BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA:

- Colocar as lâminas em solução 5% de peróxido de hidrogênio (30 volumes), utilizando metanol como diluente da solução. Procedimento deve ser realizado na ausência de luz por 10 minutos (repetir por 2x).

- Lavar as lâminas em água destilada e duas vezes em PBS, por 5 minutos em agitação. Descartar o PBS após o processo.

5- BLOQUEIO DAS LIGAÇÕES INESPECÍFICAS:

- Repouso das lâminas, por no mínimo de 1 hora, em solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) diluída em PBS.

- Lavar as lâminas (3x) em PBS, em agitação, por 5 minutos.

- Retirar da solução PBS e secar o excesso ao redor do tecido. Usar caneta hidrofóbica para circundar o tecido, a fim de concentrar o anticorpo na região marcada.

6- INCUBAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Diluir o anticorpo, conforme os testes realizados (Tabela 1) e aplicar sobre o tecido. Deixar por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida e armazenar em geladeira durante a noite (*overnight*).

- Lavar as lâminas (3x) em PBS, em agitação, por 5 minutos.

7- INCUBAÇÃO COM ANTICORPO SECUNDÁRIO BIOTINILADO:

- Aplicar o anticorpo secundário (Vector Laboratories®) no tecido. Deixar por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente.

- Lavar as lâminas (3x) em PBS, em agitação, por 5 minutos.

- Aplicar o anticorpo polimerizado com peroxidase no tecido. Deixar agir por 40 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.

- Lavar as lâminas (3x) em PBS, em agitação, por 5 minutos.

8- REVELAÇÃO COM SUBSTRATO CROMÓGENO (DAB):

- Preparar o cromógeno DAB (diaminobenzidina) (1 ml de diluente e 1 gota de DAB) e aplicar sobre o tecido. Deixar agir por 5 minutos, protegido da luz. Lavar com água destilada após o processo.

9- CONTRA-COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA:

- Contra-coloração com Hematoxilina por 30 segundos. Lavar em água corrente.

10- DESIDRATAR:

Lavar as lâminas (4x) em álcool absoluto. No último álcool, deixar 5 minutos.

Lavar as lâminas (2x) em xilol e deixar agir por 5 minutos, cada processo.

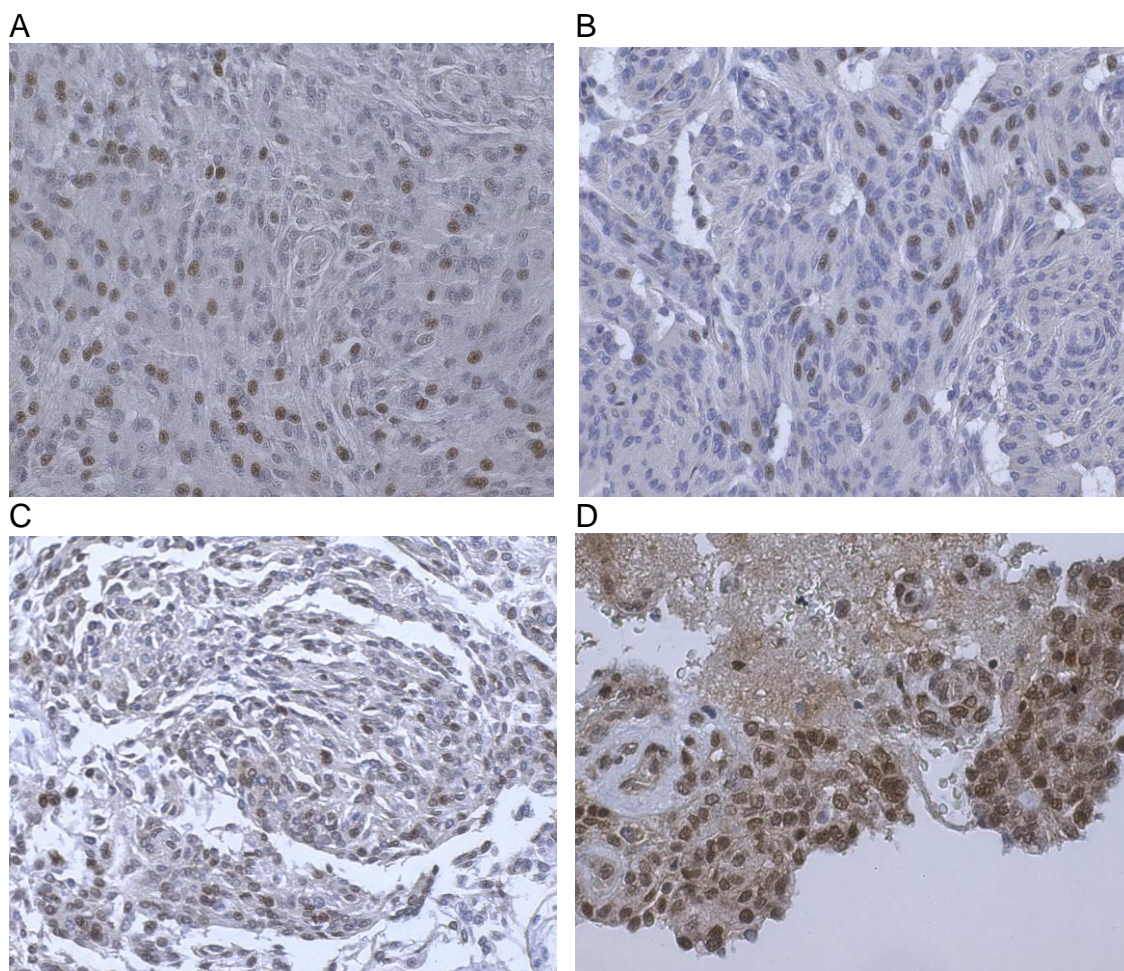
11- MONTAR COM ENTELLAN®:

Uma gota de Entellan® (cola especial para técnica) e aplicar lamínula sobre o tecido. Evitar a formação de bolhas. Após secar, observar em microscópio óptico.

Tabela 1. Anticorpos, diluições, recuperação antigênica e controles utilizados

Anticorpo (marca)	Diluições	Recuperação	Controle positivo
MUTYH (Abcam®)	1:100	Tris-EDTA	CA de pulmão
Ciclina D1 (Abcam®)	1:100	Citrato de sódio	CA de mama
XPG (Abcam®)	1:200	Tris-EDTA	CA de ovário
XPF (Abcam®)	1:200	Tris-EDTA	Tonsila

7.3.1 Expressão dos marcadores em meningiomas utilizando a técnica de imuno-histoquímica



(A) Ciclina D1, (B) MUTYH, (C) XPF e (D) XPG; marcação nuclear em aumento de 40x

7.4. Certificado de participação na XI Jornada da Patologia da UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que **Camila Batista de Oliveira Silva** participou da "*XI Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia*", nos dias 21 e 22 de agosto de 2017, na cidade de Porto Alegre-RS, realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 29 de setembro de 2017.

Maristela Paesin
Secretária Executiva
Pós-Graduação-UFCSPA

7.5. Certificado de participação na XII Jornada da Patologia da UFCSPA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

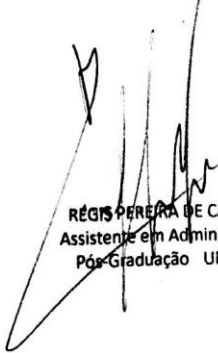
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CERTIFICADO


Certificamos, para os devidos fins, que **Camila Batista de Oliveira Silva** participou da "*XII Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia*", nos dias 12 e 13 de agosto de 2019, na cidade de Porto Alegre-RS, realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 27 de agosto de 2019




RÉGIS PEREIRA DE CASTRO
Assistente em Administração
Pós-Graduação UFCSPA

7.6. Certificado de apresentação na III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

CERTIFICADO




Certificamos que


BRUNA ARAUJO

apresentou o trabalho intitulado "ANÁLISES DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM MENINGIOMAS BENIGNOS, ATÍPICOS E ANAPLÁSICOS ASSOCIADAS À TUMORIGÊNESE", de autoria de BRUNA ARAUJO, CAMILA BATISTA DE OLIVEIRA SILVA, BÁRBARA ROBERTA ONGARATTI, GERALDINE TROTT, JÚLIA FERNANDA SEMMELMANN PEREIRA-LIMA, NELSON PIRES FERREIRA, MIRIAM DA COSTA OLIVEIRA, CAROLINA GARCIA SOARES LEÃES, na categoria Pesquisa da III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ocorrida de 26 a 28 de setembro de 2017 na cidade de Porto Alegre - RS, sendo reconhecido como **DESTAQUE DE SESSÃO**.

Porto Alegre, 28 de setembro de 2017.



Profª Alethéa Gatto Barschak
Coordenadora da Comissão Organizadora da III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA



7.7. Certificado de apresentação no Congresso UFCSPA Conectando Saúde e Sociedade

