



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

---

**Maria Clara Jessica Calastri**

**Fatores Genéticos Relacionados ao Ciclo Celular,  
Sinalização Intracelular e Angiogênese e Perfil  
Clínico/Radiológico em Pacientes com Gliomas**

**São José do Rio Preto**

**2016**

**Maria Clara Jessica Calastri**

**Fatores Genéticos Relacionados ao Ciclo Celular,  
Sinalização Intracelular e Angiogênese e Perfil  
Clínico/Radiológico em Pacientes com Gliomas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para Obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

**Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**

**São José do Rio Preto  
2016**

Calastri, Maria Clara Jessica

Fatores Genéticos Relacionados ao Ciclo Celular, Sinalização Intracelular e Angiogênese e Perfil Clínico/Radiológico em Pacientes com Gliomas

São José do Rio Preto, 2016

137p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. Polimorfismos; 2. Glioma; 3. Sistema Nervoso Central; 4. Genes EGFR; 5. Ciclina D1.

**Maria Clara Jessica Calastri**

**Fatores Genéticos Relacionados ao Ciclo Celular,  
Sinalização Intracelular e Angiogênese  
e Perfil Clínico/Radiológico  
em Pacientes com Gliomas**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**

**2º Examinador: Prof. Dr. José Roberto Lopes Filho Ferraz**

**3º Examinador: Profa. Dra. Marcela Augusta de Souza Pinhel**

**Suplentes: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva**

**Prof. Dr. Antonio Soares Souza**

**São José do Rio Preto, 22 de novembro de 2016.**

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	V
Agradecimentos Especiais.....	VII
Epígrafe .....	XII
Lista de Figuras .....	XIV
Lista de Quadros.....	XVIII
Lista de Tabelas .....	XX
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	XXIII
Resumo .....	XXVII
Abstract .....	XXX
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Considerações Gerais .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tipos de Gliomas .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Carcinogênese de Gliomas .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Aspectos Genéticos .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Diagnóstico e Tratamento de Gliomas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Casuística e Métodos .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Casuística.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Extração de DNA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.2 Extração de DNA em Tecido Parafinado .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3 Genotipagem por PCR em Tempo Real .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.4 Avaliação por Ressonância Magnética, Perfusão e Espectroscopia .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.5 Perfil clínico e Hábitos de Vida .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Análise Estatística.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Perfil da Casuística.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades.....</b>	<b>38</b>

<b>3.4 Relação entre Polimorfismos Genéticos e Histopatologia.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Análise do Perfil Anatomorfológico/funcional.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6 Análise de Regressão Logística.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7 Análise de Sobrevida .....</b>	<b>51</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>68</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo I - Termo de Consentimento .....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo II - Parecer do Comitê de Ética .....</b>	<b>91</b>
<b>Apêndice I – Artigo a ser submetido para a Revista Medical Oncology.....</b>	<b>93</b>

## *Dedicatória*

## **DEDICATÓRIA**

### **Dedico este trabalho**

Aos meus pais, Pedro e Maria, que com toda simplicidade, mas com muita sabedoria e amor guiaram meus passos para chegar até aqui. Vocês são meu alicerce sem os quais eu não seria absolutamente nada. A minha irmã Maria Carolina, que amo muito, por todo companheirismo. Ao meu noivo Thiago, muito obrigada por toda paciência, ensinamentos e pelo amor incondicional a mim devotado. Meu eterno amor. Amo vocês!



## *Agradecimentos Especiais*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me proporcionar momentos inesquecíveis ao lado de pessoas maravilhosas, que puderam me ensinar durante este tempo diversas coisas, dentre elas, a nunca desistir por mais difícil que seja o caminho, ter forças para seguir em frente sem se importar com o eu que poderia encontrar.

À minha querida mãe, que sempre me deu total apoio, me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos, ser forte e enfrentar meus medos. Com seu jeito humilde, me ensinou o que é o significado de gratidão, compaixão e principalmente ter respeito ao próximo. Te amo!.

Ao meu pai por todo aprendizado e ensinamento, hoje sou o que sou graças a você. Agradeço por me ensinar o que é GENEROSIDADE!

À minha irmã Maria Carolina “Carol” como gosta de ser chamada, obrigada por toda paciência, sei que não foi fácil. Sempre do meu lado, minha companheira! Te amo.

Ao meu noivo e grande companheiro, que sempre esteve ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por me apoiar em tudo e me ensinar o que é amar! Não tenho palavras para descrever a tamanha gratidão que sinto por você. Amo você!

Ao meu Tio Antonio dos Santos Calastri, pelo incentivo e força. Infelizmente você não está mais entre nós, mas tenho certeza que está torcendo por mim, onde estiver! Saudades.

Aos meus sogros Rosana Negrão e Salvador Negrão e ao meu cunhado Gustavo Negrão, pela paciência, tolerância, carinho e amor. Agradeço pelo lar acolhedor. Amo vocês.

Ao Antonio da Fonseca Catarucce, meu querido afilhado! Amor incondicional.

Aos meus filhos de quatro patas Lilica, Bobi e July, agradeço pelo amor incondicional, alegria e companhia durante os estudos.

Gostaria de agradecer a minha querida orientadora Profa. Dra. Dorotéia, pelos ensinamentos e credibilidade. Agradeço por acreditar em mim, e nunca me deixar desistir! Uma pessoa maravilhosa cheia de luz, com uma imensa bondade. Minha sincera admiração e amor!

Querida Dorotéia:

*Que tua bondade seja como teu perfume: que todos sintam que estivestes ali, ainda que já tenhas ido embora.*

*Lidia Vasconcelos*

À minha querida amiga /irmã Sabrina Mayara Cezario! Que sempre me apoiou desde o começo, obrigada pelo companheirismo, amizade e todo ensinamento. Amo você.

Às minhas queridas eternas amigas Graciele Tenani, Tayanne do Carmo, Days de Oliveira Andrade e Denise Poltronieri Martins que sempre me ajudaram em tudo! Obrigado pelo carinho, amizade e as “brincadeiras”.

Gostaria de agradecer a Marcela Pinhel, que me apoiou desde o começo, sempre atenciosa com um coração enorme. Mesmo de longe, sempre nos ajudando. Te adoro! Saudades.

À minha amiga Michele Gregório parceira de trabalho e o (príncipe Enzo), que neste caminho me ensinou novos conhecimentos. Admiro sua força, você é uma pessoa muito especial!

À toda equipe no NPBIM: Milton Pires, Angélica Lopes, Victor Lima, Thiago Baitelo, Beatriz Brait e Simone Lima grandes amigos! Obrigada por toda ajuda, minha segunda família.

Ao meu grande amigo Rafael Fernandes Ferreira, pela paciência e todos os ensinamentos. Obrigada pela confiança e carinho nesta jornada.

À Joyce Martins Ferraz por toda ajuda desde o início deste projeto, pela amizade e por todos os ensinamentos que me proporcionou.

À Camila Oliveira Brancati que sempre me ajudou em todas as horas, obrigada por me ensinar coisas novas todos os dias! Você é uma pessoa muito especial.

Ao laboratório LITEX: Heloisa Caldas, Greiciane Florim, Camila Mazeti e Glória Mendes, pessoas maravilhosas, que abriram as portas para que pudesse realizar meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy pela disposição em explicar os testes estatísticos e na análise dos meus dados. Obrigada por todos os ensinamentos, pela alegria e pela energia positiva que transmite sempre.

Aos alunos de iniciação científica Gabriela Hatori e Nicolas Toledo. Agradeço pela oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

À equipe de patologia do Hospital de Base a Dra. Eliane Zanovelo e o Dr. Dalísio Neto, pela colaboração neste estudo.

À toda equipe de radiologia do Hospital de Base: Dr. José Roberto Lopes Ferraz Filho, Dr. Antonio Pondé Junior a recepcionista Talita, as enfermeiras Sueli e Audria pela ajuda e paciência, e por me proporcionar novos conhecimentos.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e Hospital de Base - HB e seus dirigentes, pela cooperação e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo o suporte necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Rio Preto (FAPERP) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante meu mestrado na FAMERP, àqueles que a mim dedicaram seu tempo, amizade e ajuda, pelos conselhos que me engrandeceram, pelo carinho e apoio que me ajudaram a crescer e a entender melhor o mundo da ciência. Muito Obrigada a todos que de alguma forma vivenciaram comigo minha vida acadêmica na FAMERP.

*Epigrafe*

**Epígrafe**

*“O sucesso é uma questão de vontade, ação e dedicação”.*

*(Autor desconhecido)*

## *Lista de Figuras*



**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Desenvolvimento de glioblastomas primários e secundários. **4**
- Figura 2.** Possíveis relações para a produção das células de propagação dos tumores cerebrais e a geração do glioblastoma multiforme (GBM). Durante a diferenciação normal do sistema nervoso central, as células tronco neurais irão se diferenciar em células progenitoras neurais/gliais. Estas células têm a capacidade de produzir oligodendrócitos e/ou os astrócitos, mas não ambos. As mutações que geram GBM podem ocorrer em todos os níveis dentro desta linhagem e produzir células iniciadoras de tumor. **6**
- Figura 3.** Ressonância Magnética (RM) encéfalo (axial flair A e B) e (axial e coronal T1 pós-contraste C e D) evidenciou lesão infiltrativa hiperintensa na ponderação T2 na região temporal esquerda, que não apresenta realce pelo contraste paramagnético endovenoso (EV). Perfusão por RM (E) evidenciou hipoperfusão na lesão (perfusão fria). Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato. **13**
- Figura 4.** Ressonância Magnética (RM) encéfalo (axial flair A e B) e (axial e coronal T1 pós-contraste C e D) evidenciou lesão infiltrativo hiperintensa na ponderação T2 na região fronto parietal esquerda, com discreto realce pelo contraste paramagnético endovenoso. Perfusão por RM (E) evidenciou hiperperfusão na lesão (perfusão quente). Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato. **14**
- Figura 5.** Ressonância Magnética (RM) encéfalo (axial flair A e B) e (axial e sagital pós-contraste C e D) evidenciou lesão nodular com necrose central e realce periférico pelo contraste paramagnético endovenoso, localizado na região frontal direita. **14**

Perfusão por RM (E) evidenciou hiperperfusão na lesão (perfusão quente). A Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato.

- Figura 6.** Padrão de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, mostrando genótipo homozigoto selvagem, representado pela amplificação do alelo específico marcado com agente fluorescente (FAM) em azul. **25**
- Figura 7.** Padrão de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, mostrando genótipo heterozigoto com amplificação de ambos os alelos específicos marcados com agente fluorescente (FAM) e agente fluorescente (VIC). **25**
- Figura 8.** Padrão de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, mostrando genótipo homozigoto mutante, representado pela amplificação do alelo específico marcado pelo agente fluorescente (VIC) em verde. **26**
- Figura 9.** Curva atuarial de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livres de evento/óbito) em pacientes com gliomas. A) Análise de acordo com a gravidade da doença. B) Grupo total, independente da gravidade da doença. GI= grau I; GII= grau II; GIII= grau III; GIV= grau IV; Teste Log Rank. **52**
- Figura 10.** Curva de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livre de evento/óbito) em pacientes com gliomas, relacionados aos genótipos: A) CCND1 (*cyclin D1*) = genótipo GG e AG/AA; B) XRCC1 (*X-ray repair cross complementing group 1*) = genótipo TT e TC/CC; C) RTEL1 (*regulator of telomere elongation helicase 1*) = genótipo AG; D) EGFR (*epidermal growth factor receptor*) = genótipo TT e TC e E) VEGF (*vascular endothelial growth factor*) = genótipo GG e GC/CC; Teste Log Rank. **53**
- Figura 11.** Curva de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livre de **54**

evento/ óbito) em pacientes com gliomas que receberam tratamento com Temozolamida (TMZ) e radioterapia; Teste Log Rank.

## *Lista de Quadros*

**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 1.** Classificação de gliomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde. A incidência e a faixa etária são descritas consoante o subtipo glial. **3**
- Quadro 2.** Caracterização da amostra de acordo com os subtipos histológicos referente a Organização Mundial da Saúde (Louis 2007). **18**
- Quadro 3.** Primers, etapas de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, polimorfismos *XRCC1*-rs25487, *CCND1*-rs9344, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963. **24**

## *Lista de Tabelas*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição de comorbidades e hábitos de vida em pacientes com gliomas (GE) e indivíduos sem sinais da doença (grupo controle – GC).	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>CCND1</i> - rs9344 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>33</b>
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>XRCC1</i> - rs25487 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>34</b>
<b>Tabela 4.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>RTEL1</i> - rs6010620 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>35</b>
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>EGFR</i> - rs1468727 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>36</b>
<b>Tabela 6.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>VEGF</i> - rs2010963 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>37</b>
<b>Tabela 7.</b>	Frequência de tabagismo de acordo com os genótipos de <i>CCND1</i> -rs9344, <i>XRCC1</i> -rs25487, <i>RTEL1</i> -rs6010620, <i>EGFR</i> -rs1468727 e <i>VEGF</i> -rs2010963 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>39</b>
<b>Tabela 8.</b>	Frequência de etilismo de acordo com os genótipos de <i>CCND1</i> -rs9344, <i>XRCC1</i> -rs25487, <i>RTEL1</i> -rs6010620, <i>EGFR</i> -rs1468727 e <i>VEGF</i> -rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>40</b>
<b>Tabela 9.</b>	Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) de acordo com os genótipos de <i>CCND1</i> -rs9344, <i>XRCC1</i> -rs25487, <i>RTEL1</i> -	<b>42</b>

rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).

- Tabela 10.** Frequência de diabetes mellitus (DM) de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC). **43**
- Tabela 11.** Distribuição de pacientes com glioma (GE) e controles (GC) considerando índice de massa corporal (IMC: eutrofia -  $<24,99\text{kg/m}^2$  e sobrepeso ou obesidade -  $\geq 25\text{kg/m}^2$ ) e genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963. **44**
- Tabela 12.** Frequência dos graus histológicos de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344; *XRCC1*-rs25487; *RTEL1*-rs6010620; *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963 em pacientes com gliomas. **46**
- Tabela 13.** Análise do perfil anatomorfológico/funcional por ressonância magnética em pacientes com glioma. **48**
- Tabela 14.** Análise de regressão logística considerando hábitos de vida e comorbidades, além dos genótipos de risco dos polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF* em pacientes com gliomas e indivíduos sem a doença. **50**



## *Lista de Abreviaturas e Símbolos*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>/</b>	Por
<b>&lt;</b>	Menor
<b>&gt;</b>	Maior
<b>≥</b>	Maior ou Igual
<b>±</b>	Mais ou Menos
<b>I</b>	Grau histológico do tumor Grau I
<b>II</b>	Grau histológico do tumor Grau II
<b>III</b>	Grau histológico do tumor Grau III
<b>IV</b>	Grau histológico do tumor Grau IV
<b>μL</b>	Microlitro
<b>ABESO</b>	Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
<b>Arg</b>	Argentina
<b>CBV</b>	Volume Sanguíneo Cecebral
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>CCND1</b>	<i>Cyclin D1</i>
<b>Co</b>	Colina
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<b>DEPC</b>	Água ultrapura
<b>DL</b>	Desequilíbrio de ligação
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>ERM</b>	Espectroscopia por ressonância magnética
<b>EHW</b>	Equilíbrio de Hardy Weinberg
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>FFPE</b>	Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina
<b>Fem</b>	Sexo feminino
<b>G</b>	Gramas

<b>GC</b>	Grupo controle
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>G1-S</b>	Fase G1 para Fase S do ciclo celular
<b>GE</b>	Grupo de estudo
<b>Gln</b>	Glicina
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>HB/FAMERP</b>	Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>HW</b>	Hardy Weinberg
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>Kg/m<sup>2</sup></b>	Quilograma por metro quadrado
<b>Mas</b>	Sexo masculino
<b>Mg/mL</b>	Miligramma por mililitro
<b>MiliQ</b>	Água deionizada
<b>MGMT</b>	Metilação do gene MGMT (o6-metilguanina-dna-metiltransferase)
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mmHg</b>	Mililitros de mercúreo
<b>Mmol/L</b>	Milimol por litro
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos
<b>N</b>	Números de indivíduos
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RTEL1</b>	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>

<b>S</b>	Segundos
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TMZ</b>	Temozolamida
<b>U/<math>\mu</math>L</b>	Unidade por microlitro
<b>V</b>	Volts
<b>VEGF-A</b>	<i>Fator de crescimento endotelial vascular A</i>
<b>VEGFR</b>	Receptor de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)
<b>X<sup>2</sup></b>	Teste Qui-quadrado
<b><i>XRCC1</i></b>	<i>X-ray repair cross complementing group 1</i>



## RESUMO

**Introdução** – Gliomas destacam-se como os tumores malignos mais agressivos do sistema nervoso central. A identificação de genes candidatos a biomarcadores contribui para esclarecer a fisiopatologia dos gliomas e auxiliar no diagnóstico precoce da doença, além de novas intervenções terapêuticas. **Objetivos** - Avaliar a associação de variantes genéticas relacionadas à regulação do ciclo celular (*CCND1*), reparo (*XRCCI*) e integridade do DNA (*RTEL1*), sinalização intracelular (*EGFR*), e angiogênese (*VEGF*) com gliomas, além do perfil anato-morfológico/funcional e resposta ao tratamento. **Casuística e Métodos** – Foram estudados 303 indivíduos, sendo 100 com gliomas (GE=Grupo de Estudo), independente do grau de malignidade e 203 controles (GC=Grupo Controle) para análise dos polimorfismos *CCND1*-rs9344, *XRCCI*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963. As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real (TaqMan *SNP Genotyping*). Perfil anato-morfológico/funcional foi obtido por ressonância magnética, enquanto dados clínicos, hábitos de vida e comorbidades em prontuário médico e questionário. Admitiu-se erro  $\alpha$  de 5%. **Resultados** - Tabagismo, etilismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) prevaleceram nos pacientes, comparado aos controles ( $P < 0,05$ ). Destacaram-se em ambos os grupos o genótipo heterozigoto de *CCND1*-rs9344 (G/A), *RTEL1*-rs6010620 (A/G) e *EGFR*-rs1468727 (T/C), e o homozigoto selvagem de *XRCCI*-rs25487 (T/T) e *VEGF*-rs2010963 (G/G), assim como os respectivos alelos G, G, T, T e G ( $P > 0,05$ ). Genótipos com alelos mutantes prevaleceram em pacientes com gliomas e hábito tabagista (*CCND1*, *XRCCI*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF*) ou etilista (*RTEL1* e *EGFR*) e comorbidades como HAS (*RTEL1* e *EGFR*) e DM (*CCND1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF*), comparado aos controles ( $P < 0,05$ ). Não houve relação entre os referidos polimorfismos e o grau histológico dos gliomas ( $P > 0,05$ ). A análise de

regressão logística mostrou etilismo, HAS e DM como fatores de risco independentes para a doença ( $P < 0,0001$ ;  $P = 0,0069$ ;  $P = 0,0394$ , respectivamente). Pacientes com gliomas de baixo grau (II) apresentaram sobrevida de  $80,0 \pm 1,7\%$  em três anos, comparados àqueles com alto grau (III-IV;  $P = 0,2689$ ), porém sem diferença estatística. Enquanto a casuística total mostrou  $16,7 \pm 5,0\%$  de pacientes livres do evento/óbito em três anos, sem relação com as variantes genéticas em ambas as análises ( $P > 0,05$ ). Destacou-se a combinação de radioterapia (RT) e Temozolamida (TMZ + RT), com sobrevida de  $78,7 \pm 7,6\%$  em 20 meses, comparado a TMZ ( $21,9 \pm 5,1\%$ ), porém sem diferença significativa ( $P = 0,8711$ ). **Conclusão** – Variantes genéticas de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF* não se associam com gliomas, no entanto, hábitos de vida e comorbidades destacam-se nos pacientes, particularmente etilismo, HAS e DM, fatores de risco independentes para a doença. Há relação entre presença de alelos mutantes, hábitos de vida e comorbidades, o que pode potencializar o risco para gliomas, no entanto, isso não ocorre para o perfil anatomorfológico/funcional. Ressalta-se que gliomas de baixo grau conferem acréscimo à sobrevida dos pacientes, assim como, o tratamento TMZ+RT o que deve ser, no entanto, confirmado em amplos estudos.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; Glioma; Sistema Nervoso Central; Genes EGFR; Ciclina D1.

*Abstract*



## ABSTRACT

**Introduction** - Gliomas stand out as the most aggressive malignant tumors of the central nervous system. The identification of candidate genes as biomarkers helps to clarify the pathophysiology of gliomas, supports in early diagnosis of the disease, in addition to new therapeutic interventions. **Objectives** – To evaluate the association of genetic variants related to cell cycle regulation (*CCND1*), DNA repair (*XRCC1*) and DNA integrity (*RTEL1*), intracellular signaling (*EGFR*), and angiogenesis (*VEGF*) with gliomas, as well as anatomic-morphological and functional profiles and response to the treatment. **Patients and Methods** – A total of 303 individuals were studied: 100 patients with gliomas (SG=Study Group), regardless of the degree of malignancy; and 203 individuals without the disease (CG=Control Group). Genotyping of the polymorphisms *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 and *VEGF*-rs2010963 was analyzed by real-time PCR (TaqMan® SNP Genotyping). Anatomic/morphological and functional profiles were obtained through magnetic resonance imaging; whereas clinical data, lifestyle habits and comorbidities from medical records and questionnaire. Significance level set at 5%. **Results** - Smoking, alcohol consumption, systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus (DM) prevailed in patients compared to controls ( $P < 0.05$ ). The heterozygous genotype stood out in both groups, as well as the wild-type homozygous of *XRCC1*- rs25487 (T/T) and *VEGF*- rs2010963 (G/G), and their respective alleles G, G, T, T and G ( $P > 0.05$ ). Genotypes with mutant alleles prevailed in patients with gliomas, smoking (*CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF*) and drinking habits (*RTEL1* e *EGFR*) and comorbidities, such as SAH (*RTEL1* e *EGFR*) and DM (*CCND1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF*), compared to controls ( $P < 0.05$ ). There was no relationship between these

polymorphisms and the histological classifying of the gliomas ( $P>0.05$ ). Logistic regression analysis showed alcohol consumption, SAH and DM as independent risk factors for the disease ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0069$ ,  $P=0.0394$ , respectively). Patients with low-grade gliomas (II) showed survival of  $80.0\pm 1.7\%$  in three years, compared to patients with high-grade gliomas (III-IV;  $P=0.2689$ ), but without statistical difference. While the total sample showed  $16.7\pm 5.0\%$  in three years, with no relation with the genetic variants in both analyses ( $P>0.05$ ). The combination of radiation therapy (RT) and Temozolamide (TMZ + RT) was emphasized, with survival rate of  $78.7\pm 7.6\%$  in 20 months, compared to TMZ ( $21.9\pm 5.1\%$ ), although with no significant difference ( $P=0.8711$ ). **Conclusion** - Genetic variants of *CCND1*, *XRCCI*, *RTELI*, *EGFR* and *VEGF* are not associated with gliomas. However, lifestyle habits and comorbidities stand out in patients, mainly alcohol consumption and SAH and DM, which are independent risk factors for the disease. There is a relationship between the presence of mutant alleles, lifestyle and comorbidities, which can increase the risk for gliomas; however, this does not occur for the anatomic/morphological and functional profiles. Notably, low-grade gliomas show increased survival in patients, as well as the TMZ + RT treatment which should be further confirmed in wide studies.

**Keywords:** Polymorphism; Glioma; Central Nervous System; erbB-1; Cyclin- D1.

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

Os gliomas, originários das células gliais, correspondem a 30% de todos os tumores do sistema nervoso central (SNC) e 80% das neoplasias cerebrais malignas<sup>1,2</sup>, é o 17º tipo de câncer mais comum em todo o mundo<sup>3</sup>. Sua incidência é de seis em 100.000 habitantes por ano, em uma proporção de 3:2 para homens e mulheres, respectivamente, na faixa etária entre 45 e 70 anos<sup>4,5</sup>. O Instituto Nacional de Câncer<sup>6</sup> estimou para 2016 no Brasil, 5.400 novos casos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres.

Há relato de sobrevida relativa em cinco anos para pacientes com câncer do SNC de 18,5% em homens e de 21,7% em mulheres no Brasil<sup>7</sup>. Destaca-se, nesse caso, alta prevalência como segunda maior causa de óbito associada a câncer em pacientes com idade inferior a 35 anos<sup>8</sup>. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil a taxa de mortalidade por câncer do SNC em 2013 para sexo masculino e feminino foi 4.370 e 3.983 óbitos, respectivamente<sup>9</sup>. Em comparação com outros países, os Estados Unidos têm maior incidência de tumores cerebrais primários com incidência de 22.000 e 13.000 óbitos por ano<sup>5</sup>, geralmente possuem melhor acesso à exames de diagnóstico por imagem do que as áreas com baixas taxas como a Índia e Filipinas<sup>10</sup>.

As regiões com as maiores taxas de tumores cerebrais malignos primários (por exemplo, Europa do Norte, população branca dos EUA e Israel: taxas de 11-20 por 100.000 habitantes) geralmente têm melhor acesso à imagem médica do que as áreas com as taxas mais baixas (por exemplo, Índia e Filipinas: taxas De 2-4 por 100 000 pessoas)<sup>11</sup>. No entanto, parte da variação sugere diferenças étnicas na susceptibilidade hereditária ou diferenças culturais ou geográficas<sup>12,13</sup>.

Os gliomas possuem sintomas clínicos independentes do grau de malignidade. A convulsão e cefaleia têm sido relatadas os sintomas mais frequentes nos pacientes jovens 80%, principalmente nos tumores de grau II, enquanto os astrocitomas de alto grau apresentam-se tipicamente com outros sintomas, como distúrbios cognitivos e déficits focais<sup>14-17</sup>. O distúrbio cognitivo é o mais comum entre os pacientes com idade superior a 51 anos e especialmente em pacientes com mais de 70 anos<sup>18</sup>.

## 1.2 Tipos de Gliomas

As células gliais que originam os gliomas têm função essencial como progenitores neurais, tanto ao longo do desenvolvimento quanto no indivíduo adulto<sup>19</sup>. Compreendem a maior parte das células do sistema nervoso e são classificadas como microglia e macroglia<sup>5,20,21</sup>. A microglia compreende mais de 30% das células de glioma<sup>22</sup>. Representada por macrófagos do SNC, desempenha papel crucial nas funções relacionadas ao sistema imunológico. Tornando-se ativa na detecção de agentes infecciosos, são responsáveis pela fagocitose das células de necrose e apoptose, assim como importantes para o desenvolvimento normal do cérebro<sup>23,24</sup>. Macroglia são astrócitos e constitui metade das células no SNC, sendo responsável pela modulação da atividade neuronal, armazenamento e fornecimento de energia para os neurônios, além da regulação e permeabilidade do fluxo de sangue na barreira hematoencefálica<sup>25</sup>. Estas células podem diferenciar-se em tipos histológicos.

Existem quatro subtipos histológicos de gliomas: astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e ependimomas que definem quatro graus de malignidade, gliomas de grau I e II, considerados de baixo grau e gliomas de grau III e IV considerados de alto grau, respectivamente<sup>26-28</sup>. A OMS classifica os gliomas em diferentes graus e nomenclaturas de acordo com sua histologia (Quadro 1)<sup>20,28,29</sup>.

**Quadro1.** Classificação de gliomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde. A incidência e a faixa etária são descritas consoante o subtipo glial<sup>20,28</sup>.

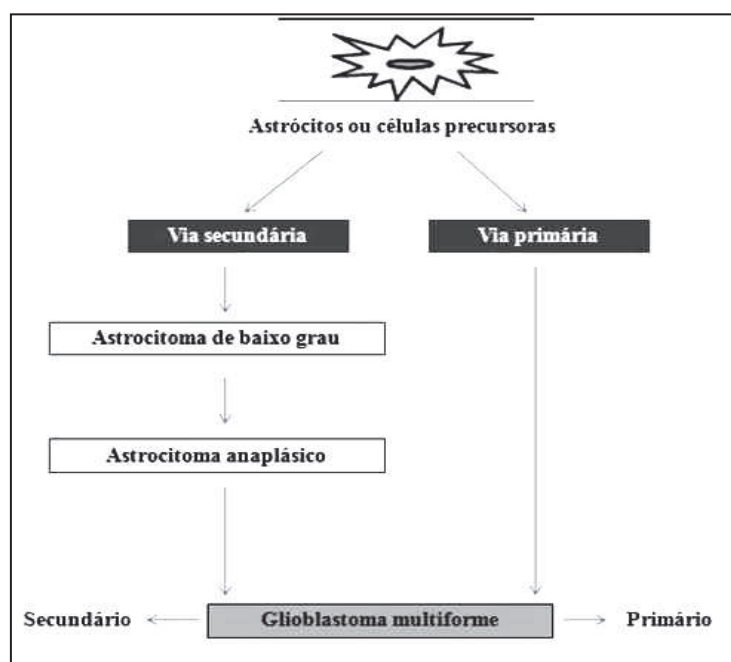
Tipo de Glioma	Grau	Nomenclatura	Incidência (%)	Idade (anos)
<b>Astrocitoma</b>	I	Astrocitoma pilocítico	5-6	<20
	II	Astrocitoma difuso	10-15	30-40
	III	Astrocitoma anaplásico	10-15	45-50
	IV	Glioblastoma multiforme	12-15	45-75
<b>Oligodendroglioma</b>	II	Oligodendroglioma	2,5	40-45
	III	Oligodendroglioma anaplásico	1,2	45-50
<b>Oligoastrocitoma</b>	II	Oligoastrocitoma	1,8	35-45
	III	Oligoastrocitoma anaplásico	1	40-45
<b>Ependimoma</b>	I	Subependimoma	0,7	50-60
	II	Ependimoma	4,7	<16, *30-40
	III	Ependimoma anaplásico	1	>16

\*recidiva

Astrocitomas, tumores constituídos essencialmente de astrócitos, com função de nutrir e sustentar os neurônios, compreendem a maioria dos gliomas e apresentam diagnóstico entre 30 e 40 anos<sup>5,31</sup>. Causam compressão, invasão e destruição do parênquima cerebral e arterial, hipóxia venosa, competição por nutrientes e liberação de metabólitos<sup>32</sup>. Os tumores grau I são biologicamente benignos, apresentam células bem diferenciadas, assim como facilidade na remoção cirúrgica e recuperação<sup>33</sup>. O astrocitoma difuso, grau II, é o glioma de baixo grau mais frequente e responde por 9,1% de todos os casos, sendo mais comum em indivíduos jovens<sup>30</sup>. Embora conhecido como de baixo grau, este tumor pode seguir percursos clínicos com infiltração difusa no cérebro, dificultando à ressecção cirúrgica. Estudos indicam que até 70% dos gliomas de grau II progridem para astrocitomas de grau III/IV, entre cinco e 10 anos após o diagnóstico<sup>33</sup>.

Os astrocitomas anaplásicos de grau III apresentam comportamento agressivo, caracterizado por aumento de neoplasia e mitose, assim como maior progressão

comparado aos tumores de grau II<sup>34</sup>. Glioma de grau IV, também conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), é o subtipo mais frequente, de maior malignidade, com proliferação vascular e necrose duas a cinco vezes mais elevadas do que os tumores de grau III, além de ser mais resistente à radioterapia e quimioterapia<sup>33,35</sup>. Nesse caso, os pacientes apresentam prognóstico precário, apesar do tratamento agressivo, com mortalidade superior a 95% em cinco anos<sup>36,37</sup>. Os GBM correspondem cerca de 50% de todos os astrocitomas e acometem mais homens que mulheres (razão 1,6:1)<sup>30</sup>. São subdivididos em dois tipos, primários e secundários (Figura 1), de acordo com suas características clínicas e moleculares. O tipo primário é o mais comum, acomete a faixa etária de 62 anos, em média, e apresenta crescimento tumoral mais rápido e agressivo, assim como pior prognóstico<sup>5</sup>.



**Figura 1.** Desenvolvimento de glioblastomas primários e secundários<sup>20</sup>.

Glioblastoma primário, também conhecido como “*de novo*”, é o mais frequente surge sem qualquer sinal clínico, desenvolve-se inicialmente a partir de um astrocitoma difuso (grau II) ou astrocitoma anaplásico (grau III). Secundário ou progressivo

desenvolve-se lentamente por meio da progressão de astrocitomas de baixo grau ou anaplásico e acomete pacientes com idade superior a 45 anos. A sobrevida é, geralmente, menor que um ano desde o diagnóstico, e a maioria dos pacientes (90% a 95%) evolui para óbito em dois anos<sup>5,7,29,38</sup>.

Os oligodendrogliomas são tumores da glia, que geralmente se originam na substância branca cerebral, mas podem ser encontrados em qualquer outro local do SNC, são responsáveis pela produção de mielina, auxiliando os neurônios a transmitir impulsos elétricos pelos axônios<sup>39</sup>. Compreendem de 4% a 15% de todos os gliomas, ocorrem principalmente em adultos, com idade entre 40 e 60 anos, mas também em crianças (4%)<sup>40</sup>. Dividem-se em dois tipos histológicos, como oligodendroglioma de grau II, difusos com grande poder de infiltração e crescimento lento. Embora considerado benigno, devido ao seu curso inicial, este tumor pode causar a morte<sup>41</sup>. E oligodendroglioma anaplásico, possui alta atividade mitótica, proliferação vascular acentuada, atipia nuclear e necrose, muito semelhante ao glioblastoma<sup>39</sup>. Já os oligoastrocitomas, representam cerca de 5% dos tumores cerebrais primários<sup>42</sup>, possuem características semelhantes a oligodendrogliomas e astrocitomas<sup>29,43</sup>, e melhor resposta ao tratamento quando comparados aos demais tipos de glioma<sup>44</sup>.

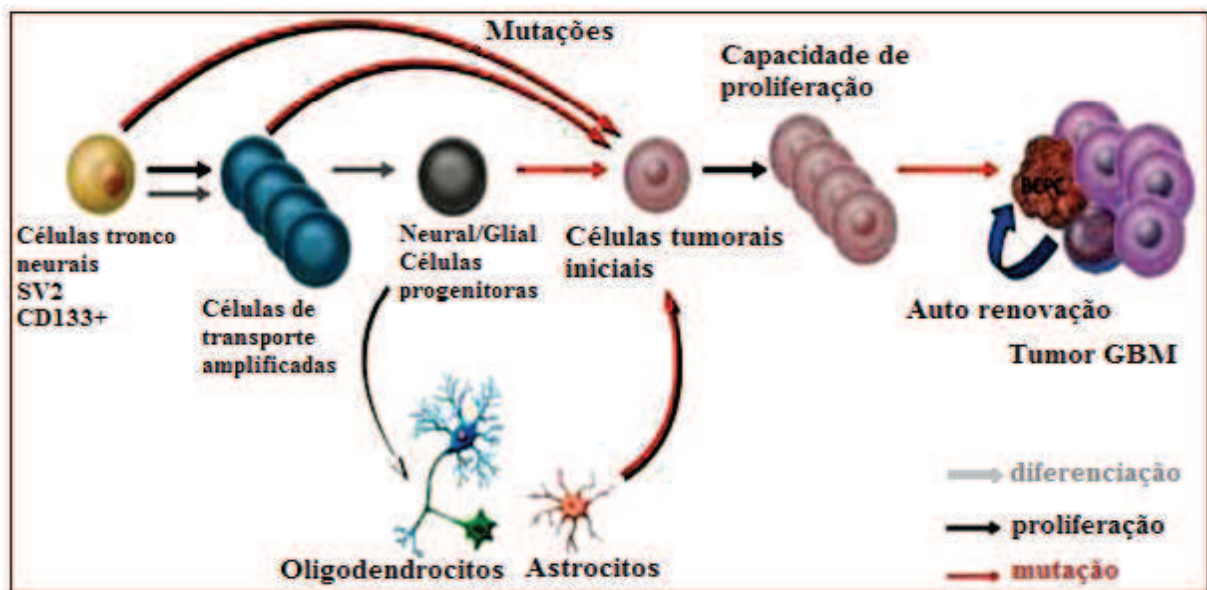
Os ependimomas, tumores raros que surgem do epêndima, constituem 2% de todas as neoplasias do SNC. Sua incidência anual é de dois a quatro casos a cada milhão de habitantes<sup>30</sup>. Este tipo de tumor corresponde a 5% dos gliomas intracranianos em adultos e até 10% em crianças<sup>45</sup>. Segundo a OMS eles são classificados em grau I-III. Subependimoma grau I apresenta crescimento lento, proliferação endotelial e atipia, podem ser assintomáticos e na maioria das vezes é considerado benigno<sup>46</sup>. Ependimoma grau II possui atipia nuclear e necrose, além de alta atividade mitótica<sup>46</sup>. Já os



ependimomas anaplásico de grau III, considerados tumores de alto grau, possuem alta proliferação celular e rápido crescimento<sup>44</sup>.

### 1.3 Carcinogênese de Gliomas

A maioria dos estudos considera que os gliomas são originados de células gliais diferenciadas. Entretanto, outra hipótese é seu desenvolvimento a partir de células progenitoras neuronais com grande capacidade de auto-renovação e divisão celular (Figura 2)<sup>20</sup>.



**Figura 2** - Possíveis relações para a produção das células de propagação dos tumores cerebrais e a geração do glioblastoma multiforme (GBM). Durante a diferenciação normal do sistema nervoso central, as células tronco neurais irão se diferenciar em células progenitoras neurais/gliais. Estas células têm a capacidade de produzir oligodendrócitos e/ou os astrócitos, mas não ambos. As mutações que geram GBM podem ocorrer em todos os níveis dentro desta linhagem e produzir células iniciadoras de tumor<sup>47</sup>.

O processo de carcinogênese de gliomas envolve acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas como deleções e ampliações de regiões cromossômicas, mutações gênicas, metilações ou desmetilações de DNA e de histonas<sup>48</sup>. A origem

celular dos gliomas constitui-se na célula estaminal neural, que origina novos neurônios e células gliais no cérebro adulto, nesse contexto, mutações oncogênicas nesta linhagem conduzem à formação de tumores malignos<sup>49</sup>.

O desenvolvimento de gliomas é atribuído às interações entre os fatores ambientais e genéticos. Ressalta-se a exposição à radiação ionizante como radiação eletromagnética de telefones celulares, como importante fator de risco, pois induz danos oxidativos ao DNA, que podem ativar inflamação, ruptura da barreira hematoencefálica, lesão, desmielinização, necrose vascular e edema<sup>50-52</sup>. O álcool, também é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, confere risco para glioma, além de outros tumores malignos<sup>53</sup>.

Adicionalmente, a nicotina, um importante componente ativo do cigarro, estimula o comportamento maligno em células de glioma<sup>54,55</sup>. Outros fatores de risco, como doenças cardiovasculares (hipertensão, diabetes) e idade avançada parecem acarretar leucoencefalopatia, que ocasiona infecção dos oligodendrócitos, originando células cancerosas<sup>56</sup>. Fatores genéticos também conferem risco para a doença, incluindo polimorfismos genéticos e histórico familiar de câncer<sup>52,57,58</sup>.

### **1.3.1 Aspectos genéticos**

Alterações genéticas em tecidos tumorais ou sanguíneo podem ser identificadas como biomarcadores e contribuir para o diagnóstico de gliomas. Ressalta-se que a caracterização genética e molecular auxilia a classificação histopatológica da OMS, assim como a escolha da melhor estratégia terapêutica<sup>48,59,60</sup>. No entanto, ainda são obscuros os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de gliomas.

Recentemente, avanços tecnológicos de genotipagem de variantes genéticas envolvidas com mecanismo, etiologia e prognóstico de gliomas têm mostrado genes

susceptíveis e fortemente relacionados à doença<sup>61</sup>. Nesse contexto, destacam-se genes responsáveis pelo reparo (*XRCC1* = *X-ray repair cross complementing group 1*) e integridade do DNA (*RTEL1* = *Regulator of telomere elongation helicase 1*), assim como regulação do ciclo celular (*CCND1* = *cyclin D1*) e sinalização intracelular (*EGFR* = *epidermal growth factor receptor*)<sup>62,63</sup>, além do regulador de angiogênese (*VEGF* = *vascular endothelial growth factor*), que contribuirão para melhor caracterização desse tipo de tumor<sup>64</sup>.

O gene *XRCC1* localiza-se no cromossomo 19q13.2 humano, possui 17 éxons e codifica uma proteína responsável pelo reparo de danos de cadeia simples do DNA causados por radiação ionizante, por excisão de base nitrogenada. Portanto, é um importante componente para vias de reparo do DNA, contribuindo para melhor estabilidade genética<sup>65</sup>. O polimorfismo *XRCC1*-Arg399Gln (rs25487), localizado no éxon 10, apresenta-se frequentemente alterado no câncer de mama, gastresofágico e glioma<sup>66,67</sup>. Este polimorfismo envolve mudanças de aminoácidos nas sequências evolutivamente conservadas, pode alterar a função de *XRCC1*, o que diminui a cinética de reparação e aumenta o risco de glioma<sup>65,68</sup>.

As mutações que ocorrem nas bases nitrogenadas de nucleotídeos causam as lesões mais comuns do DNA. Portanto, uma vez afetada a função da proteína *XRCC1*, pode aumentar a sensibilidade celular à radiação, estresse oxidativo e agentes alquilantes<sup>69</sup>. Atualmente, mais de 300 alterações de apenas um nucleotídeo foram identificadas no gene *XRCC1*. Ressalta-se que os genes de reparo de DNA possuem funções importantes na manutenção da estabilidade genômica e reparação de diferentes vias, que são mediadas por genes reguladores do ciclo celular<sup>52</sup>.

O gene *RTEL1*, localizado no cromossomo 20q13.33 humano, também é responsável pela manutenção e integridade do DNA, assim como da apoptose, tendo em

vista seu papel essencial na regulação do comprimento dos telômeros<sup>70,71</sup>. Estudos mostram associação entre *RTEL1* e tumores cerebrais, incluindo os gliomas<sup>72,73</sup>. Os telômeros são estruturas de DNA, presentes nas extremidades dos cromossomos, protegendo o DNA de qualquer tipo de degradação<sup>73</sup>, logo, sua destruição resulta em instabilidade cromossômica. Tal situação pode induzir à morte celular e, conseqüentemente, inibição do tumor, ou instabilidade genética ocasionando a carcinogênese. Desse modo, mutação de *RTEL1* desempenha papel crítico na iniciação do tumor<sup>70,74</sup>. Há referência da associação entre *RTEL1* e câncer de fígado, gastrointestinal e mama<sup>74</sup>, enquanto o polimorfismo rs6010620 A/G, presente no éxon 12, pode ser fator de risco para gliomas<sup>72,75,76</sup>.

Destaca-se também o gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13 humano, com efeito regulador do ciclo celular. Codifica uma proteína (ciclina D1) importante no controle da interfase (G1-S), responsável pela transição do ciclo celular, cuja alteração pode ocasionar propagação de danos no DNA e acúmulo de erros genéticos<sup>77</sup>. Há referência de que a supressão de *CCND1* inibe o crescimento de células do glioma, tornando-se candidato para susceptibilidade de tumor cerebral<sup>78,79</sup>. Nesse contexto, o polimorfismo *CCND1*-G870A (rs9344), presente no éxon 4, codifica uma proteína de vida longa, comparado à variante do tipo selvagem, conferindo maior risco a câncer de bexiga, próstata, pulmão, fígado e esôfago<sup>80</sup>.

A apoptose e as vias do ciclo celular têm relevância na etiologia do tumor cerebral, sendo que expressão elevada de *CCND1* foi observada em GBMs, indicando envolvimento da atividade dessa proteína com esse tipo de tumor<sup>81</sup>. Adicionalmente, a amplificação, mutação e elevada expressão de *CCND1* podem ser associadas com resistência a quimioterapia e prognóstico desfavorável em tumores de mama, cerebrais e de células germinativas testiculares<sup>62</sup>. Recentemente, demonstrou-se que supressão de

*CCND1* reduz proliferação e invasão de células de glioma, sugerindo o papel crucial deste gene na gliogênese e definindo a ciclina como um alvo promissor para a terapia molecular<sup>82</sup>. Há referência da associação do polimorfismo *CCND1*-G870A com o risco de glioma<sup>83-85</sup>.

O processo carcinogênico envolve também mecanismos relacionados com a sinalização intracelular. Nesse caso, destaca-se o gene *EGFR* localizado no cromossomo 7p11.2 humano, que participa de um processo complexo envolvendo a regulação de redes de sinalização intracelulares em vários tipos de tumores<sup>62</sup>. Mutações que ocasionam aumento da expressão ou atividade do *EGFR* podem resultar em câncer<sup>86</sup>, pois a ativação desse gene aumenta a proliferação, migração e invasão celular, e reduz a sinalização da apoptose<sup>86,87</sup>. Há referência de polimorfismos do gene *EGFR* associados a câncer de pulmão, mama e esôfago<sup>88-90</sup>, o que deve ser esclarecido em relação a gliomas. Estudos sugerem que a regulação da via EGFR desempenha papel importante na progressão do glioma, sendo que vários SNPs (*single nucleotide polymorphism*) podem estar relacionados com o risco de glioblastoma<sup>4,91</sup>. Destaca-se o polimorfismo *EGFR*-rs1468727 (C/T), presente no intron 13, pois a presença do alelo C pode aumentar o risco de glioma<sup>4,92</sup>.

O processo de desenvolvimento de tumores está envolvido com inúmeros fatores, dentre eles, a angiogênese que é um importante regulador da progressão de gliomas<sup>93</sup>. Durante o crescimento dos tumores, é necessária quantidade adequada de oxigênio e nutrição, que é adquirida por novos vasos sanguíneos derivados daqueles já existentes. Assim, a inibição das vias angiogênicas é um possível alvo terapêutico para diversos tumores malignos. Nesse contexto, ressalta-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente estimulador da angiogênese, que se relaciona a fatores de

crescimento, citocinas inflamatórias, além de ser conhecido como um ativador de oncogenes<sup>94</sup>.

As atividades de VEGF são mediadas por três receptores, incluindo VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. A maioria dos estudos sugere que o VEGF se liga predominantemente a VEGFR-2, também conhecido como o receptor do domínio de inserção quinase (KDR), responsável pela ativação da cascata das vias de VEGF<sup>84</sup>. Nesse caso, vários SNPs estão relacionados ao desenvolvimento de gliomas<sup>54,84</sup>. Destes, destaca-se o polimorfismo *VEGF-C634G* (rs2010963), localizado no cromossomo 6p21.3 humano, responsável pelo aumento de expressão de *VEGFA* em ambos os níveis de transcrição e tradução, influenciando na agressividade do tumor<sup>64</sup>. Diversos estudos mostram associação de *VEGF-C634G*, relaciona-se com câncer de pulmão, boca, colo retal, mama, gástrico e bexiga<sup>94-97</sup>, o que ainda necessita esclarecimento, em relação aos gliomas.

#### **1.4 Diagnóstico e Tratamento de Gliomas**

Os tumores cerebrais estão localizados, geralmente, em regiões de difícil acesso, resistentes à radiação, quimioterapia e remoção cirúrgica, oferecendo grande risco às funções cerebrais. Atualmente, o diagnóstico é realizado principalmente por exames de imagem, como ressonância magnética (RM) e métodos complementares de perfusão e espectroscopia (Figuras 3 a 5), seguido de biópsia e análise histológica<sup>98-100</sup>.

O exame de perfusão por RM pode ser realizado em conjunto com as imagens da RM convencional, mostrando as variações regionais da microcirculação encefálica por meio de mapas do volume sanguíneo cerebral (CBV). O mapa do CBV reflete a vascularização das lesões encefálicas, o qual estima indiretamente a angiogênese,

possibilita a caracterização de áreas com maior ou menor perfusão e, conseqüentemente, contribui para a diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas<sup>101,102</sup>.

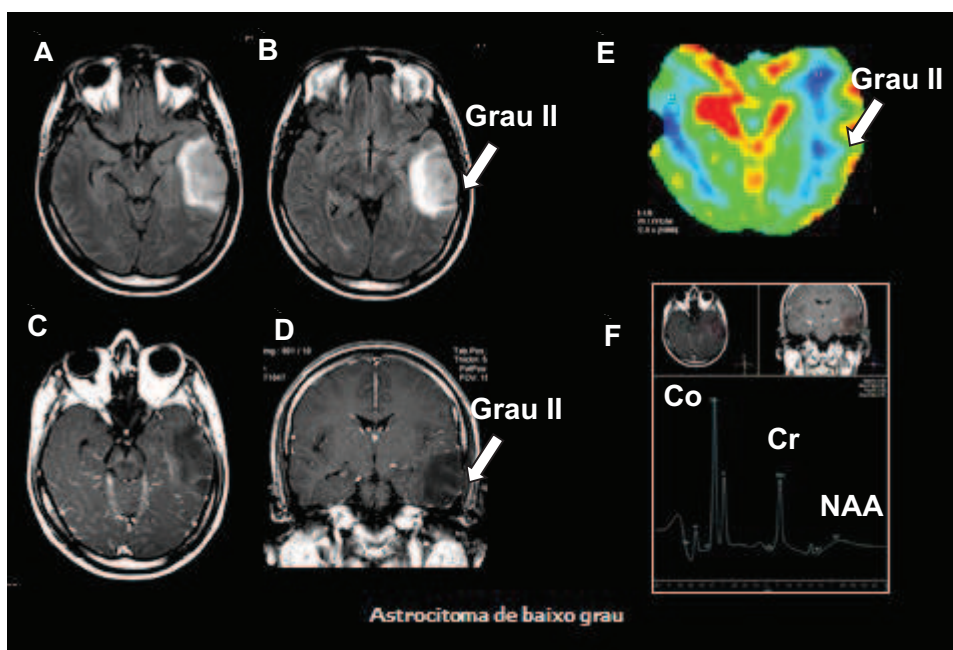
A espectroscopia por ressonância magnética (ERM), um método não invasivo, relativamente rápido e de fácil aplicação, fornece informações metabólicas/bioquímicas do parênquima cerebral normal e de processos patológicos<sup>103-105</sup>. Este método utiliza os mesmos princípios físicos da RM convencional, mas difere na forma em que os dados são processados e apresentados. Nesse caso, em vez de imagens são obtidos gráficos de amplitude versus frequência<sup>103</sup>, como por exemplo, o aumento do pico da colina (Co), em gliomas malignos ou na região perilesional dos gliomas de alto grau, devido à infiltração tumoral do tecido cerebral adjacente às bordas da lesão.

O aumento da expressão de Co observado nos gliomas encefálicos é devido ao aumento da síntese de membrana e proliferação celular<sup>106,107</sup>. Os picos de lipídios e lactato também são encontrados em neoplasias. Lipídios sugerem necrose macroscópica devido à ruptura da membrana celular, e sua presença em astrocitomas pode estar relacionada ao grau histológico. Já o lactato na região perilesional em tumores é, provavelmente, devido à hipóxia causada por edema vasogênico<sup>108,109</sup>.

Portanto, diagnóstico por imagem é constantemente utilizado a fim de identificar subgrupos de pacientes com glioma e, potencialmente, oferecer diferentes tipos de tratamento direcionado a cada paciente<sup>110</sup>. Atualmente, três terapêuticas são recomendadas aos pacientes. Primeiramente, a ressecção cirúrgica é indicada na maioria dos casos de tumor cerebral, com objetivo de remover amplamente a neoplasia com a máxima preservação do tecido normal adjacente e das funções neurológicas. A radioterapia desempenha papel central no tratamento paliativo do tumor cerebral, na doença inicialmente inoperável ou recorrente, pois a irradiação focal por meio de técnicas convencionais permite estabilizar ou melhorar a condição funcional. Já a

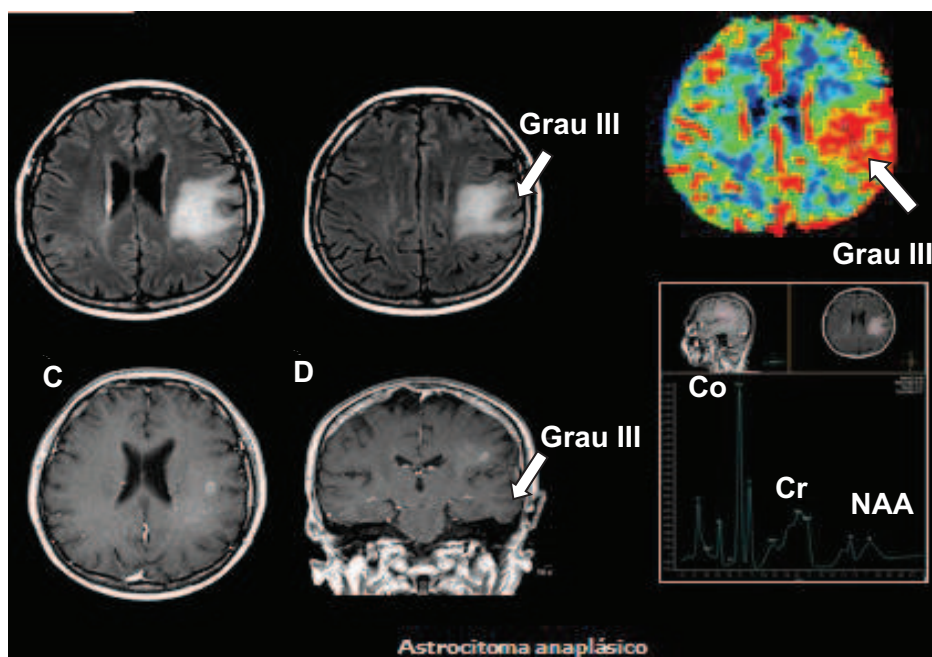
quimioterapia antineoplásica é pouco ativa para o câncer cerebral, produzindo benefício clínico temporário para alguns pacientes<sup>7</sup>.

Em comparação com outros tumores, os gliomas apresentam maior dificuldade em relação à terapêutica, devido à barreira hematoencefálica<sup>111</sup>. Os tratamentos disponíveis apresentam dificuldade por não conseguir fácil penetração pela barreira hematoencefálica até alcançar a massa tumoral<sup>110</sup>. Desse modo, apesar dos avanços na terapia contra o câncer, pacientes com glioma ainda dependem da eficácia limitada dos agentes alquilante temozolomida (TMZ), em combinação com a neurocirurgia e/ou radioterapia<sup>111</sup>. Nesse contexto, estudos relacionando exames de imagem, grau e progressão tumoral e perfil genético poderão identificar biomarcadores, contribuindo no diagnóstico e prognóstico, assim como, desenvolvimento de novas terapias no tratamento de gliomas.

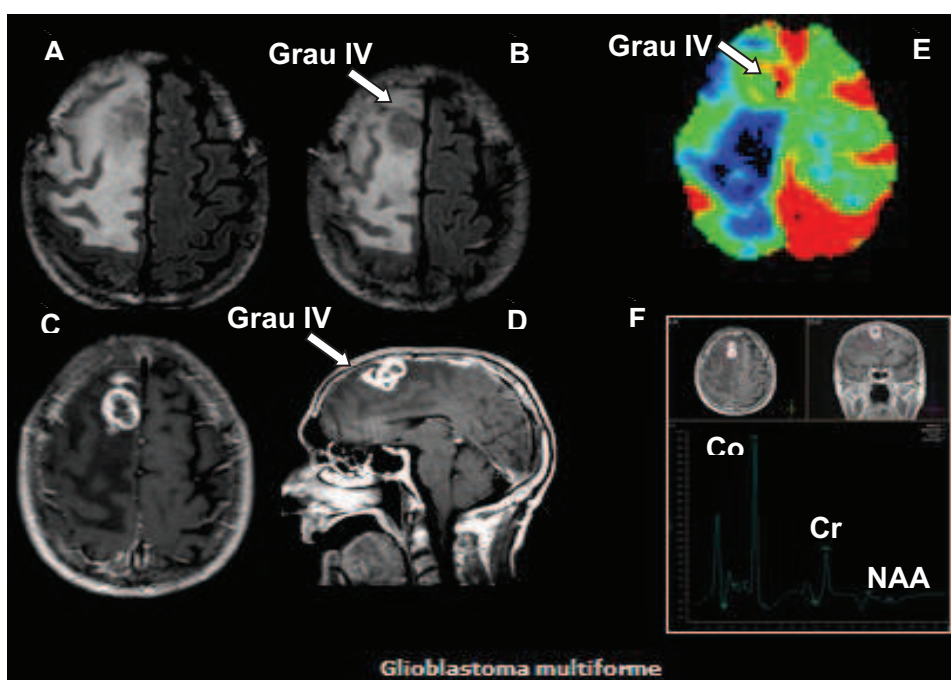


**Figura 3.** RM encéfalo (axial flair A e B) e (axial e coronal T1 pós-contraste C e D), evidenciou lesão infiltrativa hiperintensa na ponderação T2 na região temporal esquerda, que não apresenta realce pelo contraste paramagnético endovenoso (setas brancas). Perfusão por RM (E) evidenciou hipoperfusão na lesão (perfusão fria). Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato.





**Figura 4.** RM encéfalo (axial flair A e B) e (axial e coronal T1 pós-contraste C e D), evidenciou lesão infiltrativo hiperintensa na ponderação T2 na região fronto parietal esquerda, com discreto realce pelo contraste paramagnético endovenoso. Perfusão por RM (E) evidenciou hiperperfusão na lesão (perfusão quente). Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato.



**Figura 5.** RM encéfalo (axial flair A e B) e (axial e sagital pós-contraste C e D), evidenciou lesão nodular com necrose central e realce periférico pelo contraste paramagnético endovenoso, localizado na região frontal direita (setas brancas). Perfusão por RM (E) evidenciou hiperperfusão na lesão (perfusão quente). A Espectroscopia por RM (F) evidenciou aumento do pico de colina e redução de N-acetil aspartato.

*Objetivos*

## 1.5 OBJETIVOS

Avaliar a associação de variantes genéticas relacionadas ao reparo e integridade de DNA, regulação do ciclo celular e redes de sinalização intracelulares com perfil clínico, exame radiológico anátomo-morfológico/funcional e resposta ao tratamento em pacientes com gliomas.

### 1.5.1 Objetivos específicos

1. Analisar a frequência dos polimorfismos *XRCCI*-rs25487, *CCND1*-rs603965, *EGFR*-rs1468727 e rs730437, *RTEL1*-rs6010620 e *VEGF*-rs2010963 e combinações de genótipos de risco em pacientes com gliomas, comparado a indivíduos sem a doença.

2. Avaliar a associação de glioma com hábitos de vida, perfil demográfico, e comorbidades considerando-se as respectivas variantes genéticas.

3. Avaliar a associação entre o perfil genético, clínico e radiológico anatomorfológico por imagem de RM, perfusão e espectroscopia e resposta ao tratamento.

4. Avaliar a razão de chance para gliomas, sobrevida e complicações de pacientes com a doença, considerando o perfil genético, clínico e radiológico.

*Casuística e Métodos*

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1 Casuística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se o programa DIMAM 1.0, com base na estimativa de proporção dos polimorfismos na população geral, além da precisão absoluta no grupo com glioma<sup>112</sup>.

Trata-se de um estudo com delineamento do tipo longitudinal (caso– controle). Para as análises de polimorfismos genéticos foram selecionados 303 indivíduos independente de sexo, grupo étnico e idade, distribuídos em dois grupos: Grupo Estudo (GE) - 100 pacientes diagnosticados com glioma, idade média de 56 anos (62% do sexo masculino), independente do tipo e grau de malignidade, cujas amostras de tecido tumoral cerebral foram coletadas no período de 2003 a 2015, e armazenadas em bloco de parafina (Quadro 2); Grupo Controle (GC) - 203 indivíduos sem histórico de câncer, com idade média de 45 anos (67% do sexo masculino), e ausência de sinais clínicos e radiológicos de gliomas.

**Quadro 2.** Caracterização da amostra de acordo com os subtipos histológicos referente a Organização Mundial da Saúde<sup>20</sup>.

Paciente N=100	Subtipo Histológico	Grau
6	Astrocitoma pilocítico	I
1	Astrocitoma difuso	II
12	Astrocitoma anaplásico	III
68	Glioblastoma multiforme	IV
5	Oligodendroglioma	II
3	Oligodendroglioma anaplásico	III
2	Oligoastrocitoma anaplásico	III
1	Subependimoma	I
1	Ependimoma	II
1	Ependimoma anaplásico	III

Todos os pacientes foram selecionados no Departamento de Neurocirurgia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-HB/FAMERP, onde fizeram acompanhamento. Os pacientes com suspeita clínica de lesão encefálica expansiva foram submetidos a exame de RM com estudo de perfusão e espectroscopia, realizados no Serviço de Radiologia HB/FAMERP, e encaminhados à cirurgia diante do laudo positivo de glioma. O material biológico (glioma) foi fixado em formol para posterior inclusão em parafina e análise histopatológica, realizada pelo Departamento de Patologia HB/FAMERP, o qual forneceu as amostras para este estudo. Para GE foi solicitada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por se tratar de material já coletado e, portanto, sem riscos adicionais.

Os indivíduos do grupo controle foram selecionados no Serviço de Radiologia HB/FAMERP, sendo que durante a realização de exames de imagem (RM), por outra indicação, apresentaram diagnóstico negativo para gliomas. Todos foram informados das características do estudo, confirmaram sua participação pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e preencheram um questionário com perfil demográfico, comorbidades e hábitos de vida (Anexo A).

Este trabalho é parte de um projeto maior, coordenado pelo Prof. Dr. Waldir Antonio Tognola (Pós-Graduação em Ciências da Saúde - FAMERP), intitulado “Biomarcadores Moleculares no Diagnóstico e Prognóstico de Glioma de Alto Grau e sua Relação com Papiloma Vírus Humano e Citomegalovírus”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CAAE: 34123314.9.0000.5415, Anexo B).

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extração de DNA

Para o grupo controle, o DNA genômico foi extraído de leucócitos de amostra de sangue periférico coletado com EDTA, cuja técnica consistiu no método *salting-out*<sup>113</sup>, realizado em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sanguíneas; 2) desproteinização; 3) precipitação do DNA e ressuspensão, de acordo com o protocolo apresentado a seguir.

O sangue periférico total foi coletado em tubo *vacutaner* com EDTA (1 mg/mL de sangue), transferido 1 mL de sangue para um tubo estéril de microcentrífuga de 2 mL, seguido de centrifugação a 5.000 rpm por cinco minutos, à temperatura ambiente (TA), sendo o plasma descartado. Foram adicionados ao sedimento 900 µL de Tampão 1x contendo Triton. O próximo passo consistiu na homogeneização com Vortex durante um minuto. A amostra foi centrifugada novamente a 5.000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, realizou-se o descarte do sobrenadante por inversão vagarosa e constante, seguida da adição de 1 mL de tampão 1x. Esse procedimento foi repetido por cerca de três vezes, ou até que o *pellet* estivesse isento de hemoglobina.

O próximo passo consistiu na ressuspensão do sedimento (núcleos de leucócitos) com 200 µL de Tampão 2X seguido do acréscimo de 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, que tem por função o rompimento da membrana nuclear. Incubou-se a amostra no banho-maria a 56 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M, e a amostra homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm durante cinco minutos em temperatura ambiente (TA), o que favoreceu a precipitação das proteínas.

Na etapa seguinte o sobrenadante (DNA) foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, e o precipitado (proteínas) descartado. O DNA foi misturado com 1

mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão lenta do tubo, de modo que o etanol promoveu a purificação do DNA e sua precipitação. A amostra foi mantida em freezer -20 °C *overnight*.

A próxima fase, conhecida como precipitação de DNA, iniciou-se com a retirada das amostras do freezer e centrifugação a 12.000 rpm por cinco minutos à TA. O etanol absoluto foi removido e as amostras lavadas com etanol a 70% gelado e centrifugadas a 12.000 rpm por cinco minutos. Essa etapa foi repetida. Depois, foi removido todo o etanol. O tubo contendo a amostra foi colocado sobre papel absorvente para a evaporação do etanol (cerca de cinco horas).

A terceira parte da extração incluiu a ressuspensão do precipitado (DNA) em 100 µL de Tampão TE (pH 8,0), seguido de incubação em banho-maria a 56 °C por 15 minutos, reidratando o DNA (para não degradar). Enfim, a amostra foi armazenada a -70 °C até o processamento para análise dos polimorfismos.

### **2.2.2 Extração de DNA em tecido parafinado**

Para os pacientes, o DNA genômico foi extraído de amostras de tecido parafinado pelo kit “ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System” (Promega Biotecnologia – Brasil), realizadas em cinco etapas: 1) Desparafinização; 2) Lise das células; 3) Tratamento com RNase; 4) Isolamento do DNA; 5) Lavagem e eluição, de acordo com o protocolo do fabricante.

Primeiramente os blocos parafinados foram cortados em micrótomo (Leica (RM2245-Leica Biosystems Nussloch GmbH – Alemanha). Para cada bloco foram realizados 10 cortes de 8µm e armazenados em tubos criogênicos. Em seguida, para a desparafinização, foi adicionado 1 mL de xilol 100% para cada amostra, e agitação em Vortex por 30 segundos. Centrifugou-se em velocidade máxima por dois minutos à TA,



em seguida retirou-se o xilol usando a pipeta sem agredir o sedimento. Adicionou-se 1 mL de etanol 95 - 100%, Vortex por 30 segundos para homogeneizar, novamente centrifugou-se em velocidade máxima por dois minutos à TA, em seguida descartou-se o etanol usando a pipeta sem agredir o sedimento. Após, centrifugou-se por 30 segundos à velocidade máxima para remover todo o etanol, e o material foi incubado durante 15 minutos a 37°C para evaporar todo etanol residual. No próximo passo, para lise das células, acrescentou-se 200 µL de Lysis Buffer e 20 µL de proteinase K em cada amostra e, em seguida, Vortex brevemente para homogeneizar. Incubou-se a 56°C por uma hora, e novamente a 80°C durante uma hora. Em seguida, a amostra permaneceu sobre a bancada até que alcançasse a TA. Para o tratamento com RNase, adicionou-se 10 µL de RNase diretamente às amostras lisadas, utilizou-se a pipeta para homogeneização, após, incubou-se à TA (20-25 °C) durante cinco minutos. Para a etapa de isolamento de DNA, adicionou-se 220 µL de BL Buffer diretamente às amostras, juntamente com 240 µL de etanol (95-100%), e Vortex para homogeneizar.

Para cada amostra a ser processada, foi reservado um tubo de coleta e uma coluna (fornecido no kit), em seguida transferiu-se toda a amostra, incluindo qualquer tipo de precipitado formado na coluna junto ao tubo, e tampou-se a coluna. Centrifugou-se a 10.000 x g por 30 segundos a TA, após, desprezou-se o fluido que passou pela coluna, esta foi reinserta no mesmo tubo de coleta. Em seguida, iniciou-se a etapa das lavagens e eluição. Adicionou-se 500 µL de Wash Solution 1X à coluna de vinculação, tampou-se a coluna. Centrifugou-se a 10.000 x g durante 30 segundos, em seguida, descartou-se o fluido, que atravessou a coluna, e esta foi reinserta ao mesmo tubo. Esse processo foi repetido por mais uma vez. Após descartar o fluido, a coluna foi reinserta novamente, e centrifugou-se com a tampa aberta a 16.000 x g por três minutos para assegurar a secagem completa da coluna. Em seguida, foi descartado qualquer fluido

juntamente com o tubo, a coluna transferida para um novo tubo de 2,0 mL de microcentrífuga, adicionou-se 40 µL de Elution Buffer, e centrifugou-se a 16.000 x g durante um minuto a TA. A coluna foi retirada do tudo de vinculação e descartada. O fluido que atravessou a coluna contendo DNA eluído foi armazenado a -20 °C. A concentração e a pureza foram analisados pelo equipamento NanoDrop-ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware - USA), segundo o manual do fabricante. A absorvância da amostra foi medida sobre a proporção 260 nm e 280 nm, e utilizou-se a razão 260/280 para avaliar a pureza do DNA, considerando-se o valor 1,8–2,0 como referência. Observou-se a integridade da amostra em gel de agarose 1%.

### **2.2.3 Genotipagem por PCR em tempo real**

Para a análise polimórfica de *CCND1* (rs9344), *RTEL1* (rs6010620), *XRCC1* (rs25487), *EGFR* (rs1468727) e *VEGF* (rs2010963), utilizou-se a técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real – SNP Genotyping Assay (*Applied Biosystems*), com volume total de 10 µL das misturas da reação na concentração final de 20 ng/µL de DNA, portanto, utilizou-se 5 µL de TaqMan Universal Master Mix, 3 µL de solução de água DEPC e 0,5 µL TaqMan SNP Genotyping e 1,5 µL da amostra de DNA e sondas específicos para cada alelo. Os respectivos primers, as etapas de amplificação e genotipagem dos referidos polimorfismos são apresentados no Quadro 3. As reações foram realizadas de acordo com instruções do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*).

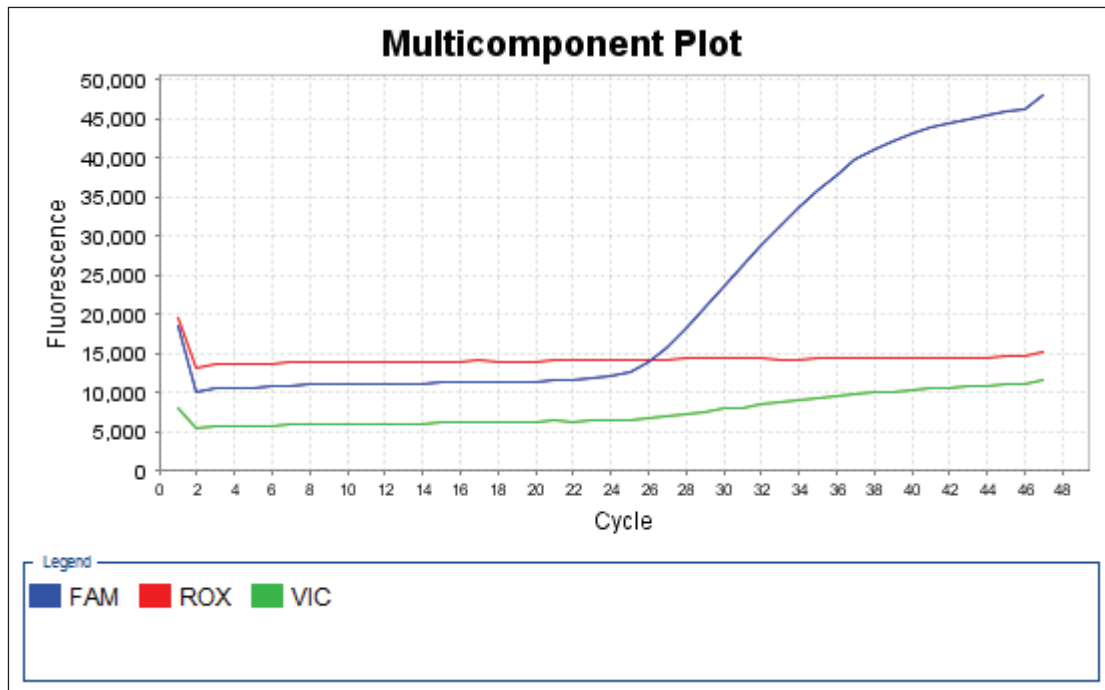
Com a reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), visualizou-se a emissão de fluorescência emitida pelas sondas captadas pelo equipamento. Os ensaios foram realizados no equipamento StepOne Plus Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*). Os dados foram armazenados no programa StepOne v2.x (*Applied*

Biosystems). As Figuras 6 a 8 mostram o padrão de amplificação dos respectivos polimorfismos.

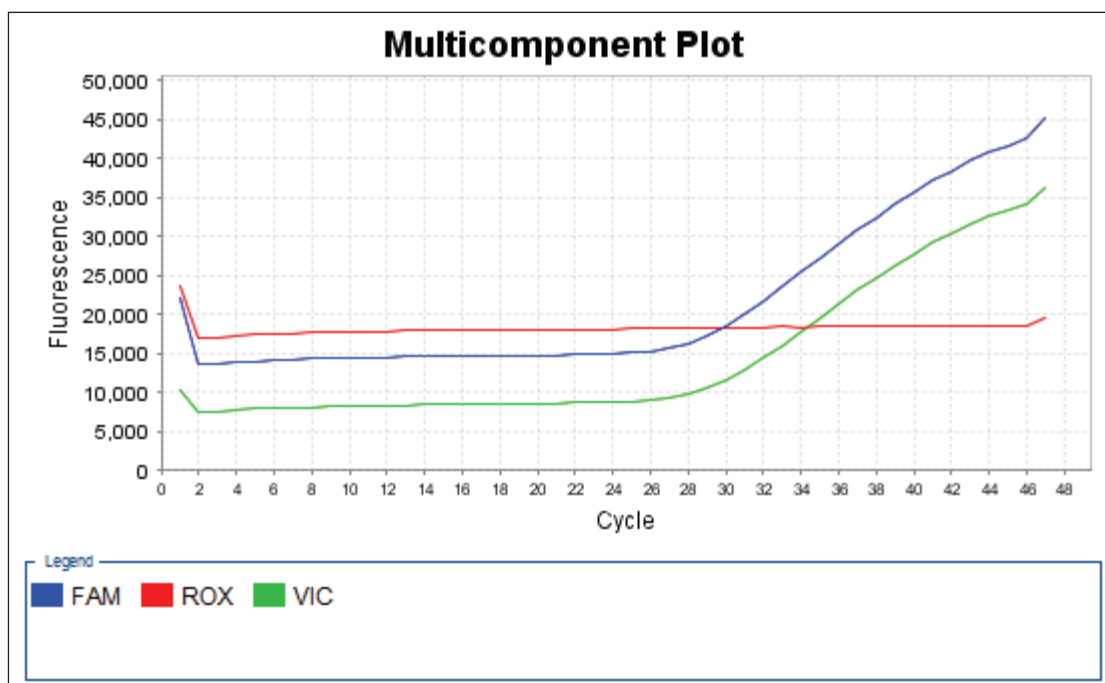
**Quadro 3.** Primers, etapas de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e dos polimorfismos *XRCC1*-rs25487, *CCND1*-rs9344, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963.

Polimorfismo	Primer	Desnaturação Inicial	Ciclagem (Ciclos)	Desnaturação (Temperatura/tempo)	Anelamento	Extensão Final	Genótipo
<b>XRCC1-</b> rs25487	C___622564_10	60°C/30 s	45	95°C/ 10 min	95°C/15 s	60°C/1 min	C/C T/C
<b>CCND1-</b> rs9344	C___744725_1_	60°C/30 s	45	95°C/ 10 min	95°C/15 s	60°C/1 min	G/G A/G
<b>EGFR -</b> rs1468727	C___2678655_10	60°C/30 s	45	95°C/ 10 min	95°C/15 s	60°C/1 min	T/T T/C
<b>RTEL1-</b> rs6010620	C_25921674_10	60°C/30 s	45	95°C/ 10 min	95°C/15 s	60°C/1 min	A/A A/G
<b>VEGF-</b> rs2010963	C___8311614_10	60°C/30 s	45	95°C/ 10 min	95°C/15 s	60°C/1 min	G/G G/C

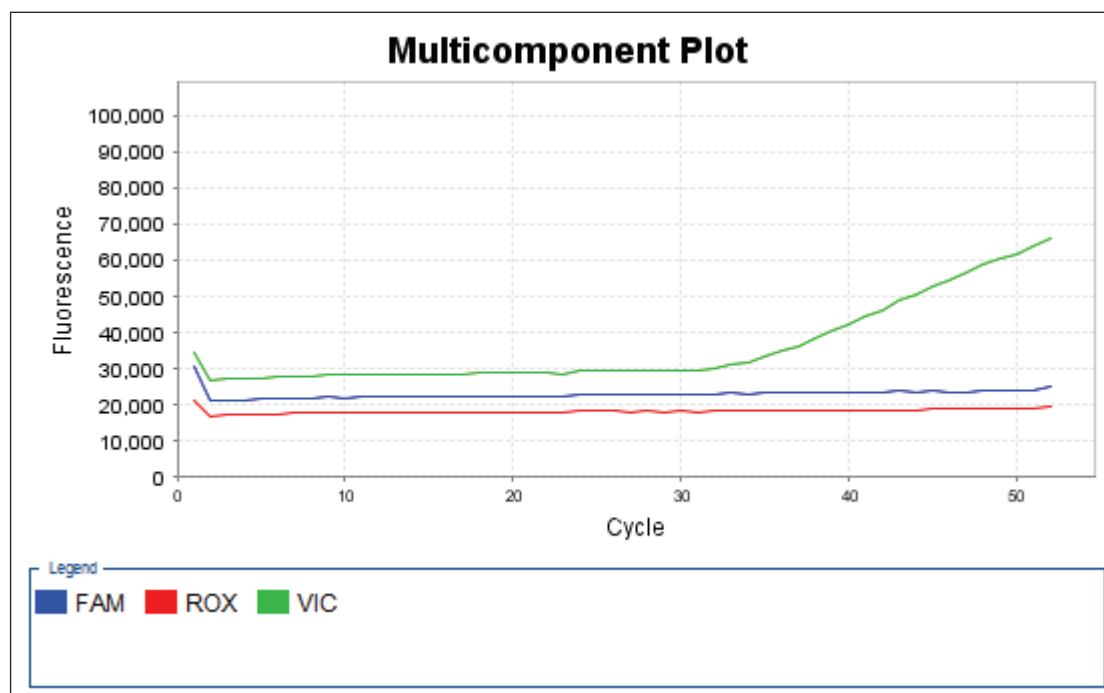
XRCC1= X-ray repair cross complementary group 1; CCND1= cyclin D1; EGFR = epidermal growth fator receptor; RTEL1= regulator of telomere elongation helicase1; VEGF = vascular endothelial growth factor; min = minute; s = segundos.



**Figura 6.** Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo homozigoto selvagem, representado pela amplificação do alelo (FAM) em azul.



**Figura 7.** Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo heterozigoto com amplificação de ambos os alelos FAM e VIC.



**Figura 8.** Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo homocigoto mutante, representado pela amplificação do alelo VIC em verde.

#### 2.2.4 Avaliação por ressonância magnética, perfusão e espectroscopia

Foram analisadas as imagens de RM de todos os pacientes com glioma, com auxílio dos médicos Dr. Antonio Carlos Pondé Rodrigues Junior e Prof. Dr. José Roberto Lopes Ferraz Filho (neurorradiologistas do Serviço de Imagem HB/FAMERP). A análise dos exames de RM pré-operatórios auxiliou na caracterização anátomo-morfológica do tumor em relação à localização da lesão, tamanho, extensão do edema perilesional, agressividade das lesões, efeito expansivo, presença de realce pelo contraste relacionado à quebra da barreira hematoencefálica e necrose. Já os resultados dos exames de RM pós-operatórios permitiram avaliar a evolução do paciente no pós-cirúrgico para identificação de possível tumor residual e ou progressão da doença.

O exame de perfusão por RM permitiu construir mapas do volume sanguíneo cerebral (CBV) mostrando variações regionais da microcirculação encefálica e lesões encefálicas<sup>92</sup>. Na espectroscopia foram analisados os metabólitos colina, creatina, N

acetil aspartato, lípides e lactato do parênquima cerebral normal e de processos patológicos, sendo utilizada a creatina como valor referência.

### **2.2.5 Perfil clínico e hábitos de vida**

A caracterização de hábitos de vida (tabagismo e etilismo) e comorbidades (hipertensão arterial sistêmica – HAS, diabetes mellitus – DM e índice de massa corporal - IMC) foi obtida pela aplicação de um questionário, e em prontuários médicos.

Define-se por HAS valor de pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg, na ausência de medicação anti-hipertensiva<sup>114</sup>. Para diagnóstico de DM foram considerados valores séricos de glicemia: >200mg/dL (glicemia de duas horas ou a qualquer hora do dia, independente do horário de refeições)<sup>115</sup>. Em relação ao IMC, foi definido como peso (kg) dividido pela altura ao quadrado em metros<sup>116</sup>, categorizado de acordo com a Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica<sup>117</sup>, peso normal de 18,5 - 24,9 kg/m<sup>2</sup> e sobrepeso  $\geq$  25,0 kg/m<sup>2</sup>.

Tabagismo foi caracterizado como consumo de qualquer tipo ou quantidade de tabaco, diariamente, há pelo menos seis meses; enquanto ex-fumante aquele que, tendo sido fumante, não tenha fumado qualquer tipo ou quantidade de tabaco nos últimos seis meses; e não fumante aquele que nunca tenha fumado, ou por pouco tempo ou de forma esporádica, qualquer tipo ou quantidade de tabaco, em qualquer período da vida<sup>118</sup>. Considerou-se etilismo o consumo de mais do que 21 unidades de álcool por semana para homens, e até 14 unidades de álcool por semana para mulheres, sendo que cada unidade de álcool equivale a 10g de álcool<sup>119</sup>.

### **2.3 Análise Estatística**

Foram utilizados os programas MiniTab, StatsDirect e GraphPad. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de Fisher ou teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para as variáveis quantitativas sem distribuição gaussiana foi empregado teste de Kruskal Wallis na comparação entre três ou mais grupos e Mann Whitney para dois grupos. A análise de regressão logística verificou a chance do evento (glioma) na presença de diferentes variáveis, utilizando teste de comparação múltipla. Para a análise de sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Foi admitido erro alfa de 5%.

*Resultados*



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Perfil da Casuística

Hábitos de vida e comorbidades são apresentados na Tabela 1. Tabagismo e etilismo prevaleceram em GE (40,0%; 47,0%, respectivamente), comparado a GC (24,6%; 16,7%;  $P=0,0088$ ;  $P=0,0001$ , respectivamente). O mesmo ocorreu para HAS (GE: 55,0% versus GC: 27,1%;  $P=0,0001$ ) e DM (22,0%; 8,4%, respectivamente;  $P=0,0011$ ), enquanto sobrepeso ou obesidade foram semelhantes entre os grupos (58,0%; 62,2%, respectivamente;  $P=0,6421$ ).

#### 3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos

##### ***CCND1-rs9344***

O genótipo heterozigoto (A/G) prevaleceu nos pacientes com gliomas (42,0%) e nos indivíduos controles (50,0%), seguido do homozigoto selvagem (G/G) e homozigoto mutante (A/A), sem diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ). Houve predominância do alelo selvagem (G) em GC (0,57) e GE (0,56;  $P=0,9497$ ; Tabela 2).

##### ***XRCC1-rs25487***

O genótipo selvagem (T/T) destacou-se em GE (46,0%) e GC (48,3%), seguido do genótipo heterozigoto (T/C) e homozigoto mutante (C/C). O alelo selvagem (T) prevaleceu em ambos os grupos (GE= 0,65; GC= 0,68; Tabela 3).

##### ***RTEL1-rs6010620***

A distribuição genotípica e alélica foi semelhante entre os grupos ( $P>0,05$ ), com destaque para o genótipo A/G (GE=99,0%; GC=100,0%;) e alelo mutante (G) (0,51 e 0,50  $P=0,9766$ ; respectivamente; Tabela 4).

***EGFR-rs1468727***

O genótipo heterozigoto (T/C) prevaleceu em ambos os grupos (GE= 86,0%; GC= 88,0%;  $P>0,05$ ), o mesmo ocorreu para o alelo selvagem (T) (0,57; 0,56, respectivamente), no entanto, sem diferença estatística entre os grupos ( $P=0,8674$ ; Tabela 5). O genótipo homozigoto mutante não foi observado em pacientes e controles.

***VEGF-rs2010963***

O genótipo homozigoto selvagem (G/G) mostrou-se prevalente em ambos os grupos (GE= 49,0%; GC= 44,8%), seguido dos genótipos heterozigoto (G/C) e homozigoto mutante (C/C), com semelhança entre os grupos ( $P>0,05$ ; Tabela 6). Em relação à frequência alélica, pacientes e controles apresentaram prevalência do alelo G (0,70 e 0,65, respectivamente;  $P=0,3748$ ; Tabela 6).

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg, realizada para todos os SNPs em ambos os grupos, mostrou distribuições genotípicas observadas semelhantes às esperadas para *CCND1-rs9344* (GE:  $\chi^2=2,4048$ ;  $P=0,12096$  e GC:  $\chi^2=0,1357$ ;  $P=0,71251$ ); *XRCC1-rs25487* (GE:  $\chi^2=2,7170$ ;  $P=0,09928$  e GC:  $\chi^2=2,4417$ ;  $P=0,11814$ ); *VEGF-rs2010963* (GE:  $\chi^2=0,1082$ ;  $P=0,74211$  e GC:  $\chi^2=1,4395$ ;  $P=0,23021$ ), o que não ocorreu para *RTEL1-rs6010620* (GE:  $\chi^2=N/C$ ;  $P=N/C$  e GC:  $\chi^2=203$ ;  $P=0,00000$ ) e *EGFR-rs1468727* (GE:  $\chi^2=56,9098$ ;  $P=0,00000$  e GC:  $\chi^2=126,2264$ ;  $P=0,00000$ ).

**Tabela 1.** Distribuição de comorbidades e hábitos de vida em pacientes com gliomas (GE) e indivíduos sem sinais da doença (grupo controle - GC).

Variáveis	GE (N =100)		GC (N = 203)		Valor -P
	N	%	N	%	
<b>Hábitos de Vida</b>					
<b>Tabagismo</b>	39	39,0	50	24,6	<b>0,0088</b>
<b>Etilismo</b>	47	47,0	34	16,7	<b>0,0001</b>
<b>Comorbidades</b>					
<b>HAS</b>	55	55,0	55	27,1	<b>0,0001</b>
<b>Diabetes Mellitus</b>	22	22,0	17	8,4	<b>0,0011</b>
<b>IMC ≥25 kg/m<sup>2</sup></b>	56	56,0	60*	62,2	0,6421

\*Qui-quadrado; N = Número de indivíduos; HAS = Hipertensão arterial sistêmica; IMC = Índice de massa corporal; \* calculo considerando 98 indivíduos.

**Tabela 2.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *CCND1*- rs9344 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>CCND1</i> rs9344 G>A		GE		GC		*P GExGC
	N	%	N	%	N	%	
<b>Selvagem</b>	36	36,0	65	32,0	0,5744		
<b>Heterozigoto</b>	42	42,0	102	50,0	0,1684		
<b>Mutante</b>	23	23,0	36	18,0	0,3502		
<b>Total</b>	100	100	203	100			
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>			
G	113	0,56	232	0,57	0,9497		
A	87	0,44	174	0,43			
<b>Total</b>	200	1	406	1			

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher GE = Grupo estudo; GC = Grupo controle; N = Número de indivíduos; Freq. Abs. = Frequência absoluta; *CCND1* = *Cyclin D1*; G= Alelo selvagem; A= Alelo de risco.

**Tabela 3.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *XRCC1*- rs25487 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>XRCC1</i> rs25487 T>C		GE		GC		*P GExGC
	N	%	N	%	N	%	
<b>Selvagem</b>							
T/T	46	46,0	98	48,3			0,8020
<b>Heterozigoto</b>							
T/C	38	38,0	79	38,9			0,9772
<b>Mutante</b>							
C/C	16	16,0	26	12,8			0,5623
<b>Total</b>	100	100	203	100			
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
T	130	0,65	275	0,68			0,5616
C	70	0,35	131	0,32			
<b>Total</b>	200	1	406	1			

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher; GE = Grupo estudo; GC = Grupo controle; N = Número de indivíduos; Freq. Abs. = Frequência absoluta; *XRCC1* = *X-ray repair cross complementing group 1*; T= Alelo selvagem; C= Alelo de risco.

**Tabela 4.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *RTEL1*-rs6010620 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>RTEL1</i> rs6010620 A>G		GE		GC		*P GExGC
	N	%	N	%	N	%	
<b>Selvagem</b>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	N/C
<b>Heterozigoto</b>	99	99,0	99	99,0	203	100,0	0,3311
<b>Mutante</b>	1	1,0	1	1,0	0	0,0	0,3300
<b>Total</b>	100	100	100	100	203	100	
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
A	99	0,49	99	0,49	203	0,50	0,9766
G	101	0,51	101	0,51	203	0,50	
<b>Total</b>	200	1	200	1	406	1	

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher; GE = Grupo estudo; GC = Grupo controle; N = Número de indivíduos; Freq. Abs. = Frequência absoluta;

*RTEL1* = *Regulator of telomere elongation helicase 1*; A = Alelo selvagem; G = Alelo de risco e NC = Não calculado.

**Tabela 5.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *EGFR*- rs1468727 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>EGFR</i> rs1468727 T>C		GE		GC		*P GExGC
	N	%	N	%	N	%	
<b>Selvagem</b>							
T/T	14	14,0	24	12,0			0,7236
<b>Heterozigoto</b>							
T/C	86	86,0	179	88,0			0,7236
<b>Mutante</b>							
C/C	0	0,0	0	0,0			N/C
<b>Total</b>	100	100	203	100			
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
T	114	0,57	227	0,56			0,8674
C	70	0,43	179	0,44			
<b>Total</b>	200	1	406	1			

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher; GE = Grupo estudo; GC = Grupo controle; N = Número de indivíduos; Freq. Abs.= Frequência absoluta; *EGFR* = *Epidermal growth factor receptor*; T= Alelo selvagem; C= Alelo de risco e NC = Não calculado.

**Tabela 6.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *VEGF*- rs2010963 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>VEGF</i> rs2010963 G>C		GE		GC		*P GExGC
	N	%	N	%	N	%	
<b>Selvagem</b>	49	49,0	91	44,8			0,5738
<b>Heterozigoto</b>	41	41,0	84	41,4			0,9497
<b>Mutante</b>	10	10,0	28	13,8			0,4514
<b>Total</b>	100	100	203	100			
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
G	139	0,70	266	0,65			0,3748
C	61	0,30	140	0,35			
<b>Total</b>	200	1	406	1			

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher; GE = Grupo estudo; GC = Grupo controle; N = Número de indivíduos; Freq. Ab.= Frequência absoluta; *VEGF* = *Vascular endothelial growth factor* ; T= Alelo selvagem; C= Alelo de risco.



### 3.3 Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades

Análise comparativa da distribuição dos genótipos em relação ao tabagismo é apresentada na Tabela 7. Houve semelhança intragrupo para tabagismo em portadores de genótipos de risco e genótipo selvagem, para todos os polimorfismos ( $P > 0,05$ ). A análise entre grupos mostrou para *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs601062 e *EGFR*-rs1468727 prevalência de tabagismo em pacientes portadores de genótipos de risco ( $\_ / A$ ,  $\_ / C$ ,  $\_ / G$  e  $\_ / C$ , respectivamente), comparado a controles ( $P = 0,0046$ ,  $P = 0,0465$ ,  $P = 0,0144$  e  $P = 0,0110$ , respectivamente). Por outro lado, *VEGF*-rs2010963 apresentou semelhança entre os grupos ( $P = 0,5307$ ).

A Tabela 8 apresenta frequência de etilismo de acordo com os genótipos. Na análise intragrupo observou-se semelhança entre os grupos para os polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1* e *EGFR* ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, para *VEGF*, em indivíduos do grupo controle portadores do genótipo de risco ( $\_ / C$ ), prevaleceu etilismo (74,0% versus não etilismo: 51,0%;  $P = 0,0300$ ). A análise entre grupos mostrou para *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487 e *VEGF*-rs2010963 maior frequência de etilismo em pacientes com genótipos de risco ( $\_ / A$ ,  $\_ / C$  e  $\_ / C$ , respectivamente), assim como genótipos selvagens (G/G, T/T e G/G, respectivamente em relação aos controles ( $P < 0,05$ ; Tabela 8). Para *RTEL1*-rs6010620 e *EGFR*-rs1468727 prevaleceu etilismo e presença de genótipos de risco ( $\_ / G$ ) nos pacientes, comparado a controles ( $P < 0,0001$ , para ambos).

**Tabela 7.** Frequência de tabagismo de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCCI*-rs25487, *RTELI*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963 em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE			GC			*P
	Tabagismo	Não Tabagismo	%	Tabagismo	Não Tabagismo	%	
	N	N	%	N	N	%	GEXGC
<b><i>CCND1</i>-rs9344</b>							
_/A	27	37	61,0	30	108	71,0	<b>0,0046</b>
G/G	12	24	39,0	20	45	29,0	0,9665
Total	39	61	100	50	153	100	
*P			0,5107			0,2230	
<b><i>XRCCI</i>-rs25487</b>							
_/C	23	31	51,0	27	78	51,0	<b>0,0465</b>
T/T	16	30	49,0	23	75	49,0	0,2212
Total	39	61	100	50	153	100	
*P			0,5536			0,8353	
<b><i>RTELI</i>-rs6010620</b>							
_/G	39	61	100,0	50	153	100,0	<b>0,0144</b>
A/A	0	0	0,0	0	0	0,0	N/C
Total	39	61	100	50	153	100	
*P			N/C			N/C	
<b><i>EGFR</i>-rs1468727</b>							
_/C	35	51	84,0	44	135	88,0	<b>0,0110</b>
T/T	4	10	16,0	6	18	12,0	1,0000
Total	39	61	100	50	153	100	
*P			0,5566			0,9643	
<b><i>VEGF</i>-rs2010963</b>							
_/C	22	29	48,0	30	82	54,0	0,0580
G/G	17	32	52,0	20	71	46,0	0,1537
Total	39	61	100	50	153	100	
*P			0,5091			0,5307	

N= números de indivíduos; *CCND1*= Cyclin D1; *XRCCI*= X-ray repair cross complementing group 1; *RTELI*= Regulator of telomere elongation helicase 1; *EGFR*= Epidermal growth factor receptor; *VEGF*= Vascular endothelial growth factor; NC=não calculado; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

**Tabela 8.** Frequência de etilismo de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE			GC			*P
	Etilismo	Não Etilismo		Etilismo	Não Etilismo		
	N	%	N	N	%	N	GEXGC
<b><i>CCND1</i>-rs9344</b>							
_/A	27	59,0	37	24	71,0	114	67,0
G/G	19	41,0	17	10	29,0	55	33,0
Total	46	100	54	34	100	169	100
*P		0,4174			0,8762		<b>0,0003</b> <b>0,0002</b>
<b><i>XRCC1</i>-rs25487</b>							
_/C	28	61,0	26	19	56,0	86	51,0
T/T	18	39,0	28	15	44,0	83	49,0
Total	46	100	54	34	100	169	100
*P		0,2842			0,7311		< <b>0,0001</b> <b>0,0031</b>
<b><i>RTEL1</i>-rs6010620</b>							
_/G	46	100,0	54	34	100,0	169	100,0
A/A	0	0,0	0	0	0,0	0	0,0
Total	46	100	54	34	100	169	100
*P		N/C			N/C		< <b>0,0001</b> N/C
<b><i>EGFR</i>-rs1468727</b>							
_/C	41	89,0	45	31	91,0	148	88,0
T/T	5	11,0	9	3	9,0	21	12,0
Total	46	100	54	34	100	169	100
*P		0,5868			0,7724		< <b>0,0001</b> 0,1166
<b><i>VEGF</i>-rs2010963</b>							
_/C	26	57,0	25	25	74,0	87	51,0
G/G	20	43,0	29	9	26,0	82	49,0
Total	46	100	54	34	100	169	100
*P		0,4129			<b>0,0300</b>		<b>0,0005</b> < <b>0,0001</b>

N= Números de indivíduos; *CCND1*= Cyclin D1; *XRCC1*= X-ray repair cross complementing group 1; *RTEL1*= Regulator of telomere elongation helicase 1; *EGFR*= Epidermal growth factor receptor; *VEGF*= Vascular endothelial growth factor; NC=não calculado; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

Para HAS, distribuída de acordo com os genótipos dos respectivos polimorfismos, notou-se semelhança na análise intragrupo ( $P > 0,05$ ). Na análise entre grupos observou-se para *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487 e *VEGF*-rs2010963, prevalência de genótipos de risco ( $\_ / A$ ,  $\_ / C$  e  $\_ / C$ , respectivamente), assim como de genótipo selvagem ( $G / G$ ,  $T / T$  e  $G / G$ , respectivamente) em pacientes com HAS, comparado a controles ( $P < 0,05$ ; Tabela 9). Para *RTEL1*-rs6010620 e *EGFR*-rs1468727 prevaleceram os genótipos de risco ( $\_ / G$  e  $\_ / C$ , respectivamente) nos pacientes, comparado aos controles ( $P < 0,0001$ , para ambos).

Com relação a DM (Tabela 10), notou-se semelhança intragrupos para todos os polimorfismos ( $P > 0,05$ ). A análise entre grupos mostrou prevalência dos genótipos de risco para *CCND1* ( $\_ / A$ ), *RTEL1* ( $\_ / G$ ), *EGFR* ( $\_ / C$ ) e *VEGF* ( $\_ / C$ ) em pacientes com DM comparado aos controles ( $P < 0,05$ ; Tabela 10). Por outro lado, para *XRCC1* houve maior frequência do genótipo selvagem ( $T / T$ ) nos pacientes com DM, comparado ao grupo controle ( $P = 0,0117$ ).

A Tabela 11 mostra a distribuição de indivíduos eutróficos e com sobrepeso ou obesidade de acordo com os genótipos, com semelhança intra e entre grupos para todos os polimorfismos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 9.** Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCCI*-rs25487, *RTELI*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE			GC			*P	
	HAS	Não HAS	HAS	Não HAS	HAS	Não HAS		
	N	%	N	%	N	%	GEXGC	
<b><i>CCND1</i>-rs9344</b>								
_/A	31	56,0	33	73,0	36	65,0	102	69,0
G/G	24	44,0	12	27,0	19	35,0	46	31,0
Total	55	100	45	100	55	100	148	100
*P	0,1213			0,7634				
<b><i>XRCCI</i>-rs25487</b>								
_/C	30	55,0	24	53,0	30	55,0	75	51,0
T/T	25	45,0	21	47,0	25	45,0	73	49,0
Total	55	100	45	100	55	100	148	100
*P	0,9037			0,7396				
<b><i>RTELI</i>-rs6010620</b>								
_/G	55	100,0	45	100,0	55	100,0	148	100,0
A/A	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	55	100	45	100	55	100	148	100
*P	N/C			N/C				
<b><i>EGFR</i>-rs1468727</b>								
_/C	49	89,0	37	82,0	47	85,0	132	89,0
T/T	6	11,0	8	18,0	8	15,0	16	11,0
Total	55	100	45	100	55	100	148	100
*P	0,4870			0,6256				
<b><i>VEGF</i>-rs2010963</b>								
_/C	32	58,0	19	42,0	31	56,0	81	55,0
G/G	23	42,0	26	58,0	24	44,0	67	45,0
Total	55	100	45	100	55	100	148	100
*P	0,1654			0,9607				

N= números de indivíduos; *CCND1*= *Cyclin D1*; *XRCCI*= *X-ray repair cross complementing group 1*; *RTELI*= *Regulator of telomere elongation helicase 1*; *EGFR*= *Epidermal growth factor receptor*; *VEGF*= *Vascular endothelial growth factor*; NC=não calculado; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

**Tabela 10.** Frequência de diabetes mellitus (DM) de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCC1*-rs25487, *RTEL1*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963, em pacientes com glioma (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE			GC			*P
	DM	Não DM	%	DM	Não DM	%	
	N	N	%	N	N	%	GEXGC
<b><i>CCND1</i>-rs9344</b>							
_/A	14	49	64,0	9	129	70,0	<b>0,0027</b>
G/G	8	26	36,0	8	57	30,0	0,2490
Total	22	75	100	17	186	100	
*P		0,8834			0,2640		
<b><i>XRCC1</i>-rs25487</b>							
_/C	11	43	50,0	9	96	52,0	0,0612
T/T	11	32	50,0	8	90	48,0	<b>0,0117</b>
Total	22	75	100	17	186	100	
*P		0,7153			0,9164		
<b><i>RTEL1</i>-rs6010620</b>							
_/G	22	75	100,0	17	186	100,0	<b>0,0011</b>
A/A	0	0	0,0	0	0	0,0	N/C
Total	22	75	100	17	186	100	
*P		N/C			N/C		
<b><i>EGFR</i>-rs1468727</b>							
_/C	18	65	82,0	15	164	88,0	<b>0,0048</b>
T/T	4	10	18,0	2	22	12,0	0,1673
Total	22	75	100	17	186	100	
*P		0,8227			0,9938		
<b><i>VEGF</i>-rs2010963</b>							
_/C	14	36	64,0	7	105	56,0	<b>0,0004</b>
G/G	8	39	36,0	10	81	44,0	0,4651
Total	22	75	100	17	186	100	
*P		0,2947			0,3383		

N= números de indivíduos; *CCND1*= Cyclin D1; *XRCC1*= X-ray repair cross complementing group 1; *RTEL1*= Regulator of telomere elongation helicase 1; *EGFR*= Epidermal growth factor receptor; *VEGF*= Vascular endothelial growth factor; NC=não calculado; \* Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

**Tabela 11.** Distribuição de pacientes com glioma (GE) e controles (GC) considerando índice de massa corporal (IMC: eutrofia - <24,99kg/m<sup>2</sup> e sobrepeso ou obesidade - ≥25kg/m<sup>2</sup>) e genótipos de *CCND1*-rs9344, *XRCCI*-rs25487, *RTELI*-rs6010620, *EGFR*-rs1468727 e *VEGF*-rs2010963.

Genótipo	GE			GC•			*P		
	IMC ≥25 kg/m <sup>2</sup> N	%	Não IMC <24,99 kg/m <sup>2</sup> N	IMC ≥25 kg/m <sup>2</sup> %	Não IMC <24,99 kg/m <sup>2</sup> N	IMC <24,99 kg/m <sup>2</sup> %	GE	GC	*P
<b><i>CCND1</i>-rs9344</b>									
_/A	36	64,0	28	64,0	37	62,0	28	74,0	0,9385
G/G	20	36,0	16	36,0	23	38,0	10	26,0	0,3359
Total	56	100	44	100	60	100	38	100	
*P	0,9465			0,3138					
<b><i>XRCCI</i>-rs25487</b>									
_/C	31	55,0	23	52,0	38	63,0	17	45,0	0,2861
T/T	25	45,0	21	48,0	22	37,0	21	55,0	0,9296
Total	56	100	44	100	60	100	38	100	
*P	0,9163			0,1099					
<b><i>RTELI</i>-rs6010620</b>									
_/G	56	100,0	44	100,0	60	100,0	38	100,0	0,5472
A/A	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	N/C
Total	56	100	44	100	60	100	38	100	
*P	N/C			N/C					
<b><i>EGFR</i>-rs1468727</b>									
_/C	50	89,0	36	82,0	49	81,0	29	76,0	0,6511
T/T	6	11,0	8	18,0	11	19,0	9	24,0	0,7275
Total	56	100	44	100	60	100	38	100	
*P	0,5472			0,7016					
<b><i>VEGF</i>-rs2010963</b>									
_/C	30	54,0	21	48,0	36	60,0	20	53,0	0,7029
G/G	26	46,0	23	52,0	24	40,0	18	47,0	0,8581
Total	56	100	44	100	60	100	38	100	
*P	0,2857			0,6110					

N= números de indivíduos; *CCND1*= *Cyclin D1*; *XRCCI*= *X-ray repair cross complementing group 1*; *RTELI*= *Regulator of telomere elongation helicase 1*; *EGFR*= *Epidermal growth factor receptor*; *VEGF*= *Vascular endothelial growth factor*; NC=não calculado; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado; •N=98 indivíduos.

### 3.4 Relação entre Polimorfismos Genéticos e Histopatologia

A Tabela 12 apresenta a distribuição genotípica (homozigoto selvagem versus genótipos com alelo de risco), de acordo com os graus histológicos do tumor. Destacaram-se os genótipos de risco de *CCND1*-rs9344 ( $\_ / A$ ), *RTEL1*-rs601620 ( $\_ / G$ ) e *EGFR*-rs1468727 em todos os tipos histológicos. Para *XRCC1*-rs25487 e *VEGF*-rs2010963 houve predomínio dos genótipos de risco ( $\_ / C$ , para ambos) nos Graus I (57,0%, para ambos) e IV (59,0% e 53,0%, respectivamente), enquanto o homozigoto selvagem (T/T e G/G, respectivamente) nos Graus II (71,0%, para ambos) e Grau III para *XRCC1* (56,0%). Houve semelhança na distribuição dos genótipos nos quatro graus histológicos, para todos os polimorfismos analisados ( $P > 0,05$ ).



**Tabela 12.** Frequência dos graus histológicos de acordo com os genótipos de *CCND1*-rs9344; *XRCC1*-rs25487; *RTEL1*-rs601620; *EGFR*-1468727 e *VEGF*-rs2010963 em pacientes com gliomas.

	<i>CCND1</i> -rs9344		<i>XRCC1</i> -rs25478		<i>RTEL1</i> -rs601620		<i>EGFR</i> -rs1468727		<i>VEGF</i> -rs2010963						
Tipo Histológico	GG	_A	P	TT	_C	P	AA	_G	P	TT	_C	P	GG	_C	P
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<b>Grau I</b> N=7	0(0,0)	7(100,0)	0,1858	3(43,0)	4(57,0)	0,9269	0(0,0)	7(100,0)	N/C	1(14,0)	6(86,0)	1,0000	3(43,0)	4(57,0)	1,0000
<b>Grau II</b> N=7	1(14,0)	6(86,0)	0,6696	5(71,0)	2(29,0)	0,2428	0(0,0)	7(100,0)	N/C	2(29,0)	5(71,0)	0,2531	5(71,0)	2(29,0)	0,2642
<b>Grau III</b> N=18	6(33,0)	12(67,0)	0,7897	10(56,0)	8(44,0)	0,5240	0(0,0)	18(100,0)	N/C	4(22,0)	14(78,0)	0,2728	9(50,0)	9(50,0)	1,0000
<b>Grau IV</b> N=68	21(31,0)	47(69,0)	0,4858	28(41,0)	40(59,0)	0,2318	0(0,0)	68(100,0)	N/C	7(10,0)	61(90,0)	0,1334	32(47,0)	36(53,0)	0,6693

\*Teste Qui-quadrado ou Fisher; *CCND1* = *Cyclin D1*; *XRCC1* = *X-ray repair cross complementing group 1*; *RTEL1* = *Regulator of telomere elongation helicase 1*; *EGFR* = *Epidermal growth factor receptor*; *VEGF* = *Vascular endothelial growth factor* e N/C = Não calculado.

### 3.5 Análise do Perfil Anatomorfológico

A análise anátomorfológico (Tabela 13) mostrou localização de tumores de alto grau em duas (Grau III – 33,0%) ou mais regiões (Grau IV – 35,0%). Em relação ao hemisfério, predominou o lado esquerdo para o Grau IV (63,0%), quando comparado aos demais graus (56,0%; 50,0% e 33,0%). Tumores com tamanho  $\geq 5$  cm foram mais frequentes entre os gliomas de alto grau (III- 86,0% e IV- 64,0%). Houve recidiva em todos os pacientes com grau II, enquanto para o Grau I= 43,0%, Grau III= 45,0% e Grau IV= 25,0%.

**Tabela 13.** Análise do perfil anatomorfológico por ressonância magnética em pacientes com glioma.

	Perfil Morfológico							
	Grau I		Grau II		Grau III		Grau IV	
<b>Localização</b>	N=6	%	N=6	%	N=9	%	N=37	%
Frontal	1	16,6	3	50,0	2	22,2	-	-
Parietal	1	16,6	-	-	2	22,2	8	22,0
Temporal	-	-	1	16,6	1	11,1	6	16,0
Occipital	-	-	-	-	-	-	2	5,0
*Outros	3	50,0	1	16,6	-	-	1	3,0
Duas regiões	1	16,6	-	-	3	33	7	19,0
Mais que duas	-	-	1	16,6	1	11,1	13	35,0
<b>Hemisfério</b>	N=6	%	N=6	%	N=9	%	N=38	%
Esquerdo	3	50,0	2	33,3	5	56,0	24	63,0
Direito	3	50,0	3	50,0	4	44,0	11	29,0
Bilateral	-	-	1	16,6	-	-	3	8,0
<b>Tamanho</b>	N=3	%	N=3	%	N=7	%	N=33	%
<5	-	-	3	100,0	1	14,0	12	36,0
≥5	3	100,0	-	-	6	86,0	21	64,0
<b>Recidiva</b>	N=7	%	N=5	%	N=18	%	N=68	%
Sim	3	43,0	5	100,0	8	44,0	17	25,0
Não	4	57,0	-	-	10	56,0	51	75,0
<b>Necrose</b>	N= 2	%	N=3	%	N=4	%	N=24	%
Sim	2	100,0	1	33,0	4	100,0	24	100,0
Não	0	0,0	2	67,0	0	0,0	0	0,0

N= Número de indivíduos; - = Ausência de informação; \*Outros = Núcleos da base, intra-axial, corpo caloso e ínsula.

### 3.6 Análise de Regressão Logística

Na análise de regressão logística para identificação de variáveis independentes e respectiva chance de o indivíduo ter glioma, foram utilizados os genótipos com pelo menos um alelo de risco para a doença e as demais variáveis referentes a hábitos de vida e comorbidades, identificando-se como fatores de risco independentes para glioma: etilismo, HAS, DM ( $P < 0,0001$ ;  $P = 0,0069$  e  $P = 0,0394$ ; respectivamente). Equação da regressão logística: (logit  $Y = -1,229206 + 0,225365$  Tabagismo  $+1,376$  Etilismo  $+0,786414$  HAS  $+0,822675$  DM  $+0,031992$  *CCND1*  $+0,018149$  *XRCCI*  $-0,272917$  *EGFR*  $-0,403889$  *VEGF*; Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise de regressão logística considerando hábitos de vida e comorbidades, além dos genótipos de risco dos polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF* em pacientes com gliomas e indivíduos sem a doença.

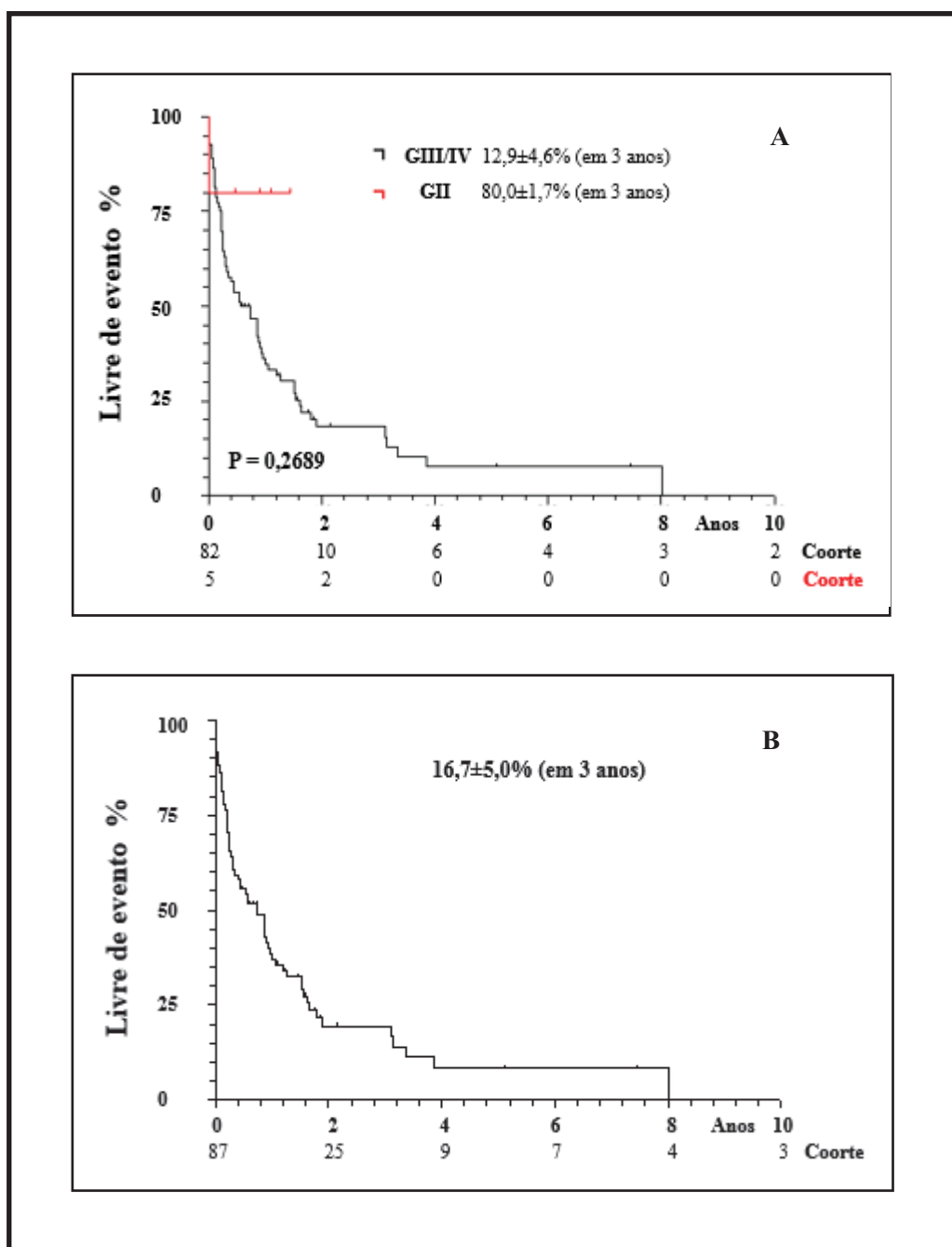
Variáveis	Razão de Chance (IC 95%)	Valor P
<b>Tabagismo</b>	1,25 (0,69-2,25)	0,4536
<b>Etilismo</b>	3,95 (2,17-7,20)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>HAS</b>	2,19 (1,24-3,88)	<b>0,0069</b>
<b>DM</b>	2,27 (1,04-4,98)	<b>0,0394</b>
<i>CCND1</i> – rs9344 _/_A	1,03 (0,58-1,81)	0,9119
<i>XRCC1</i> – rs25487 _/_C	1,01 (0,59-1,74)	0,9473
<i>EGFR</i> – rs1468727 _/_C	0,76 (0,34-1,69)	0,5037
<i>VEGF</i> – rs2010963 _/_C	0,66 (0,38-1,14)	0,1452

IC= Intervalo de confiança; HAS= Hipertensão arterial sistêmica; DM= Diabetes mellitus; *CCND1* = *Cyclin D1*; *XRCC1* = *X-ray repair cross complementing group 1*; *EGFR* = *Epidermal growth factor receptor*; *VEGF* = *Vascular endothelial growth factor*.

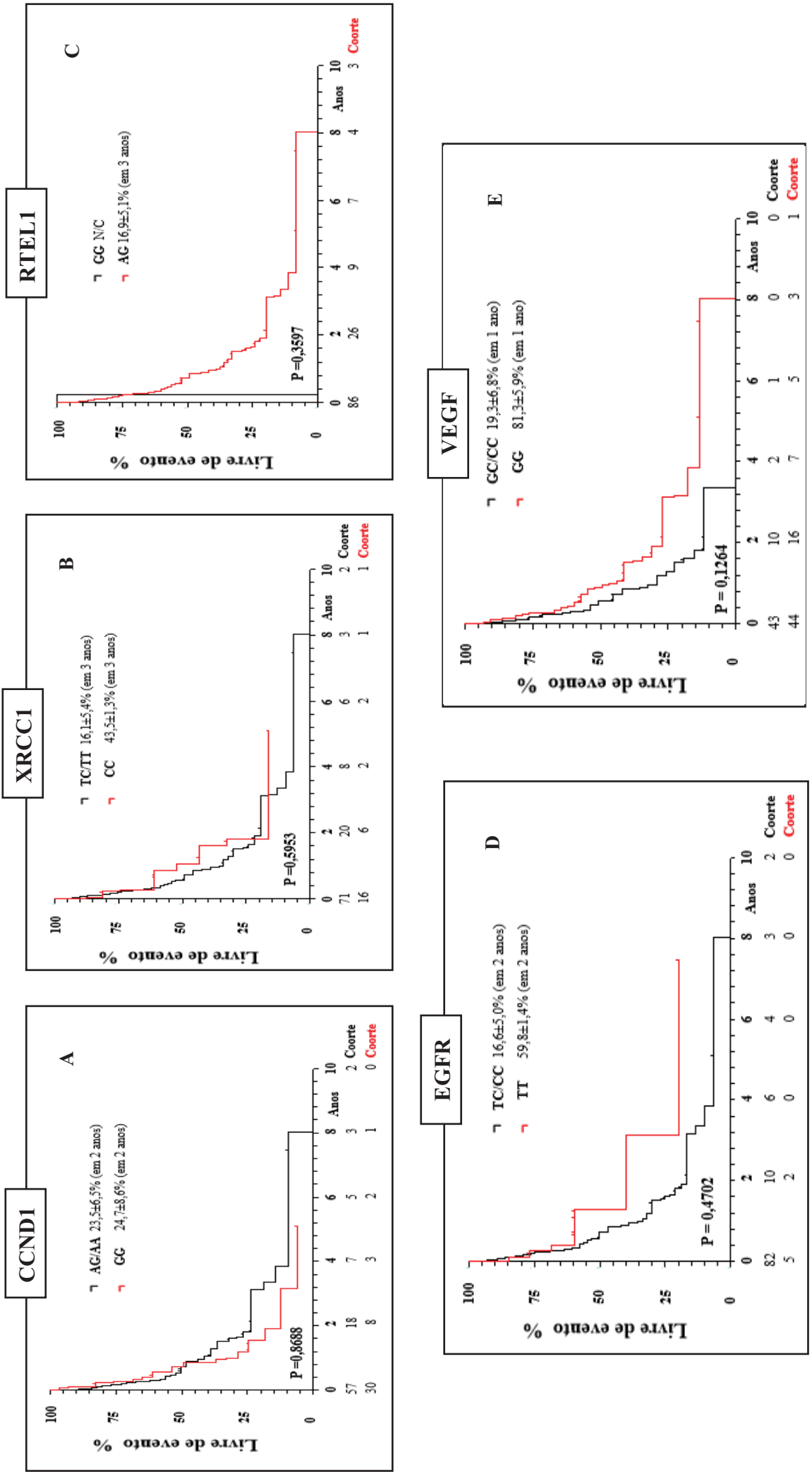
### 3.7 Análise de Sobrevida

Participaram desta análise apenas os pacientes de Grau II, III e IV. A curva atuarial de Kaplan-Meier avaliou a sobrevida dos pacientes com gliomas considerando o período a partir da cirurgia do paciente. A comparação entre gliomas de baixo grau (II) e alto grau (III-IV) mostrou prevalência de livres do evento/óbito nos pacientes com gliomas de baixo grau ( $80,0 \pm 1,7\%$  em 3 anos), comparado a gliomas de alto grau ( $12,9 \pm 4,6\%$  em 3 anos;  $P=0,2689$ ), porém sem diferença estatística (Figura 9A). A análise da casuística total mostrou  $16,7 \pm 5,0\%$  de pacientes livres do evento/óbito em três anos (Figura 9B).

Na análise de sobrevida houve semelhança entre os genótipos de risco e o genótipo selvagem para todos os polimorfismos analisados ( $P>0,05$ ; Figura 10). Em relação à resposta ao tratamento (Figura 11), a combinação de Temozolamida (TMZ) e radioterapia (RT) como adjuvante (TMZ+RT) conferiu acréscimo de sobrevida aos pacientes ( $78,7 \pm 7,6\%$  em 20 meses), comparado àqueles submetidos apenas a TMZ ( $21,9 \pm 5,1\%$  em 20 meses), entretanto, sem diferença significativa ( $P=0,8711$ ).

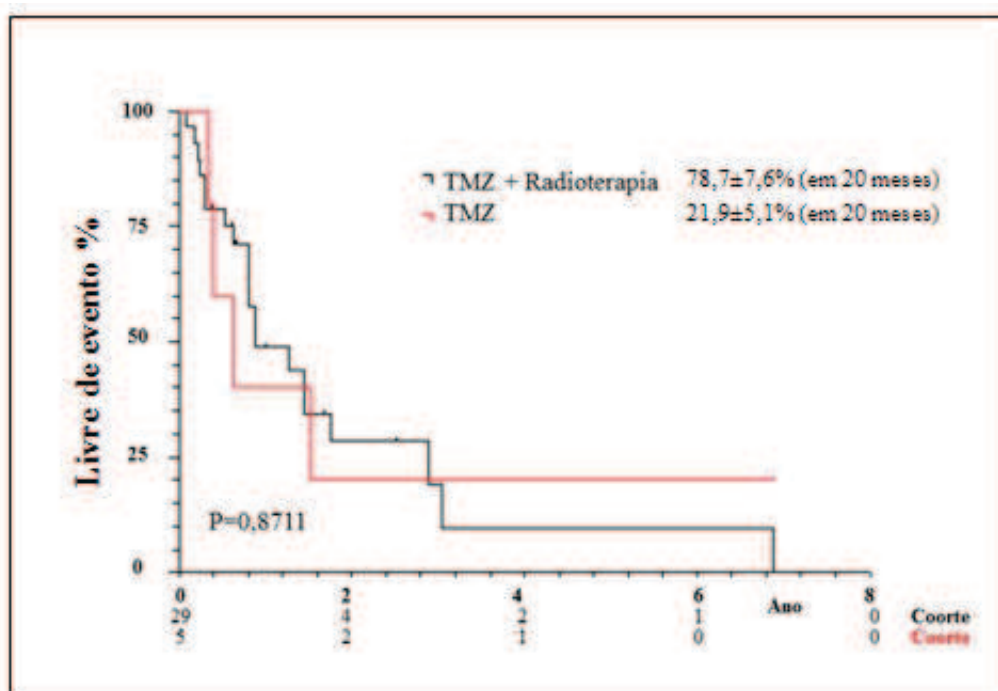


**Figura 9.** Curva atuarial de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livres de evento/óbito) em pacientes com gliomas. A) Análise de acordo com a gravidade da doença; B) Grupo total, independente da gravidade da doença. GII= grau II; GIII= grau III; GIV= grau IV; Teste Log Rank.



**Figura 10.** Curva de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livre de evento/óbito) em pacientes com gliomas, relacionados aos genótipos: A) *CCND1* (Cyclin D1) = genótipo GG e AG/AA; B) *XRCCI* (*X-ray repair cross complementing group 1*) = genótipo TT e TC/CC; C) *RTEL1*(*Regulator of telomere elongation helicase 1*) = genótipo AG; D) *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*) = genótipo TT e TC e E) *VEGF* (*Vascular endothelial growth factor*) = genótipo GG e GC/CC; Teste Log Rank.





**Figura 11.** Curva de Kaplan-Meier na análise de sobrevida (livre de evento/óbito) em pacientes com gliomas que receberam tratamento com Temozolamida (TMZ) e radioterapia; Teste Log Rank.

*Discussão*

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas variantes genéticas relacionadas ao ciclo celular, integridade e reparo de DNA, sinalização intracelular e angiogênese, visando avaliar sua associação com glioma, além de outros fatores incluindo tabagismo, ingestão de bebidas alcoólicas e comorbidades como HAS, DM, IMC alterado e perfil clínico anatomorfológico/funcional. Referências, particularmente de polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1* e *VEGF* associados à gliomas são escassas na literatura, tornando este estudo inédito em casuística brasileira.

O tabagismo prevaleceu nos pacientes com glioma, ressaltando-se o ineditismo em casuística brasileira, cuja associação foi demonstrada também em estudo caso-controle realizado em população chinesa<sup>55</sup>. A barreira hematoencefálica (BHE) possui a função de manter a homeostase cerebral, bloqueando seletivamente diversas substâncias endógenas e cancerígenas. O cigarro possui diversos compostos químicos como nicotina e N-nitroso, capazes de atravessar a BHE, provocando modificações em diversas vias, prejudicando a função endotelial, além de proliferação e migração celular, ocasionando distintos tipos de tumores<sup>55,120</sup>. Esta associação foi demonstrada também em estudo experimental realizado em ratos submetidos, por via intravenosa, ao composto N-nitroso presente no cigarro, com indução de glioma<sup>121</sup>.

Etilismo destacou-se também em pacientes com glioma comparado ao grupo controle. Associação entre consumo de álcool e risco de glioma tem sido explorado com resultados conflitantes<sup>122</sup>. É amplamente aceito que o consumo de álcool é um dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer depois do uso de tabaco<sup>122</sup>. Este achado corrobora estudo realizado em casuística austríaca<sup>123</sup>. Sabe-se que o álcool é capaz de atravessar a BHE, e tem sido considerado fator de risco para vários tipos de tumores<sup>53</sup>. Portanto, o álcool poderia desempenhar um papel cancerígeno diretamente

no cérebro, pois o etanol é oxidado em acetaldeído, produto altamente tóxicos para as células, com efeito neurocarcinogênico já constatado em animais<sup>123</sup>.

Em relação às comorbidades, HAS prevaleceu no pacientes, corroborando o estudo de Houben et al. (2006)<sup>123</sup> que relacionou a doença como preditor para desenvolvimento de glioma. Várias hipóteses podem explicar a maior prevalência de hipertensão em pacientes com glioma, como o aumento da pressão intracraniana ou compressão do tronco cerebral<sup>124</sup>. Sabe-se também, que gliomas de alto grau produzem citocinas e substâncias vasoativas envolvidas na angiogênese e remodelação vascular<sup>125</sup>. Outra hipótese são os efeitos potencialmente neurocarcinogênicos causados por medicamentos anti-hipertensivos, ou de seus metabólitos<sup>124</sup>.

Destacou-se também no presente estudo prevalência de DM nos pacientes comparado a controles, corroborando estudo em casuística alemã<sup>126</sup>. DM é uma das doenças mais comuns do sistema endócrino, provocando aumento nos níveis de glicose no sangue, também conhecida como hiperglicemia<sup>127</sup>. Em GBM, hiperglicemia foi associada a crescimento proeminente de células malignas *in vitro*, após a retirada de glicose observou-se aumento significativo das taxas de apoptose<sup>128</sup>.

Além disso, obesidade e excesso de peso fornecem microambiente favorável para células malignas, tendo em vista a presença de níveis elevados de insulina, promovendo a angiogênese e inibição da apoptose em pacientes diabéticos<sup>129</sup>. Há referência de valores elevados de IMC relacionados com tumores cerebrais<sup>130,131</sup>, embora não confirmado nesta casuística, assim como em outro estudo<sup>130</sup>. No entanto, o IMC merece maior atenção, com possível papel na fisiopatologia de gliomas<sup>132</sup>.

Com relação ao perfil genético, neste estudo, assim como em casuística chinesa<sup>133</sup>, não se confirma associação de *CCND1*- rs9344 (éxon) com glioma. O genótipo selvagem (G/G), assim como o alelo (G), prevaleceu em pacientes e controles.

Por outro lado, há referências da associação entre esse polimorfismo e câncer de tireoide e mama<sup>134,135</sup>, no entanto são escassos estudos em população brasileira. Ciclina D1, codificada pelo gene *CCND1*, é uma importante proteína reguladora da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular e possui grande impacto sobre a regulação da proliferação e diferenciação celular<sup>78</sup>. Nesse caso, SNPs podem alterar a função e atividade de *CCND1*, conseqüentemente, causando diferenças na susceptibilidade individual para a progressão do câncer<sup>78</sup>.

O polimorfismo *XRCC1*-rs25487 (éxon), também não mostrou associação com glioma. O genótipo selvagem (T/T) prevaleceu em ambos os grupos, seguido pelo genótipo heterozigoto (T/C), corroborando estudo em casuística brasileira e chinesa<sup>139,140</sup>. Entretanto, uma meta-análise realizada por Han (2013)<sup>141</sup> sugeriu que o polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln foi associado a aumento significativo do risco de glioma em asiáticos, mas não em caucasianos, indicando um possível papel das diferenças étnicas entre a genética e o meio ambiente em que vivem.

Mutações de *XRCC1* têm sido correlacionadas com susceptibilidade do tumor. Estudos mostram polimorfismos de *XRCC1* associados ao desenvolvimento de câncer de pulmão, colo retal, ovário, tireoide e esôfago<sup>142-147</sup>. A proteína sintetizada pelo gene *XRCC1* atua como papel crucial na via de reparo por excisão de bases (BER), sua função é reparar danos causados por quebras de cadeias simples do DNA, decorrentes de fatores internos e externos como exposição a radiações ionizantes e agentes alquilantes, ocasionando estabilidade genética<sup>140</sup>. Variantes genéticas que envolvem mudanças nas sequências de aminoácidos podem alterar a função de *XRCC1*, diminuindo a cinética de reparação em alguns indivíduos e, conseqüentemente, aumento do risco para glioma<sup>68</sup>.

Em relação à *RTEL1*-rs6010620, que codifica uma enzima conhecida como helicase de DNA, desempenha um papel crucial na regulação do comprimento dos telômeros<sup>148</sup>. A manutenção e reparo dos telômeros de DNA são processos essenciais que previnem a instabilidade do genoma e câncer<sup>70</sup>. Portanto, a perda da função de *RTEL1* induz ao encurtamento dos telômeros e quebras cromossômicas. Helicase é uma proteína chave na reparação de quebras de cadeias simples, pelo envolvimento direto na via de reparação de (DSB), do inglês *double-strand break*<sup>149</sup>. DSB desempenha um papel proeminente na sobrevivência celular, manutenção da integridade genômica e prevenção de desenvolvimento de neoplasias<sup>149</sup>. Nesse caso, há referência da relação entre o respectivo alelo mutante e o aumento no risco de desenvolvimento de glioblastoma, podendo atuar como fator de risco para a doença<sup>150</sup>.

No entanto, neste estudo o polimorfismo *RTEL1*-rs6010620 não mostrou associação com gliomas, corroborando um estudo em casuística norte-americana<sup>87</sup>. Por outro lado, há referência deste gene para susceptibilidade a glioma em casuísticas francesa e chinesa, o que também pode sugerir relação entre etnicidade e variantes de *RTEL1*<sup>150,151</sup>. Ressalta-se o ineditismo do estudo deste polimorfismo em casuística brasileira com gliomas.

Neste estudo, assim como em outra casuística<sup>152</sup> não se confirma também associação do polimorfismo *EGFR*-rs1468727 com gliomas, discordando de outros autores<sup>4,153</sup>. Houve prevalência do genótipo heterozigoto (T/C) em ambos os grupos, o que também foi observado em um estudo de casuística chinesa<sup>4</sup>. Há referência de associação de polimorfismos de *EGFR* com câncer de pulmão, mama e esôfago<sup>88-90</sup>. Estudos têm sugerido que a via de EGFR desempenha um papel importante na progressão do glioma, e vários SNPs podem estar relacionados com o risco de glioblastoma<sup>4,153</sup>.

EGFR é responsável pela regulação de processos celulares como proliferação celular, apoptose, diferenciação e progressão do ciclo celular, invasão, angiogênese e metástase, que ocasionam a progressão do tumor<sup>153</sup>. Também é um codificador de tirosina-quinase de membrana, sua sinalização é iniciada pelo domínio de ligação, que inicia a dimerização do receptor e auto-fosforilação de tirosina, resultando em ativação do receptor<sup>4</sup>. Vias de sinalização mediada por EGFR conferem vantagens de sobrevivência às células tumorais, promovendo um estado de proliferação contínua e não regulada, ocasionando expansão do número de células malignas e rápido aumento no tamanho do tumor<sup>153</sup>.

Ressalta-se ainda que, o polimorfismo *VEGF*-rs2010963 que neste estudo não se associa a gliomas, assim como, em outra casuística<sup>154</sup>, discordantes de estudos em casuística chinesa e francesa<sup>64,94</sup>. VEGF é um fator angiogênico chave envolvido na progressão do tumor, fornecendo nutrição e oxigênio necessários para formação de novos vasos<sup>94</sup>. Estudos relatam que níveis elevados de VEGF foram observados em câncer de mama<sup>95</sup>, colo retal<sup>155</sup> e gástrico<sup>156</sup>, além disso, está associado a um estágio avançado e mau prognóstico<sup>157</sup>. O polimorfismo *VEGF*-rs2010963, situa-se na região 5'UTR. Reconhecidamente, mutações em 5'UTR e 3'UTR podem modificar os locais de ligação dos fatores de transcrição, o que resulta em transcrição anormal de *VEGF*. O polimorfismo genético na região codificadora ocasiona malformação e disfunção da proteína, podendo explicar sua associação significativa com o risco de glioma<sup>94</sup>.

Neste estudo, o equilíbrio de HW não se confirmou para RTEL1-rs6010620 e EGFR-rs1468727 em pacientes e controles. A ausência de equilíbrio de HW sugere, entre outros fenômenos, o impacto de fatores evolutivos que podem alterar frequências genotípicas. Ressaltam-se também os critérios utilizados na randomização dos grupos<sup>158</sup>. Todavia, há um alerta sobre o número reduzido de marcadores genéticos

citados sem equilíbrio de HW o que, no entanto, seria esperado para doenças genéticas complexas, mas não considerado por alguns pesquisadores que omitem essas informações valiosas para identificação de polimorfismos causais<sup>159</sup>. Deve ser destacado, ainda, o caráter miscigenado da população brasileira<sup>43</sup>, o qual pode contribuir para divergências em relação ao equilíbrio de HW, utilizado a mais de 100 anos para identificar características genéticas das populações<sup>160,161</sup>.

Em relação aos hábitos de vida, observou-se maior frequência de tabagismo e genótipo de risco para *CCND1*-9344 ( $\_ / A$ ), *XRCCI*-rs25487 ( $\_ / C$ ) e *EGFR*-rs1468727 ( $\_ / C$ ) em pacientes com gliomas, comparado ao grupo controle, corroborando estudo de Lin et al. (2014)<sup>161</sup> em câncer de cabeça e pescoço. O mesmo foi observado para câncer colo retal envolvendo o polimorfismo *XRCCI*-rs25487<sup>163</sup>, assim como câncer de pulmão associado à *EGFR*-rs1468727 em casuística coreana<sup>164</sup>, em ambos os casos relacionado com uso de tabaco. No presente estudo prevaleceram também genótipos com alelo de risco para *RTEL1*-rs601062 ( $\_ / G$ ) em pacientes com hábito tabagista comparado a controles, o mesmo foi encontrado em casuística norte-americana<sup>165</sup>. Genótipos de risco de *VEGF*-rs2010963 ( $\_ / C$ ) mostraram frequências semelhantes entre os grupos em relação ao tabagismo. Entretanto, Slattery et al. (2014)<sup>95</sup> observaram sua relação com tabagismo em casuística norte-americana. Tendo em vista o abuso no uso de tabaco, um estudo experimental mostrou que os componentes tóxicos do cigarro estimulam o comportamento maligno em gliomas<sup>54</sup>.

Para etilismo destacaram-se os genótipos com alelos de risco para *RTEL1*-rs6010620 ( $\_ / G$ ) e *EGFR*-rs1468727 ( $\_ / C$ ) e hábito etilista em pacientes, comparado a controles. Trata-se, nesse caso, respectivamente, de genes relacionados com a manutenção e integridade do DNA, e sinalização intracelular envolvidos, conseqüentemente, na apoptose<sup>4,73</sup>. O uso em excesso de álcool pode atuar na



carcinogênese, facilitando a absorção de substâncias cancerígenas devido à sua conversão em acetaldeído, ocasionando rupturas dos filamentos do DNA<sup>165</sup>. Gong et al. (2016)<sup>166</sup>, encontraram associação dos genótipos de risco de *XRCC1* e *EGFR* e etilismo com câncer colo retal.

Ressaltam-se, ainda, neste estudo os genótipos com alelos de risco de *RTEL1*-rs6010620 (G/G) e *EGFR*-rs1468727 (C/C), que prevaleceram em pacientes com HAS, comparado a controles. Adicionalmente, estudo em casuística norte-americana observou relação entre HAS e polimorfismos de *XRCC1*, *EGFR* e *VEGF* associados a diversas doenças, uma vez que em conjunto ocasionam toxicidade<sup>167</sup>. Por outro lado, outro estudo não encontrou essa associação em câncer do endométrio em casuística polonesa<sup>168</sup>. Existem varias hipóteses sobre a relação entre HAS e glioma, sabe-se que o aumento da pressão intracraniana ou compressão do tronco cerebral pode causar HAS. Além disso, os gliomas de alto grau podem produzir citocinas e substâncias vasoativas implicados na angiogênese e remodelação vascular<sup>124</sup>.

Para DM, todos os polimorfismos, exceto o *XRCC1* mostraram prevalência nos genótipos de risco relacionado a DM em pacientes com glioma, comparado aos controles. Reconhecidamente, a ciclina D1 (*CCND1*) ativada inibe a atividade em genes gliconeogênicos, assim, a perda de ciclina resulta no aumento de gliconeogênese hepática e hiperglicemia<sup>169</sup>. Estudo em casuística chinesa mostrou relação entre o polimorfismo de *VEGF* e DM em pacientes com nefropatia diabética<sup>82</sup>. O papel do VEGF tem sido investigado em várias neoplasias, principalmente por seu forte potencial angiogênico<sup>82</sup>. Recentemente, altas concentrações de VEGF foram detectadas em pacientes com doenças respiratórias ou complicações diabéticas microvasculares<sup>170</sup>.

Os genótipos de risco de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF* mostraram frequências semelhantes entre os grupos em relação a IMC. Por outro lado, Slattery et

al. (2014)<sup>96</sup> observaram relação de VEGF e IMC em câncer colo retal, o mesmo ocorreu para câncer de pulmão<sup>171</sup>. Ressalta-se, ainda, que a obesidade aumenta inflamação e estresse oxidativo, alterando a expressão de níveis de múltiplos genes, inclusive o *CCND1* demonstrando, assim, ligações positivas entre essas variáveis e o risco de câncer<sup>172</sup>.

Neste estudo, o grau histológico dos gliomas não apresentou relação com as variantes genéticas, corroborando estudo realizado em população caucasiana<sup>173</sup>. No entanto, o genótipo de risco de *CCND1*-rs9344 (C/A) foi observado em todos os graus histológicos, com destaque nos gliomas de baixo grau (I-II). Nesse caso, o tamanho reduzido da casuística foi limitante para a análise comparativa dos dados.

Estudos identificaram correlação entre alelo de risco de *CCND1* (C/A) e aumento do risco de câncer, incluindo fígado e esôfago<sup>173,174</sup>. Chen et al. (2012)<sup>132</sup> encontraram associação entre o alelo de risco de *CCND1* e os graus histológicos II e III, uma vez que os tumores de grau I foram excluídos da análise devido ao número reduzido de pacientes, no entanto, essa relação não foi observada em gliomas de grau IV, fornecendo evidências de que o perfil de risco genético de gliomas diferem pela histologia<sup>29</sup>. Adicionalmente, há referência da relação do alelo de risco de *CCND1* (C/A) com aumento de expressão de ciclina D1 em tecidos de glioma<sup>132</sup>.

Em relação ao polimorfismo *XRCCI*-rs25487, o alelo de risco (C/C) destacou-se em tumores de graus I e IV, enquanto no câncer de mama em casuística brasileira associou-se ao baixo grau<sup>175</sup>, assim como correlacionou-se também ao grau histológico no câncer de colo de útero<sup>176</sup>. Vários SNPs de *XRCCI* estão associados ao risco de câncer de pulmão, próstata e gliomas<sup>101</sup>. Este polimorfismo está envolvido na reparação de danos e quebra de cadeia no DNA, com a ligação a DNA-ligase III no seu carboxilo e pela ligação da DNA polimerase<sup>177</sup>. Um estudo de meta-análise mostrou relação do

alelo de risco de *XRCC1* ( $\_ / C$ ) em tumores de alto grau em população asiática, mas não em caucasianos<sup>177</sup>. Para o polimorfismo *RTEL1*-rs6010620, o alelo de risco ( $\_ / G$ ), destacou-se em todos os graus histológicos de glioma. O mesmo foi observado em um estudo caso/controle realizado na Suécia, que relatou o alelo de risco em todos os graus histológicos, menos do tipo ependimoma<sup>178</sup>. Existem marcadores moleculares específicos para a caracterização de gliomas, utilizados para definir os subtipos histológicos e graus de malignidade, como marcadores de prognóstico e diagnóstico, que também podem prever resposta ao tratamento<sup>179</sup>. Há referência da associação de *RTEL1*-rs6010620 com a codeleção 1p19q em GBMs<sup>179,180</sup>.

Vários estudos sugerem que a regulação da via de EGFR desempenha papel importante na progressão do glioma, sendo que vários SNPs podem estar relacionados com o risco de gliomas de alto grau, principalmente GBMs<sup>91,152</sup>. Este gene regula processos celulares importantes e está relacionado a diferentes tipos de câncer em humanos<sup>80</sup>. Neste estudo, o polimorfismo *EGFR*-rs1468727, representado pelos genótipos com alelo de risco ( $\_ / C$ ) destacou-se em tumores de alto grau (III-IV).

VEGFA, um dos mediadores mais predominantes de angiogênese patológica, desempenha papel crucial na carcinogênese e no desenvolvimento de glioma, promovendo o crescimento do tumor. Neste estudo, o genótipos de risco do *VEGF*-rs2010963 ( $\_ / C$ ) destacaram-se em gliomas de graus I, III e IV. Há referência da associação do alelo de risco de *VEGF* e leucemia linfócita do tipo crônica<sup>181</sup>. Estudos relacionados com alelo de risco ( $\_ / C$ ) e graus de histológicos em gliomas são escassos na literatura, tornando assim, este estudo inédito nesta população.

Com relação ao perfil anatomorfológico, os tumores de alto grau destacaram-se por acometer duas ou mais regiões, semelhante a um estudo norte-americano<sup>182</sup>. Estes tumores se localizam principalmente na região supratentorial, sendo o lobo frontal mais

comum (50-65%). Apresentam alta taxa de malignidade e proliferação, facilitando a expansão da lesão pelo corpo caloso, infiltrando nas regiões funcionais cerebrais devido à degradação das matrizes extracelulares<sup>183</sup>. Quanto ao hemisfério, entre as regiões mais acometidas dentre todos os graus de glioma (I –IV), o hemisfério esquerdo mostrou-se prevalente, o que também foi confirmado em outros estudos<sup>184</sup>, ressaltando-se que pelo menos 96% dos pacientes possuíam lesões nesta mesma região, principalmente na substância branca. Estudos mostraram uma relação baseada em pacientes destros, uma vez que abrangem a maioria da população, já os canhotos possuem maior frequência de lesões bilaterais<sup>184</sup>. Em relação a recidiva, os pacientes com gliomas de baixo grau obtiveram maior frequência comparado aos de alto grau, devido a maior taxa de sobrevivência, o mesmo foi encontrado em outras casuísticas<sup>185</sup>.

A análise de regressão logística, com todas as variáveis, mostrou maior chance de pertencer ao grupo com gliomas, com as seguintes características: etilismo, HAS e DM. Ressalta-se que, estas variáveis são possíveis preditores da doença, corroborando outros estudos<sup>127,186</sup>.

No presente estudo, a análise da curva atuarial (Kaplan-Meier), mostrou maior probabilidade de sobrevida para gliomas de baixo grau (II). Tumores de baixo grau são considerados menos agressivos, apresentam células bem diferenciadas, assim como facilidade na remoção cirúrgica e recuperação<sup>33</sup>. Reconhecidamente, os gliomas de alto grau apresentam comportamento agressivo, caracterizado por aumento de neoplasia e mitose, e maior progressão comparada a gliomas de baixo grau<sup>34</sup>. Com relação à análise de sobrevida da casuística total, 16,7% dos pacientes estão livres do evento óbito em três anos, corroborando outros estudos<sup>37</sup>. Nesse contexto, mesmo com terapêutica agressiva, a taxa de mortalidade é superior a 95% de três a cinco anos<sup>37</sup>.

Observou-se a associação entre os polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *RTEL1*, *EGFR* e *VEGF* e o decréscimo de sobrevida embora, sem significância, na presença dos respectivos alelos de risco para os referidos polimorfismos. Estes achados corroboram estudos realizados em outras populações<sup>64,178,187,188</sup>. Outros estudos mostram a associação entre os polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1* e *RTEL1* e a sobrevida dos pacientes, em câncer de pulmão, faringe e laringe<sup>189</sup>. Estudos relacionando as respectivas variantes genéticas à sobrevida dos pacientes com gliomas são escassos na literatura, especialmente na população brasileira, restringindo a discussão dos dados.

Em relação à resposta a terapia medicamentosa, houve acréscimo na taxa de sobrevida em pacientes submetidos a tratamento quimioterápico (TMZ) e radioterapia (RT) adjuvante, o mesmo foi encontrado em um estudo de revisão, que constatou a relação entre o tratamento combinado TMZ+RT e aumento de sobrevida em pacientes com glioma<sup>190</sup>. Sabe-se que TMZ é considerado padrão ouro para tratamento de gliomas, principalmente gliomas de alto grau<sup>190</sup>. Estudos experimentais *in vitro* demonstraram efeito sinérgico em inibir o crescimento de linhagens celulares de GBM, com tratamento fracionado de TMZ e RT<sup>190</sup>.

*Conclusão*

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

- 1- Variantes genéticas, representadas por frequências genótípicas e alélicas, relacionadas ao ciclo celular (*CCND1*), reparo do DNA (*XRCC1*), integridade dos telômeros (*RTEL1*), sinalização intracelular (*EGFR*) e angiogênese (*VEGF*) não se associam com gliomas.
- 2- Hábitos de vida e comorbidades associam-se com gliomas, destacando-se etilismo, HAS e DM, fatores de risco independentes para a doença. Ressalta-se a relação entre presença de alelos mutantes de *CCND1*, *XRCC1*, *EGFR* e *VEGF*, hábitos de vida e comorbidades, o que pode potencializar o risco para gliomas.
- 3- O perfil radiológico anatomorfológico por RM não tem relação com os polimorfismos de *CCND1*, *XRCC1*, *EGFR* e *VEGF*, o que deve ser esclarecido em casuística numerosa.
- 4- Gliomas de baixo grau conferem acréscimo à sobrevida dos pacientes em um ano, assim como a combinação da quimioterapia e radioterapia em 20 meses, o que deve ser confirmado em amplos estudos.

## *Referências Bibliográficas*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pei S, Zhao F, Liu J, Fu Q, Shang P. Association between regulator of telomere elongation helicase 1 polymorphism and susceptibility to glioma. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:690-7.
2. Gao X, Tang YJ, Zhang GF, Yu L, Qi ST. ERCC2 rs13181 polymorphism association with glioma susceptibility in a Chinese population. *Genet Mol Res* 2016;15:2.
3. Forman D, Bray F, Brewster D et al. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X*. IARC Scientific Publication. 2013, IARC.
4. Wang X, Zhang H, Wang D, Li X. Association of genetic polymorphisms of EGFR with glioma in a Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015;19:59-62.
5. Zeng T, Cui D, Gao L. Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. *Front Biosci* 2015;20:1104-15.
6. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil. 2015; <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp>.
7. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa /2014 Incidência de Câncer no Brasil. 2014; [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa\\_cancer\\_24042014.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf).
8. Hu Y, Chen F, Liu F, Liu X, Huang N, Cai X, et al. Overexpression of TIP30 inhibits the growth and invasion of glioma cells. *Mol Med Rep* 2016;13:605-12.
9. World Health Organization (WHO). The Database. 2015; <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>.
10. Walsh KM, Ohgaki H, Wrensch MR. Epidemiology. *Handb Clin Neurol* 2016;134:3-18.
11. Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, Dias PS, Campbell D, et al. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995;55(19):4237-9.

12. Jacobs D, Walsh K, Wrensch M, Wiencke J, Jenkins R, et al. Leveraging ethnic group incidence variation to investigate genetic susceptibility to glioma: a novel candidate SNP approach. *Front Genet* 2012;3:203.
13. Dubrow R, Darefsky AS, Jacobs DI, Park LS, Rose MG, et al. Time trends in glioblastoma multiforme survival: the role of temozolomide. *Neuro Oncol* 2013;15(12):1750-61.
14. Pallud J, Fontaine D, Duffau H, Mandonnet E, Sanai N, et al. Natural history of incidental world health organization grade II gliomas. *Ann Neurol* 2010;68:727–33.
15. Ruda R, Bello L, Duffau H, Soffietti R. Seizures in lowgrade gliomas: natural history, pathogenesis, and outcome after treatments. *Neuro Oncol* 2012;14(Suppl 4):iv55–64.
16. Ruda R, Trevisan E, Soffietti R. Epilepsy and brain tumors. *Curr Opin Oncol* 2010;22:611–20.
17. Lowry JK, Snyder JJ, Lowry PW. Brain tumors in the elderly: recent trends in a minnesota cohort study. *Arch Neurol* 1998;55:922–8.
18. Tanaka S, Meyer F, Buckner J, Uhm J, Yan E, et al. Presentation, management, and outcome of elderly patients with newly-diagnosed anaplastic astrocytoma. *J Neurooncol* 2012;110:227–35.
19. Karpel-Massler G, Ramani D, Shu C, Halatsch ME, Westhoff MA, Bruce JN, et al. Metabolic reprogramming of glioblastoma cells by L-asparaginase sensitizes for apoptosis in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016,7:33512-28.
20. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
21. López-Bayghen E, Ortega A. Glial cells and synaptic activity: translational control of metabolic coupling. *Rev Neurol* 2010;50:607-15.
22. Miyauchi JT, Chen D, Choi M, Nissen JC, Shroyer KR, Djordevic S, et al. Ablation of neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression. *Oncotarget* 2016;7:9801-14.
23. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012;74:691-705.
24. Li Y, DU XF, DU JL. Physiological properties and functions of microglia. *Sheng Li Xue Bao*. 2013;65:471-82.

25. Buckman LB, Ellacott KL. The contribution of hypothalamic macroglia to the regulation of energy homeostasis. *Front Syst Neurosci* 2014;8:212.
26. Cai J, Yang P, Zhang C, Zhang W, Liu Y, Bao Z, et al. ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples. *Oncotarget* 2014;15:2551–61.
27. Wang ZL, Zhang CB, Cai JQ, Li QB, Wang Z, Jiang T. Integrated analysis of genome-wide DNA methylation, gene expression and protein expression profiles in molecular subtypes of WHO II-IV gliomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:127.
28. 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;131:803-20.
29. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology* 2013;15:1-56.
30. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15017.
31. Pusateri A, Margo CE. Intraocular astrocytoma and its differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1250-4.
32. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med* 2014;6:1359-70.
33. Shin JY, Diaz AZ. Anaplastic astrocytoma: prognostic factors and survival in 4807 patients with emphasis on receipt and impact of adjuvant therapy. *J Neurooncol* 2016;129:557-65.
34. Yamamuro S, Okamoto Y, Sano E, Ochiai Y, Ogino A, Ohta T, et al. Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. *Int J Oncol* 2015;47:91-6.
35. Zhang Y, Pan Y, Li X. Glioblastoma multiforme in the brainstem in a young adult. *Clin Neurol Neurosurg* 2014;124:175-8.
36. Clark PA, Bhattacharya S, Elmayan U, Darjatmoko SR, Thuro BA, Yan MB, et al. Resveratrol alvo de AKT e p53 em glioblastoma e glioblastoma células-tronco semelhantes para suprimir o crescimento e infiltração. *J Neurosurg* 2016;15:1-13.

37. Nicolaidis S. Biomarkers of glioblastoma multiforme. *Metabolism*. 2015;64:S22-7.
38. Smits M. Imaging of oligodendroglioma. *Br J Radiol*. 2016;89:20150857.
39. Simonetti G, Gaviani P, Botturi A, Innocenti A, Lamperti E, Silvani A. Clinical management of grade III oligodendroglioma. *Cancer Manag Res* 2015;7:213-23.
40. Zetterling M, Roodakker K, Berntsson S, Edqvist P, Latini F, Landtblom AM, et al. Extension of diffuse low-grade gliomas beyond radiological borders as shown by the coregistration of histopathological and magnetic resonance imaging data. *J Neurosurg* 2016;26:1-12.
41. Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol* 2008;18:360-9.
42. Vogelbaum MA, Hu C, Peereboom DM, Macdonald DR, Giannini C, Suh JH, et al. Phase II trial of pre-irradiation and concurrent temozolomide in patients with newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and mixed anaplastic oligoastrocytomas: long term results of RTOG BR0131. *J Neurooncol* 2015;124:413-20.
43. Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, Shaw EG, Giannini C, Brachman DG, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. *J Clin Oncol* 2014;32:783–90.
44. Singh N, Sahu DK, Chowdhry R, Mishra A, Goel MM, Faheem M, et al. IsoSeq analysis and functional annotation of the infratentorial ependymoma tumor tissue on PacBio RSII platform. *Meta Gene* 2015;7:70-5.
45. Wu J, Armstrong TS, Gilbert MR. Biology and management of ependymomas. *Neuro Oncol* 2016;18:902-13.
46. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CACancer J Clin*. 2010;60:166-93.
47. Misuraca KL, Barton KL, Chung A, Diaz AK, Conway SJ, Corcoran DL, et al. Pax3 expression enhances PDGF-B-induced brainstem gliomagenesis and characterizes a subset of brainstem glioma. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:134.
48. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, et al. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 2009;15:45-56.

49. Dirven L, Aaronson N, Heimans JJ, Taphoorn MJ. Health-related quality of life in high grade glioma patient. *Chin J Cancer* 2014;33:40-45.
50. Saad S, Wang TJ. Neurocognitive deficits after radiation therapy for brain malignancies. *Am J Clin Oncol* 2015;38:634-40.
51. Qi L, Yu HQ, Zhang Y, Ding LJ, Zhao DH, Lv P, et al. Comprehensive Meta-analysis of Genetic Associations Between Key Polymorphic Loci in DNA Repair Genes and Glioma Risk. *Mol Neurobiol* 2016;1:1-12.
52. Galeone C, Malerba S, Rota M, Bagnardi V, Negri E, Scotti L, et al. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of brain tumours. *Ann Oncol*. 2013;24:514-23.
53. Khalil AA, Jameson MJ, Broaddus WC, Lin PS, Chung TD. Nicotine enhances proliferation, migration, and radioresistance of human malignant glioma cells through EGFR activation. *Brain Tumor Pathol* 2013;30:73–83.
54. Hou L, Jiang J, Liu B, Han W, Wu Y, Zou X, et al. Smoking and adult glioma: a population-based case-control study in China. *Neuro Oncol* 2016;18:105-13.
55. Durand T, Jacob S, Lebouil L, Douzane H, Lestaevel P, Rahimian A, et al. Feuvret EpiBrainRad: an epidemiologic study of the neurotoxicity induced by radiotherapy in high grade glioma patients. *BMC Neurol* 2015;15:261.
56. Liang HJ, Yan YL, Liu ZM, Chen X, Peng QL, Wang J, et al. Association of XRCC3 Thr241Met polymorphisms and gliomas risk: evidence from a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:4243-7.
57. Cheng HB, Xie C, Zhang RY, Hu SS, Wang Z, Yue W. Xeroderma pigmentosum complementation group f polymorphisms influence risk of glioma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:4083-7.
58. Ducray F. Biology of glioma. *Cancer Radiother* 2008;12:663-8.
59. Tabatabai G, Hegi M, Stupp R, Weller M. Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers for malignant glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:302-7.
60. Wu Q, Peng Y, Zhao X. An Updated and Comprehensive Meta-Analysis of Association Between Seven Hot Loci Polymorphisms from Eight GWAS and Glioma Risk. *Mol Neurobiol* 2016;53:4397-405.
61. Guo H, Xing Y, Liu R, Chen S, Bian X, Wang F, et al. -216G/T (rs712829), a functional variant of the EGFR promoter, is associated with the pleural metastasis of lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2013;6:693–8.

62. Rice T, Zheng S, Decker PA, Walsh KM, Bracci P, Xiao Y, et al. Inherited variant on chromosome 11q23 increases susceptibility to IDH-mutated but not IDH-normal gliomas regardless of grade or histology. *Neuro Oncol* 2013;15:535-41.
63. Di Stefano AL, Labussiere M, Lombardi G, Eoli M, Bianchessi D, Pasqualetti F, et al. VEGFA SNP rs2010963 is associated with vascular toxicity in recurrent glioblastomas and longer response to bevacizumab. *J Neurooncol* 2015;121:499-504.
64. Feng YZ, Liu YL, He XF, Wei W, Shen XL, Xie DL. Association between the XRCC1 Arg194Trp polymorphism and risk of cancer: evidence from 201 case-control studies. *Tumour Biol* 2014;35:10677-97.
65. Zhao Y, Deng X, Wang Z, Wang Q, Liu Y. Genetic polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:665-9.
66. Yi L, Xiao-Feng H, Yun-Tao L, Hao L, Ye S, Song-Tao Q. Association between the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and risk of cancer: evidence from 297 case-control studies. *PLoS One* 2013;8:e78071.
67. He LW, Shi R, Jiang L, Zeng Y, Ma WL, Zhou JY. XRCC1 gene polymorphisms and glioma risk in Chinese population: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e111981.
68. Liu N, Fei X, Shen Y, Shi W, Ma J. Correlation between XRCC1 Arg399Gln genetic polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2016;9:579-86.
69. Uringa EJ, Lisaingo K, Pickett HA, Brind'Amour J, Rohde JH, Zelensky A, et al. RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. *Mol Biol Cell* 2012; 23:2782-92.
70. Vannier JB, Sarek G, Boulton SJ. RTEL1: functions of a disease-associated helicase. *Trends Cell Biol* 2014;24:416-25.
71. Zhao W, Bian Y, Zhu W, Zou P, Tang G. Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1) rs6010620 polymorphism contribute to increased risk of glioma. *Tumour Biol* 2014;35:5259-66.
72. Zhang C, Lu Y, Zhang X, Yang D, Shang S, Liu D, et al. The role of the RTEL1 rs2297440 polymorphism in the risk of glioma development: a meta-analysis. *Neurol Sci* 2016;37:1023-31.

73. Wu X, Sandhu S, Nabi Z, Ding H. Generation of a mouse model for studying the role of upregulated RTEL1 activity in tumorigenesis. *Transgenic Res* 2012;21:1109-15.
74. Du SL, Geng TT, Feng T, Chen CP, Jin TB, Chen C. The RTEL1 rs6010620 polymorphism and glioma risk: a meta-analysis based on 12 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(23):10175-9.
75. Wu Y, Tong X, Tang LL, Zhou K, Zhong CH, Jiang S. Associations between the rs6010620 polymorphism in RTEL1 and risk of glioma: a meta-analysis of 20,711 Participants. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:7163-7.
76. Peng Z, Wu T, Li Y, Xu Z, Zhang S, Liu B, et al. MicroRNA-370-3p inhibits human glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by directly targeting  $\beta$ -catenin. *Brain Res* 2016;1644:53-61.
77. Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B. Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:76.
78. Zhang LQ, Huang XE, Wang J, Shang JQ, Bai J, Liu FY, et al. The cyclin D1 G870A polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 populations. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:81-5.
79. Liu HB, Peng YP, Dou CW, Su XL, Gao NK, Tian FM, et al. Comprehensive study on associations between nine SNPs and glioma risk. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:4905–8.
80. Zeybek U, Yaylim I, Ozkan NE, Korkmaz G, Turan S, Kafadar D, et al. Cyclin D1 gene G870A variants and primary brain tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:4101-6.
81. Sun G, Shi L, Yan S, Wan Z, Jiang N, Fu L, et al. MiR-15b targets cyclin D1 to regulate proliferation and apoptosis in glioma cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:687826. doi: 10.1155/2014/687826.
82. Bedewy AM, Mostafa MH, Saad AA, El-Maghraby SM, Bedewy MM, Hilal AM, et al. Association of cyclin D1 A870G polymorphism with two malignancies: acute lymphoblastic leukemia and breast cancer. *J BUON*. 2013;18:227–38.
83. Li J, Luo F, Zhang H, Li L, Xu Y. The CCND1G870A polymorphism and susceptibility to bladder cancer. *Tumour Biol* 2014;35:171–7.
84. Meng Y, Zhang C, Zhou X. Association between the Cyclin D1 G870A polymorphism and the susceptibility to and prognosis of upper aerodigestive

- tract squamous cell carcinomas: an updated meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2016;9:367-76.
85. Gallego O, Cuatrecasas M, Benavides M, Segura PP, Berrocal A, Erill N, et al. Efficacy of erlotinib in patients with relapsed glioblastoma multiforme who expressed EGFRVIII and PTEN determined by immunohistochemistry. *J Neurooncol* 2014;116:413-9.
  86. Walcott F, Rajaraman P, Gadalla SM, Inskip PD, Purdue MP, Albanes D, et al. Telomere length and risk of glioma. *Cancer Epidemiol* 2013;37:935-8.
  87. Lee JM, Yang SY, Yang PW, Shun CT, Wu MT, Hsu CH, et al. Polymorphism in epidermal growth factor receptor intron 1 predicts prognosis of patients with esophageal cancer after chemoradiation and surgery. *Ann Surg Oncol* 2011;18:2066-73.
  88. Connor AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Pinkston CM, John EM, Torres-Mejía G, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2013;4:235-49.
  89. He C, Zheng L, Xu Y, Liu M, Li Y, Xu J. Highly sensitive and noninvasive detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in non-small cell lung cancer. *Clin Chim Acta.* 2013;425:119-24.
  90. Wibom C, Ghasimi S, Van Loo P, Brännström T, Trygg J, Lau C, et al. EGFR gene variants are associated with specific somatic aberrations in glioma. *PLoS One.* 2012;7:e47929. doi: 10.1371/journal.pone.0047929.
  91. Andersson U, Schwartzbaum J, Wiklund F, Sjöström S, Liu Y, Tsavachidis S, et al. A comprehensive study of the association between the EGFR and ERBB2 genes and glioma risk. *Acta Oncol* 2010;49:767-75.
  92. Jiang H, Lian M, Xie J, Li J, Wang M. Three single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and glioma risk in a Chinese population. *J Int Med Res* 2013;41(5):1484-94.
  93. Zhang J, Yang J, Chen Y, Mao Q, Li S, Xiong W, et al. Genetic Variants of VEGF (rs201963 and rs3025039) and KDR (rs7667298, rs2305948, and rs1870377) Are Associated with Glioma Risk in a Han Chinese Population: a Case-Control Study. *Mol Neurobiol* 2016;53:2610-8.
  94. Beeghly-Fadiel A, Shu XO, Lu W, Long J, Cai Q, Xiang YB, et al. Genetic variation in VEGF family genes and breast cancer risk: a report from the Shanghai Breast Cancer Genetics Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:33-41.



95. Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol Carcinog* 2014;53 Suppl 1:E140-50.
96. Rinck-Junior JA, Oliveira C, Lourenco GJ, Sagarra RA, Derchain SF, Segalla JG, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism and increased risk of epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:69-73.
97. Herrlinger U, Schabet M, Clemens M, Kortmann RD, Petersen D, Will BE, et al. Clinical presentation and therapeutic outcome in 26 patients with primary CNS lymphoma. *Acta Neurol Scand* 1998;97:257-64.
98. Kang Y, Choi SH, Kim YJ, Kim KG, Sohn CH, Kim JH, et al. Gliomas: Histogram analysis of apparent diffusion coefficient maps with standard- or high-b-value diffusion-weighted MR imaging--correlation with tumor grade. *Radiology* 2011;261:882-90.
99. Hattingen E, Jurcoane A, Daneshvar K, , Pilatus U, Mittelbronn M, Steinbach JP, et al. Quantitative T2 mapping of recurrent glioblastoma under bevacizumab improves monitoring for non-enhancing tumor progression and predicts overall survival. *Neuro Oncol.* 2013;15:1395–404.
100. Knoop EA, Cha S, Johnson G, Mazumdar A, Golfinos JG, Zagzag D, et al. Glial neoplasms: dynamic contrast-enhanced T2\*-weighted MR imaging. *Radiology.* 1999;211:791-8.
101. Tykocinski ES, Grant RA, Kapoor GS, Krejza J, Bohman LE, Gocke TA, et al. Use of magnetic perfusion-weighted imaging to determine epidermal growth factor receptor variant III expression in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2012;14:613-23.
102. Cousins JP. Clinical MR spectroscopy: fundamentals, current applications, and future potential. *AJR Am J Roentgenol* 1995;164:1337-47.
103. Andronesi OC, Kim GS, Gerstner E, Batchelor T, Tzika AA, Fantin VR, et al. Detection of 2-hydroxyglutarate in IDH-mutated glioma patients by in vivo spectral-editing and 2D correlation magnetic resonance spectroscopy. *Sci Transl Med* 2012;4:116ra4.
104. Chronaiou I, Stensjoen AL, Sjobakk TE, Esmaeili M, Bathen TF. Impacts of MR spectroscopic imaging on glioma patient management. *Acta Oncol* 2014;53:580-9.

105. Blüml S, Panigrahy A, Laskov M, Dhall G, Krieger MD, Nelson MD, et al. Elevated citrate in pediatric astrocytomas with malignant progression. *Neuro Oncol* 2011;13:1107-17.
106. Yamasaki F, Kurisu K, Kajiwara Y, Watanabe Y, Takayasu T, Akiyama Y, et al. Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol* 2011;13:791–801.
107. Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin Radiol* 2004;59:77-85.
108. Zhang F, Xu CL, Liu CM. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:2089-100.
109. Kaidar-Person O, Darawshe F, Tzuk-Shina T, Eran A. The Clinical Significance of Ependymal Enhancement at Presentation in Patients with Malignant Glioma. *Rambam Maimonides Med J* 2015;6:e0039.
110. Nathanson D, Mischel PS. Charting the course across the blood–brain barrier. *J Clin Invest* 2014;121:31-3.
111. Zheng Q, Han L, Dong Y, Tian J, Huang W, Liu Z, et al. JAK2/STAT3 targeted therapy suppresses tumor invasion via disruption of the EGFRvIII/JAK2/STAT3 axis and associated focal adhesion in EGFRvIII-expressing glioblastoma. *Neuro-Oncol* 2014;16:1229–43.
112. Arango HG. Bioestatística teórica e computacional. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 359-60.
113. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998;44:1748-50.
114. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica nº15. Hipertensão arterial sistêmica. Brasília-DF. Normas e Manuais Técnicos. 2006; [http:// dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos\\_ab/abcd](http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd).
115. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, nº16. Diabetes Mellitus. Brasília-DF. Normas e Manuais Técnicos. 2006; [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes\\_mellitus](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes_mellitus).
116. Gan CL, Ng EK, Chan BL, Hashim U, Classe FC. Technical Barriers and Development of Cu Wirebonding in Nanoelectronics Device Packaging. *Journal of Nanomaterials* 2012; doi.org/10.1155/2012/173025.

117. Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica; 2009/2010.  
[http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes\\_brasileiras\\_obesidade\\_2009\\_2010\\_1.pdf](http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf).
118. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:4111–26.
119. World Health Organization. Guidelines for the conduct of the tobacco smoking surveys of the general population: report of a meeting. 1992.
120. Maekawa A, Mitsumori K. Spontaneous occurrence and chemical induction of neurogenic tumors in rats--influence of host factors and specificity of chemical structure. *Crit Rev Toxicol* 1990;20:287–310.
121. Testino G. The burden of cancer attributable to alcohol consumption. *Maedica* 2011;6:313–20.
122. Baglietto L, Giles GG, English DR, Karahalios A, Hopper JL, Severi G. Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Int J Cancer*. 2011 Apr 15;128(8):1929-34.
123. Houben MP, Coebergh JW, Herings RM, Casparie MK, Tijssen CC, van Duijn CM, et al. The association between antihypertensive drugs and glioma. *Br J Cancer* 2006;94:752-6.
124. Kleihues P, Cavenee WK. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: IARC; 2000. <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/patgen/bb9/BB9.pdf>.
125. Adeberg S, Bernhardt D, Ben Harrabi S, Bostel T, Mohr U, Koelsche C, et al. Metformin influences progression in diabetic glioblastoma patients.. *Strahlenther Onkol* 2015;191: 928-35.
126. Kitahara CM, Linet MS, Brenner AV, Wang SS, Melin BS, Wang Z, et al. Personal history of diabetes, genetic susceptibility to diabetes, and risk of brain glioma: a pooled analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:47-54.
127. Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, et al. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer* 2010;46:2369–80.

128. Kwon T, Jeong IG, You D, Han KS, Hong S, Hong B, et al. Obesity and prognosis in muscle-invasive bladder cancer: the continuing controversy 2014;21:1106-12.
129. Wiedmann M, Brunborg C, Lindemann K, Johannesen TB, Vatten L, Helseth E, et al. Body mass index and the risk of meningioma, glioma and schwannoma in a large prospective cohort study (The HUNT Study). *Br J Cancer* 2013;109:289-94.
130. Kitahara CM, Gamborg M, Rajaraman P, Sørensen TI, Baker JL. A prospective study of height and body mass index in childhood, birth weight, and risk of adult glioma over 40 years of follow-up. *Am J Epidemiol* 2014;180:821-9.
131. Siegel EM, Nabors LB, Thompson RC, Olson JJ, Browning JE, Madden MH, et al. Prediagnostic body weight and survival in high grade glioma. *J Neurooncol* 2013;114:79-84.
132. Chen X, Zhao T, Li L, Xu C, Zhang X, Tse V, et al. CCND1 G870A polymorphism with altered cyclin D1 transcripts expression is associated with the risk of glioma in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012;31:1107–13.
133. Aytekin T, Aytekin A, Maralcan G, Gokalp MA, Ozen D, Borazan E, et al. A cyclin D1 (CCND1) gene polymorphism contributes to susceptibility to papillary thyroid cancer in the Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:7181-5.
134. Ullah A, Mahjabeen I, Kayani MA. Genetic polymorphisms in cell cycle regulatory genes CCND1 and CDK4 are associated with susceptibility to breast cancer. *J BUON* 2015;20:985-93.
135. Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, Joven J, et al. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* 2011;2:896–917.
136. Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, et al. Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem cells Transl Med* 2012;1:811–24.
137. Liu H, Song Z, Liao DG, Zhang TY, Liu F, Zheng W, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and glioma risk in a Chinese population. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:9991-5.

- 138.Custódio AC, Almeida LO, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, et al. Analysis of XRCC1Arg194Trp and XRC1 Arg399Gln polymorphisms in gliomas. *Genet Mol Res* 2011;10:1120-9.
- 139.Fan SC, Zhou JG, Yin JZ. Investigation of the role of XRCC1 genetic polymorphisms in the development of gliomas in a Chinese population. *Genet Mol Res* 2016;15. doi: 10.4238/gmr.15038268.
- 140.Wei X, Chen D, Lv T. A functional polymorphism in XRCC1 is associated with glioma risk: evidence from a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013;40:567-72.
- 141.Han JC, Zhang YJ and Li XD. Association between polymorphisms in the XRCC1 gene and the risk of non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 2015;14:12888-93.
- 142.Nissar S, Sameer AS, Rasool R, Chowdri NA, Rashid F. Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 (Arg194Trp) and its role in colorectal cancer in Kashmiri population: a case control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16: 6385-90.
- 143.Wang X, Ma KW, Zhao YG, Wang GJ, Li W1. XRCC1 rs25487 polymorphism is associated with lung cancer risk in epidemiologically susceptible Chinese people. *Genet Mol Res* 2015;14:15530-38b.
- 144.Wang X, Zhang K, Liu X, Liu B, Wang Z1. Association between XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms and risk of thyroid cancer. *Int J Clin. Exp Pathol* 2015;8:3160-67c.
- 145.Wang Z, Rajaraman P, Melin BS, Chung CC, Zhang W, McKean-Cowdin R, et al. Further confirmation of germline glioma risk variant rs78378222 in TP53 and its implication in tumor tissues via integrative analysis of TCGA data. *Hum Mutat* 2015;36:684-8d.
- 146.Yun YX, Dai LP, Wang P, Wang KJ, Zhang JY, Xie W. Association of polymorphisms in X-ray repair cross complementing 1 gene and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *BioMed Res Int* 2015;015:509215. doi: 10.1155/2015/509215.
- 147.Li G, Jin T, Liang H, Zhang Z, He S, Tu Y, et al. RTEL1 tagging SNPs and haplotypes were associated with glioma development. *Diagn Pathol* 2013;8:83.

148. Yang B, Heng L, Du S, Yang H, Jin T, Lang H, et al. Association between RTEL1, PHLDB1, and TREH Polymorphisms and Glioblastoma Risk: A Case-Control Study *Med Sci Monit* 2015;21:1983-8.
149. Du SL, Geng TT, Feng T, Chen CP, Jin TB, Chen C. The RTEL1 rs6010620 polymorphism and glioma risk: a meta-analysis based on 12 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:10175-9.
150. Di Stefano AL, Enciso-Mora V, Marie Y, Desestret V, Labussière M, Boisselier B, et al. Association between glioma susceptibility loci and tumor pathology defines specific molecular etiologies. *Neuro Oncol* 2013;15:542-7.
151. Hou WG, Ai WB, Bai XG, Dong HL, Li Z, Zhang YQ, et al. Genetic variation in the EGFR gene and the risk of glioma in a Chinese Han population. *PLoS One* 2012; 7:e37531. doi: 10.1371/journal.pone.0037531.
152. Li B, Zhao W, Li J, Yan M, Xie Z, Zhu Y, et al. Effect of epidermal growth factor receptor gene polymorphisms on prognosis in glioma patients. *Oncotarget* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10666.
153. de Mello RA, Ferreira M, Soares-Pires F, Costa S, Cunha J, Oliveira P, et al. The impact of polymorphic variations in the 5p15, 6p12, 6p21 and 15q25 Loci on the risk and prognosis of portuguese patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8:e72373.
154. Hansen TF, Jakobsen A. Clinical implications of genetic variations in the VEGF system in relation to colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2011;12:1681–93.
155. Guan X, Zhao H, Niu J, Tang D, Ajani JA, Wei Q, Wei Q. The VEGF -634G>C promoter polymorphism is associated with risk of gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2009;9:77.
156. Li YH, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Hou JH, Xie D. Elevated expressions of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med* 2008;6:1.
157. Octavio-Aguilar P, Ramos-Frías J. [Application of population genetics in the field of medicine]. *Biomedica* 2014;34:171-9.
158. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002;111:573-4.

159. Klettner A, Kaya L, Flach J, Lassen J, Treumer F, Roeder J. Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. *Mol Vis* 2015;21:736-48.
160. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76:967-86.
161. Lin H, Fang L, Lin D. Association of cyclin D1 variants with head and neck cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:5645-51.
162. Huang Y, Li X, He J, Chen L, Huang H, Liang M, et al. Genetic polymorphisms in XRCC1 genes and colorectal cancer susceptibility. *World J Surg Oncol* 2015;13:244.
163. Choi JR, Park SY, Noh OK, Koh YW, Kang DR. Gene mutation discovery research of non-smoking lung cancer patients due to indoor radon exposure. *Ann Occup Environ Med* 2016;28:13.
164. Lachance DH, Yang P, Johnson DR, Decker PA, Kollmeyer TM, McCoy LS, et al. Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. *Am J Epidemiol* 2011;174:574-81.
165. Seitz HK, Maurer B, Stickel F. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 2005;23:297-303.]
166. Gong J, Hutter CM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bien SA, Campbell PT, et al. Genome-Wide Interaction Analyses between Genetic Variants and Alcohol consumption and Smoking for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet* 2016;12:e1006296.
167. Samulack D, Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kulig A, Sporny S. Association between Arg399Gln polymorphism of X-ray repair cross-complementing 1 (XRCC1) gene and sporadic endometrial cancer in the Polish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2011;32:491-5.
168. Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, et al. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature* 2014;510:547-51.
169. Bonnefond A, Saulnier PJ, Stathopoulou MG, Grarup N, Ndiaye NC, Roussel R, et al. What is the contribution of two genetic variants regulating VEGF levels to

- type 2 diabetes risk and to microvascular complications? PLoS ONE 2013;8:e55921.
170. Cao N, Ma X, Guo Z, Zheng Y, Geng S, Meng M, et al. Oral kanglaite injection (KLTI) attenuates the lung cancer-promoting effect of high-fat diet (HFD)-induced obesity. *Oncotarget* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.11212.
171. Di Stefano AL, Enciso-Mora V, Marie Y, Desestret V, Labussière M, et al. Association between glioma susceptibility loci and tumour pathology defines specific molecular etiologies. *Neuro Oncol.* 2013; doi: 10.1093/neuonc/nos284.
172. Zhang J, Li Y, Wang R, Wen D, Sarbia M, Kuang G, et al. Association of cyclin d1 (g870a) polymorphism with susceptibility to esophageal and gastric cardiac carcinoma in a northern Chinese population. *Int J Cancer* 2003;105: 281–4.
173. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, Ozdil B. Cyclin d1 g870a polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: Case-control study. *Cancer Epidemiol* 2010;34:298–302.
174. Dufloth RM, Arruda A, Heinrich JK, Schmitt F, Zeferino LC. The investigation of DNA repair polymorphisms with histopathological characteristics and hormone receptors in a group of Brazilian women with breast cancer. *Genet Mol Res* 2008;7:574-82.
175. Fan XM, Li KX, Niu SH, Fang ZH, Liu H. [Relationship of XRCC1 polymorphism with the risks and clinicopathological factors of cervical cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2013;93:3454-6.
176. Li J, Chen Q, Liu B, Yang J, Shao L, Wu T. Association between X-ray repair cross-complementing group 1 gene polymorphisms and glioma risk: a systematic review and meta-analysis based on 22 case-control studies. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:11863-80.
177. Wibom C, Späth F, Dahlin AM, Langseth H, Hovig E, Rajaraman P, et al. Investigation of established genetic risk variants for glioma in prediagnostic samples from a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24:810-6.
178. Ghasimi S, Wibom C, Dahlin AM, Brännström T, Golovleva I, Andersson U, et al. Genetic risk variants in the CDKN2A/B, RTEL1 and EGFR genes are associated with somatic biomarkers in glioma. *J Neurooncol* 2016;127:483-92.



179. Jenkins RB, Wrensch MR, Johnson D, Fridley BL, Decker PA, Xiao Y, et al. Distinct germ line polymorphisms underlie glioma morphologic heterogeneity. *Cancer Genet* 2011;204:13–18.
180. Góra-Tybor J, Szemraj J, Robak T, Jamroziak K. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor type A (VEGFA) and VEGF receptor type 2 (VEGFR2) gene polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54:139-43.
181. Koeller KK, Rushing EJ. From the archives of the AFIP: Oligodendroglioma and its variants: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2005;25:1669-88.
182. Zhang H, Shi Y, Yao C, Tang W, Yao D, Zhang C, et al. Alteration of the Intra- and Cross- Hemisphere Posterior Default Mode Network in Frontal Lobe Glioma Patients *Sci Rep* 2016. doi:10.1038/srep26972.
183. Matsuda R, Moritz-Gasser S, Duvaux S, Fernández Coello A, Martinoni M, Duffau H. The persistent crucial role of the left hemisphere for language in left-handers with a left low grade glioma: a stimulation mapping study. *Acta Neurochir (Wien)* 2014;156:661-70.
184. Benisi-Kohansal S, Shayanfar M, Mohammad-Shirazi M, Tabibi H, Sharifi G, Saneei P, et al. Adherence to the Dietary Approaches to Stop Hypertension-style diet in relation to glioma: a case-control study. *Br J Nutr* 2016;115:1108-16.
185. Adkison JB, Tomé W, Seo S, Richards GM, Robins HI, et al. Reirradiation of large-volume recurrent glioma with pulsed reduced-dose-rate radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79:835–41.
186. Chen YJ, Xie LJ, Zhuang YD, Guo SR. Note of the methodological flaws in the paper entitled "Association between the G870A polymorphism of cyclin D1 gene and glioma risk". *Tumour Biol* 2015;36:8267-8.
187. Melchardt T, Hufnagl C, Magnes T, Weiss L, Hutarew G, Neureiter D, et al. CYP39A1 polymorphism is associated with toxicity during intensive induction chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *BMC Cancer* 2015;15:725.
188. Liu JY, Liu QM, Li LR. Association of GSTP1 and XRCC1 gene polymorphisms with clinical outcomes of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 2015;14:10331-7.

189. Parisi S, Corsa P, Raguso A, Perrone A, Cossa S, Munafò T, et al. Temozolomide and radiotherapy versus radiotherapy alone in high grade gliomas: a very long term comparative study and literature review. *Biomed Res Int* 2015; 2015:620643. doi: 10.1155/2015/620643.
190. Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve. *Br J Cancer* 2016;114:485-96.

*Anexos*

**ANEXO I - Termo de Consentimento**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**1) Dados de identificação do paciente** Amostra \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Prontuário \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

**2) Dados sobre a pesquisa científica:**

Título do projeto: **“Biomarcadores Moleculares no Diagnóstico e Prognóstico de Glioma de Alto Grau e sua relação com Papiloma Vírus Humano e Citomegalovírus”**

Pesquisador: Prof. Dr. Waldir Antonio Tognola

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Endereço: Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro, São José do Rio Preto, 15090-000.

Você esta sendo convidado (a) a participar de um estudo como individuo controle, cujo título esta citado acima. Essa pesquisa inclui pacientes sem nenhuma doença, ou seja, indivíduos saudáveis. Sua participação consiste em doar uma pequena amostra de sangue para realização de exames genéticos. Os riscos são mínimos e conhecidos, como discreta dor de picada de agulha e, às vezes, uma mancha arroxeadada no local que desaparece em poucos dias. Queremos deixar claro que o seu nome nunca será divulgado, nem a origem das informações que você fornecer. Este projeto é coordenado pelo Prof. Dr. Waldir Antonio Tognola e durante a pesquisa você poderá tirar qualquer duvida a respeito do trabalho e se necessário, entrar em contato pelo telefone (17) 32015864, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Você não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Caso você não aceite ou desista de participar da nossa pesquisa, isto não influenciará em hipótese alguma no seu atendimento. Caso tenha alguma dúvida sobre este acordo ou sobre seus direitos, você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 32015813.

Data:...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou

Responsável

**QUESTIONÁRIO**( ) **Controle**

Amostra: \_\_\_\_\_

**1. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento e Idade: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

**2. HISTÓRICO MÉDICO**

( ) Aneurisma ( ) Hipertensão ( ) Etilismo ( ) Dislipidemia (colesterol) ( ) Tabagismo

( ) Diabete mellito ( ) Doença hepática ( ) Doença Neurodegenerativa ( ) Câncer

Qual? \_\_\_\_\_

Teve contato com agrotóxicos: \_\_\_\_\_.

Outras doenças: \_\_\_\_\_.

Medicamentos em Uso: \_\_\_\_\_.

**Exame Físico Geral**

Peso: \_\_\_\_\_ kg. Altura: \_\_\_\_\_ m. IMC (peso/altura): \_\_\_\_\_. PAS: \_\_\_\_\_. PAD: \_\_\_\_\_.

Perfil Bioquímico: CT: \_\_\_\_\_ HLDc: \_\_\_\_\_ LDLc: \_\_\_\_\_ VLDLc: \_\_\_\_\_ TG: \_\_\_\_\_ Glicemia: \_\_\_\_\_

**3. HISTÓRIA FAMILIAR**

Apresenta familiar em 1º grau (pais, irmãos, filhos) com doenças relacionadas a este estudo?

\_\_\_\_\_.

Outros tipos de doenças: \_\_\_\_\_.

**Pesquisador responsável pela entrevista:** \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_.

Observação:

**ANEXO II - Parecer do Comitê de Ética**

Comitê de Ética em  
Pesquisa em Seres Humanos  
CEP/FAMERP

Parecer n.º 800.941

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto de pesquisa CAAE 34123314.9.0000.5415 sob a responsabilidade de **Waldir Antonio Tognola** com o título "Biomarcadores Moleculares no Diagnóstico e Prognóstico de Glioma de Alto Grau e sua Relação com Papiloma Vírus Humano e Citomegalovírus" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 23 de setembro de 2014.

  
Prof. Dr. Fernando Batigália  
Presidente do CEP/FAMERP

*Apêndice*

**APÊNDICE I – Artigo a ser submetido para a Revista Anti Cancer Journal.**

*Genetic Variants Related to Cell Cycle and Stability of Telomere in Patients with Glioma*

*Maria Clara Jessica Calastri<sup>1\*</sup>; Gabriela Hattori<sup>1\*</sup>; Nicolas Luz Toledo Ortega Rodrigues<sup>2</sup>; Michele Lima Gregório<sup>3</sup>; Camila Ive Ferreira Oliveira-Brancati<sup>1</sup>; Eliane Milharcix Zanovelo<sup>4</sup>; José Roberto Lopes Ferraz Filho<sup>4</sup>; Cassiano Merussi Neiva<sup>3</sup>; Antonio Carlos Ponde Rodrigues Junior<sup>4</sup>; Moacir Fernandes de Godoy<sup>1</sup>; Carmen Lucia Penteado Lancellotti<sup>5</sup>; Dorotéia Rossi Silva Souza<sup>1</sup>.*

*Medical School of São José do Rio Preto – FAMERP.*

- 1- São Paulo State University-“Júlio de Mesquita Filho” Campus- UNESP/IBILCE.*
- 2- University of Franca – UNIFRAN.*
- 3- Hospital de Base University Hospital of the Medical School of São José do Rio Preto - HB/FAMERP.*
- 4- Santa Casa of São Paulo Medical Science College*

*\* The authors have equally contributed to this study.*

*Corresponding author:*

Maria Clara Jessica Calastri

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

São José do Rio Preto SP/Brasil/ CEP: 15090-000

Telephone: +55 (17) 32015864

E-Mail: mariaclarajessica@hotmail.com



### *Abstract*

**Background-** Gliomas are the most common primary malignant tumors of the central nervous system. The identification of new biomarkers may clarify mechanisms related to the pathogenesis of gliomas. The aim of this study was to evaluate the association of polymorphisms of cyclin D1 (*CCND1*), regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) and X-ray repair cross complementing (*XRCC1*) with gliomas. **Patients and Methods-** A total of 303 individuals were distributed into: Study Group- 100 patients with gliomas and Control Group- 203 individuals without the disease. These polymorphisms were genotyped by TaqMan® SNP Genotyping Assay. **Results-** Smoking, alcohol consumption, systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus prevailed in patients ( $P=0.0088$ ,  $P=0.0001$ ,  $P=0.0001$ ,  $P=0.0011$ , respectively). In the logistic regression analysis, alcohol consumption and SAH were identified as independent risk factors ( $P=0.0001$ ,  $P=0.0027$ , respectively). **Conclusion-** Polymorphisms involved in cell cycle, telomere protection and stability and DNA repair are not associated with gliomas.

**Keywords:** Glioblastoma, Polymorphism, Magnetic Resonance Spectroscopy, Astrocytoma.

### *Introduction*

Gliomas are primary brain tumors of the central nervous system (CNS) and account for about 40% of all intracranial neoplasms and 80% of all malignant tumors (1). Each year, more than 250,000 new malignant brain tumors are diagnosed worldwide. In Brazil, over 10,270 cases have been estimated (2) in 2016 (3). These tumors are classified according to the type of affected glia cells, including astrocytomas, oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and ependymomas, which define four degrees of malignancy, i.e., gliomas of grades I and II considered as low grade, and gliomas of grades III and IV considered as high grade (4).

In general, brain tumors are located in regions of difficult access, resistant to radiation, chemotherapy and surgical removal, with great risk for brain functions (5). Currently, histopathological examination of biopsies is considered the gold standard for the diagnosis of tumors. Magnetic resonance imaging (MRI) is also commonly used. It is a less invasive method and provides anatomical images with physiological techniques, including perfusion, diffusion, proton spectroscopy, level of blood oxygen, as well as identification of the best place to biopsy, avoiding excessive or reduced tumor resection (6).

Smoking, alcohol consumption (7,8), systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus (DM) (9,10) can be pointed out as risk factors for glioma carcinogenesis, as well as demographics, such as age and gender (3). Additionally, advances in molecular biology have shown disease susceptibility genes involved in the pathophysiology, etiology, and prognosis of gliomas (11). It is important to point out the association of polymorphisms of the gene *CCND1* (cyclin D1) with the development of gliomas, which plays a role in regulating the cell cycle, acting in the G1-S phase transition (12). Equally important are the *XRCC1* genes (X-ray repair cross complementing group 1) and *RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase 1), which play a role in repairing breakpoints in the single-strand DNA and stabilizing telomeres, respectively (13,14). The identification of specific biomarkers may promote new therapeutic approaches based on molecular mechanisms, contributing to early diagnosis and prognosis of patients with glioma.

In this context, the aim of this study was to evaluate the association of gene polymorphisms related to cell cycle, DNA repair and telomere structure with gliomas, as well as comorbidities, lifestyle habits, clinical profile, survival analysis and response to treatment patients with the disease.

#### *Patients and Methods*

This is a study with 303 individuals, regardless of gender, ethnicity and age. They were distributed into: Study Group (SG) - 100 patients with gliomas (1-81 y.o.; 62% males), regardless of the type and degree of malignancy (I-IV), whose samples of the brain tumor tissue were collected from 2003 to 2015 and stored in paraffin block; and Control Group (CG): 203 individuals without clinical signs of any neoplasia (7-90 y.o.; 67% males).

All SG patients were selected after histological confirmation from blocks by the Pathology Department of Hospital de Base (University Hospital of the Medical School of São José do Rio Preto - HB/FAMERP) and their respective clinical and radiological data from medical records. An Informed Consent Document was not required, as the material had already been collected, and therefore offered no additional risks. CG individuals were selected at the HB Imaging Department, after skull MRI with negative diagnosis for gliomas, other cancers or chronic diseases. All CG individuals were informed of the characteristics of the study and confirmed their participation by signing an Informed Consent Document. They also completed a questionnaire with demographics, comorbidities and lifestyle habits,

and underwent peripheral blood collection for the analysis of genetic polymorphisms. This study was approved by the Research Ethics Committee CEP/FAMERP (CAAE: 34123314.9.0000.5415).

### *Genotyping*

The salting-out technique (15) was used for genomic DNA extraction for CG; for SG, extraction was performed from samples of paraffin-embedded tissues using ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Biotechnology - Brazil), according to the manufacturer's instructions. Concentration and purity were analyzed in NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific - USA), according to the manufacturer's instructions. The sample absorbance was measured at 260nm/280nm, considering a ratio of 1.8 - 2.0 as pure. The allele distribution per polymerase chain reaction (PCR) in real time (single nucleotide polymorphism - SNP) was used for genotyping of polymorphisms of CCND1, XRCC1 and RTEL1, using TaqMan® SNP Genotyping Assays probes (Applied Biosystems - USA): CCND1(rs9344) - C\_\_\_744725\_1\_; XRCC1 (rs25487) - C\_\_\_622564\_10 and RTEL1 (rs6010620) - C\_\_25921674\_10, respectively. Positive and negative control for all reactions was applied with a total volume of 10 µL at final concentration of 20 ng/µL of DNA. For the reaction mixture, 5µL of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific - USA), 3 µL of DEPC solution, 0.5 µL of TaqMan® SNP Genotyping Assay and 1.5 µL of the DNA sample were added. The samples were processed at 94°C for five minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 10 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 15 seconds.

### *Statistical analysis*

For the comparative analysis between the groups, the t- Test and Fisher's Exact test or Chi-square test were used for quantitative and categorical variables, respectively, as well as logistic regression to identify independent risk factors for the disease. In the evaluation of Hardy-Weinberg equilibrium, the observed and expected genotype distribution was performed using the Chi-square test. P-values of <0.05 were considered statistically, were analyzed using the StatsDirect and Graph Pad Prism software.

### *Results*

Smoking and drinking habits prevailed in SG (40.0%, 47.0%, respectively), compared to CG (24.6%; 16.8%; P=0.0088, P=0.0001, respectively; Table 1). The same was true for SAH (SG: 55.0%

versus CG: 27.0%;  $P=0.0001$ ) and DM (22.0%, 8.4%, respectively;  $P=0.0011$ ), whereas overweight or obesity was similar between both groups (58.9%, 62.2%, respectively;  $P=0.6421$ ).

Regarding the polymorphism analysis (Table 2), the heterozygous genotype of *CCND1*-rs9344 (A/L) stood out in patients (41.0%) and controls (50.2%;  $P=0.1684$ ), as well as the *RTEL1*-rs601620 (A/G - SG: 99.0%; CG: 100.0%;  $P=0.3311$ ), with similarity of their respective alleles between both groups ( $P>0.05$ ). For *XRCC1*-rs25487, the wild-type homozygous genotype (TT) prevailed in both groups (SG: 46.0%; CG: 48.0%;  $P=0.802$ ), as well as the T allele ( $P=0.5616$ ). The dominant, recessive and codominant models were similar between both groups ( $P>0.05$ ) for all polymorphisms. The Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for all SNPs in both groups, with genotype distributions similar to those expected for *CCND1*-rs9344 (SG:  $\chi^2=2.4048$ ;  $P=0.12096$  and CG:  $\chi^2=0.1357$ ;  $P=0.71251$ ); *XRCC1*-rs25487 (SG:  $\chi^2=2.7170$ ;  $P=0.09928$  and CG:  $\chi^2=2.4417$ ;  $P=0.11814$ ); which was not observed with *RTEL1*-rs601620 (SG:  $\chi^2=N/C$ ;  $P=N/C$  and CG:  $\chi^2=203$ ;  $P=0.00000$ ).

Table 3 shows the genotype distribution (wild-type homozygous versus genotype with risk allele), according to the tumor histological classification. Risk genotypes *CCND1*-rs9344 ( $\_ /G$ ) stood out in all histological classifications, particularly in Grades I (100%) and II (86%); whereas the wild-type genotype (A/A) in Grades III (33%) and IV (31%). *RTEL1*-rs601620 showed risk genotypes ( $\_ /G$ ) with 100% representability in all histological classifications. For the *XRCC1*-rs25487 polymorphism, risk genotypes ( $\_ /C$ ) prevailed in Grade I (57%) and IV (59%); whereas the wild-type homozygotes (T/T) prevailed in Grade II (71%) and Grade III (56%). There were similarities among the genotypes in the four histological classifications for all polymorphisms analyzed ( $P> 0.05$ ).

In the logistic regression analysis, genotypes with at least one risk allele were considered, as well as DM and smoking, with no significant difference ( $P> 0.05$ ). For the other variables, alcohol consumption and hypertension were identified as independent risk factors for gliomas ( $P=0.0001$ ,  $P=0.0027$ , respectively). The logistic regression equation was represented as follows: (logit  $Y = -1.732869 + 1.463821$  alcohol consumption  $+ 0.883435$  SAH  $+ 0.693107$  DM).

The actuarial Kaplan-Meier curve assessed the survival of patients with gliomas starting on the patient's day of surgery. The analysis of the total sample showed  $18.8 \pm 5.3\%$  of patients free-event/ death in three years. The survival analysis showed similarity between risk genotypes and wild-type genotype for all analyzed polymorphisms ( $P>0.05$ ). Regarding the response to treatment, the group under TMZ and

radiation therapy showed higher prevalence of free event/death ( $78.7 \pm 7.6\%$  in 20 months), compared to those treated with TMZ ( $21.9 \pm 5, 1\%$  in 20 months), but with no significant difference ( $P > 0.05$ ; Figure 1).

### *Discussion*

In this study, clinical profiles, lifestyle habits, comorbidities and survival of patients with gliomas and controls were evaluated, as well as their association with genetic variants involved in cell cycle regulation (*CCND1*), DNA single-strand break repair (*XRCCI*) and stability, protection and elongation of telomeres (*RTELI*). For lifestyle habits, smoking stood out in patients with gliomas (40.0%), confirming its relationship with brain tumors. The same occurred in meta-analysis studies showing that cigarette compounds are able to cross the blood brain barrier (BBB) (8). BBB is responsible for maintaining brain homeostasis, blocking several endogenous and carcinogens substances in a selective manner (16). N-nitroso compounds and nicotine are some of the major carcinogens found in tobacco. They are able to modify various pathways, damaging endothelial function and cell proliferation and migration, causing the formation of tumors (8). A study in rats showed the formation of gliomas after the administration of N-nitroso compounds (17). On the other hand, a meta-analysis found no association between tobacco smoking and glioma in six cohort studies and 11 case-control studies (18), suggesting the involvement of other factors in the carcinogenesis.

Alcohol consumption also prevailed in patients (47.0%). Alcohol is an important neurotoxic, capable of generating several diseases over time through excessive consumption (19). After alcohol ingestion, it is oxidized into acetaldehyde, which is a well-known toxic metabolite to the brain, as it has carcinogenic effect and leads to changes in gene expression, methylation and various other processes. Furthermore, alcohol metabolism generates reactive species oxygen, which plays an important role in brain tumorigenesis (7). It is still unclear if the excessive use of alcohol is related to gliomas. Studies have confirmed the relationship between alcohol consumption and some cancers, such as pharynx, larynx, esophagus, liver, colon, rectum and breast. However, an association with gliomas has not been found so far (20).

Among all comorbidities, SAH was more frequent in patients with glioma (55.0%), similar to the findings in a Dutch population (18,19). There is a scant relation between SAH and risk factor for glioma, particularly in the Brazilian population, with no reports in the literature. Several hypotheses may explain the higher SAH prevalence in patients with gliomas. Increased intracranial pressure or compression of the

brain stem caused by the growth and expansion of tumors can be pointed out, which may cause SAH. Admittedly, high-grade gliomas produce cytokines and vasoactive substances related to angiogenesis and vascular remodeling (21).

In this study, DM prevailed in patients with gliomas (22.0%), corroborating the findings of a North American study (22). This disease affects more than 246 million people worldwide and is associated with several types of cancer, such as liver, pancreas, endometrium, breast and bladder (23). Studies have shown that hyperglycemia causes increased mortality and morbidity in many diseases in the acute phase (24). In this case, it can be related to tumor growth, as glucose is one of the major substrates of cerebral metabolism. Also, high-grade brain tumors have a high consumption of glucose, thus DM is related to short survival in patients with gliomas (25). However, there are few studies that correlate this comorbidity to gliomas. *In vitro* studies have shown high rates of hyperglycemia associated with glioblastoma cells, but when glucose is removed, there was significant increase in apoptosis rates (26,27).

Noteworthy, obesity is associated with approximately 20% of all cases of cancer (25). In this study, there was no association of overweight or obesity with gliomas; on the other hand, high body mass index in adulthood has been linked to increased risk of the disease, showing that negative energy balance can contribute to the development of brain tumors (22). In a meta-analysis of 22 studies including meningiomas and gliomas, overweight shows a substantial increased risk for both tumor types (24). However, in another meta-analysis, the relationship between overweight or obesity and gliomas could not be confirmed (25).

This study found no association between genotype and allele frequencies of the polymorphisms of *CCND1* (rs9344), *XRCC1* (rs25487) and *RTEL1* (rs6010620) with gliomas, supporting several studies conducted with Chinese and Caucasian populations (20,28,29). For the *CCND1*-rs9344 polymorphism, the heterozygous genotype (A/G) prevailed in controls, compared to patients, but with no statistical difference. However, there is reference of amplification, mutation, and high expression of *CCND1* associated with resistance to chemotherapy and poor prognosis in breast, brain and testicular germ cells tumors (29).

Regarding the *XRCC1*-rs25487 polymorphism, it was similar between the groups in this and other meta-analysis (30). On the other hand, Zhai et al. showed an association between this polymorphism and the development of gliomas (31). The *XRCC1* protein is essential for the base excision repair pathway, repair of small lesions, such as alkylation, methylation, single-strand breaks, as well as

oxidative damage (31). In this case, the polymorphism involves changes in evolutionarily conserved amino acid sequences, changing the XRCC1 function, which decreases the repair kinetics and increases the risk for glioma (32). Mutations in nucleotide bases cause the most common lesions of DNA. Therefore, once the XRCC1 protein function is affected, cell sensitivity to radiation alkylating agents and oxidative stress may be increase (31).

In this study, the heterozygous genotype (A/G) prevailed for *RTEL1* in both groups, the results of which are unprecedented in studies with the Brazilian population, with mixed-race feature, and genome-wide genetic diversity (33). According to the National Center of Biotechnology Information (NCBI) databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snpref.cgi?Rs=6010620>), the prevalence of that genotype and the allele frequency (A/G) was similar in the European population. On the other hand, a meta-analysis study of that polymorphism was associated with increased risk for glioma (14). *RTEL1* is a DNA helicase that plays an important role in regulating telomere length, and its loss is related to telomere shortening, breakpoints and chromosome translocations (11). The sample size may have been a limiting factor in this study. HW equilibrium was not confirmed for *RTEL1*-rs6010620 in patients and controls. The absence of HW equilibrium suggests, among other phenomena, the impact of evolutionary factors which may alter genotypic frequencies. The criteria used in the randomization of the groups can also be pointed out (34).

Regarding the morphological characterization of tumors, there was no association between histological classifications and genotypes of *CCND1*, *XRCC1* and *RTEL1*, in agreement with a study conducted with a Caucasian population (35). However, the polymorphism of *CCND1* was more common in high-grade gliomas III-IV, similar to the study with a Chinese population. (35) For *XRCC1*, risk genotypes (A/C) stood out, especially in Grade IV gliomas, which were also found in a North American sample (36). These data suggest that the genetic risk profile of gliomas is related to disease severity characterized by histological analysis (37). For *RTEL1*, the heterozygous genotype (A/G) prevailed in all histological classifications.

In relation to the survival analysis of all patients, this study showed that on average 18% of patients are free of death event in three years, corroborating the findings of other studies (38, 39). Furthermore, even with aggressive treatment, 3-5 year mortality rate is higher than 95% (40). The analysis of the survival curve for the polymorphisms of *CCND1*, *XRCC1* and *RTEL1* showed reduced survival, although without statistical significance in the presence of the respective risk alleles of these

polymorphisms. These findings are similar to the studies in other populations (12, 41, 42). It is noteworthy that studies which related these polymorphisms to survival of patients with gliomas are quite rare in the literature and pioneer in the Brazilian population. Studies show that polymorphisms of *CCND1*, *XRCCI* and *RTEL1* and patients' survival are related to other types of cancer, such as lung, pharynx and larynx cancers (43).

In this study, increased survival in patients receiving combined chemotherapy with Temozolamide (TMZ) and radiation therapy (RT) could also be observed. The same was found in a review study, which found that TMZ + RT are able to prolong survival of patients with glioma (44). Admittedly, the post-surgical treatment of patients with glioblastoma and anaplastic astrocytoma is rather worrying, with survival rate at about six months (44). TMZ + RT are an important therapy, causing glioma cells death via autophagy through the combination of mTOR inhibitors (enhancers or autophagy). Radiation modulation or TMZ-induced autophagic response is one of the most promising approaches to prolong survival and understand high-grade gliomas (45).

Logistic regression analysis, with all variables, was more likely to belong to the group with gliomas, with the following characteristics: alcohol consumption and SAH. Importantly, these variables are possible predictors of the disease, corroborating the findings of another study (17).

### *Conclusion*

In this study, polymorphisms involved in cell cycle (*CCND1*), DNA repair (*XRCCI*) and protection and stability of telomeres (*RTEL1*) are not associated with gliomas. On the other hand, lifestyle habits and comorbidities are associated with gliomas, especially alcohol consumption and SAH, as independent risk factors for the development of the disease. Low-grade gliomas, response to treatment and the combination of chemotherapy and radiotherapy shows increased survival of patients.

*Acknowledgments:* Medical school of Sao Jose do Rio Preto-FAMERP; the Center for Research in Biochemistry and Molecular Biology-NPBIM/FAMERP for supporting the execution of this study, CNPq and FAPERP.

### *References*

1. Zhang C, Lu Y, Zhang X, Yang D, Shang S, et al. The role of the RTEL1 rs2297440 polymorphism in the risk of glioma development: a meta-analysis. *Neurol Sci* 7: 1023-1031, 2016.



2. Walsh KM, Ohgaki H, Wrensch MR. *Epidemiology. Handb Clin Neurol* 134: 3-18, 2016.
3. INCA. Title of subordinate document. In: *Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Accessed online at <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>, 2016.
4. Wang X, Zhang H, Wang D, Li X. Association of genetic polymorphisms of EGFR with glioma in a Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers* 1:59-62, 2015.
5. Hattingen E, Jurcoane A, Daneshvar K, Pilatus U, Mittelbronn M, et al. Quantitative T2 mapping of recurrent glioblastoma under bevacizumab improves monitoring for non-enhancing tumor progression and predicts overall survival. *Neuro Oncol* 10: 1395-1404, 2013.
6. Brisson RT, Santos AASMD. The magnetic resonance imaging in the diagnosis and staging of brain gliomas: the application of proton spectroscopy technique. *Rev Med* 3: 465-477, 2014.
7. Galeone C, Malerba S, Rota M, Bagnardi V, Negri E, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and the risk of brain tumours. *Ann Oncol* 2: 514-523, 2013.
8. Hou L, Jiang J, Liu B, Han W, Wu Y, et al. Smoking and adult glioma: a population-based case-control study in China. *Neuro Oncol* 1: 105-113, 2016.
9. Talacchi A, Hasanbelliu A, Fasano T, Gerosa M. Interhemispheric approach to tumors of the posterior gyrus cinguli. *Clin Neurol Neurosurg* 5: 597-602, 2013.
10. Seliger C, Ricci C, Meier CR, Bodmer M, Jick SS, et al. Diabetes, use of antidiabetic drugs, and the risk of glioma. *Neuro Oncol* 3: 340-349, 2016.
11. Wu Q, Peng Y, Zhao X. An Updated and Comprehensive Meta-Analysis of Association Between Seven Hot Loci Polymorphisms from Eight GWAS and Glioma Risk. *Mol Neurobiol* 7: 4397-4405, 2016.
12. Chen YJ, Xie LJ, Zhuang YD, Guo SR. Note of the methodological flaws in the paper entitled "Association between the G870A polymorphism of cyclin D1 gene and glioma risk". *Tumour Biol* 11: 8267-8268, 2015.
13. Zhang H, Liu Y, Zhou K, Zhou C, Zhou R, et al. Genetic variations in the homologous recombination repair pathway genes modify risk of glioma. *J Neurooncol* 1: 11-7, 2016.
14. Zhao W, Bian Y, Zhu W, Zou P, Tang G. Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1) rs6010620 polymorphism contribute to increased risk of glioma. *Tumour Biol* 6: 5259-5266, 2014.

15. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem 8 Pt 1*:1748-1750, 1998.
16. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, et al. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health* 12: 4111-4126, 2010.
17. Li HX, Peng XX, Zong Q, Zhang K, Wang MX, et al. Cigarette smoking and risk of adult glioma: a meta-analysis of 24 observational studies involving more than 2.3 million individuals. *Onco Targets Ther* 9: 3511-3523, 2016.
18. Mandelzweig L, Novikov I, Sadetzki S. Smoking and risk of glioma: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 10: 1927-1938, 2009.
19. Baglietto L, Giles GG, English DR, Karahalios A, Hopper JL, et al. Alcohol drinking and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Int J Cancer* 8: 1929-1934, 2011.
20. Qi ZY, Shao C, Yang C, Wang Z, Hui GZ. Alcohol drinking and risk of glioma: a meta-analysis of 19 observational studies. *Nutrients* 2: 504-516, 2014.
21. Houben MP, Louwman WJ, Tijssen CC, Teepen JL, Van Duijn CM, et al. Hypertension as a risk factor for glioma? Evidence from a population-based study of comorbidity in glioma patients. *Ann Oncol* 8: 1256-1260, 2004.
22. Kitahara CM, Linet MS, Brenner AV, Wang SS, Melin BS, et al. Personal history of diabetes, genetic susceptibility to diabetes, and risk of brain glioma: a pooled analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1: 47-54, 2014.
23. Zhao L, Zheng Z, Huang P. Diabetes mellitus and the risk of glioma: a meta-analysis. *Oncotarget* 4: 4483-4489, 2016.
24. Derr RL, Ye X, Islas MU, Desideri S, Saudek CD, et al. Association between hyperglycemia and survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 7: 1082-1086, 2009.
25. Sergentanis TN, Tsivgoulis G, Perlepe C, Ntanasis-Stathopoulos I, Tzanninis IG, et al. Obesity and Risk for Brain/CNS Tumors, Gliomas and Meningiomas: A Meta-Analysis. *PLoS One* 9: e0136974, 2015.

26. Oudard S, Arvelo F, Miccoli L, Apiou F, Dutrillaux AM, et al. High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss. *Br J Cancer* 6: 839-845, 1996.
27. Adeberg S, Bernhardt D, Ben Harrabi S, Bostel T, Mohr A, et al. Metformin influences progression in diabetic glioblastoma patients. *Strahlenther Onkol* 12: 928-935, 2015.
28. Walsh KM, Rice T, Decker PA, Kosel ML, Kollmeyer T, et al. Genetic variants in telomerase-related genes are associated with an older age at diagnosis in glioma patients: evidence for distinct pathways of gliomagenesis. *Neuro Oncol* 8: 1041-1047, 2013.
29. Zeybek U, Yaylim I, Ozkan NE, Korkmaz G, Turan S, et al. Cyclin D1 gene G870A variants and primary brain tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 4101-4106, 2013.
30. Zhai W, Feng R, Wang H, Wang Y. Note of clarification of data in the paper titled X-ray repair cross-complementing group 1 codon 399 polymorphism and lung cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol* 5: 3179-89, 2015.
31. Zhu W, Yao J, Li Y, Xu B. Assessment of the association between XRCC1 Arg399Gln polymorphism and glioma susceptibility. *Tumour Biol* 4: 3061-3066, 2014.
32. Liu N, Fei X, Shen Y, Shi W, Ma J. Correlation between XRCC1 Arg399Gln genetic polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 9: 579-586, 2016.
33. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2: e17063, 2011.
34. Octavio-Aguilar P, Ramos-Frías J. [Application of population genetics in the field of medicine]. *Biomedica* 2: 171-179, 2014.
35. Di Stefano AL, Enciso-Mora V, Marie Y, Desestret V, Labussière M, et al. Association between glioma susceptibility loci and tumour pathology defines specific molecular etiologies. *Neuro Oncol* 5: 542-547, 2013.
36. Chen X, Zhao T, Li L, Xu C, Zhang X, et al. CCND1 G870A polymorphism with altered cyclin D1 transcripts expression is associated with the risk of glioma in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 6: 1107-1113, 2012.

37. McKean-Cowdin R, Barnholtz-Sloan J, Inskip PD, Ruder AM, Butler M, et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 1118-1126, 2009.
38. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 6: 803-820, 2016.
39. Shin JY, Diaz AZ. Anaplastic astrocytoma: prognostic factors and survival in 4807 patients with emphasis on receipt and impact of adjuvant therapy. *J Neurooncol* 3: 557-565, 2016.
40. Clark PA, Bhattacharya S, Elmayan A, Darjatmoko SR, Thuro BA, et al. Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration. *J Neurosurg* 15: 1-13, 2016.
41. Melchardt T, Hufnagl C, Magnes T, Weiss L, Hutarew G, et al. CYP39A1 polymorphism is associated with toxicity during intensive induction chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *BMC Cancer* 15: 725, 2015.
42. Wibom C, Späth F, Dahlin AM, Langseth H, Hovig E, et al. Investigation of established genetic risk variants for glioma in prediagnostic samples from a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 810-816, 2015.
43. Liu JY, Liu QM, Li LR. Association of GSTP1 and XRCC1 gene polymorphisms with clinical outcomes of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 3: 10331-10337, 2015.
44. Parisi S, Corsa P, Raguso A, Perrone A, Cossa S, et al. Temozolomide and radiotherapy versus radiotherapy alone in high grade gliomas: a very long term comparative study and literature review. *Biomed Res Int* 2015:620643, 2015.
45. Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve. *Br J Cancer* 5: 485-496, 2016.

**Table I:** Distribution of comorbidities and lifestyle habits in patients with gliomas (Study Group - SG) and individuals without any signs of the disease (Control Group - CG).

Variables	SG		CG		P total
	(N =100)		(N = 203)		
	N	%	N	%	
<b>Lifestyle Habits</b>					
<b>Smoking</b>	40	40.0	50	24.6	<b>0.0088</b>
<b>Alcohol Consumption</b>	47	47.0	34	16.7	<b>0.0001</b>
<b>Commorbities</b>					
<b>SAH</b>	55	55.0	55	27.1	<b>0.0001</b>
<b>Diabetes Mellitus</b>	22	22.0	17	8.4	<b>0.0011</b>
<b>BMI <math>\geq</math>25 kg/m2</b>	58	58.9	61*	62.2	<b>0.6421</b>

\*Chi-Square Test; P = Significance Level  $<0.05$ ; N = Number of Individuals; SAH = Systemic Arterial Hypertension; BMI = Body Mass Index; \*61=61/98.

**Table II.** Distribution of genotype and allele frequencies of the polymorphism of *CCND1*-rs9344; *XRCC1*-rs25487 and *RTEL1*-rs601620 in patients with gliomas (SG) and individuals without the disease (CG).

	Model	Genotype	SG	CG	P
<i>CCND1</i> (rs9344)	Dominant	G/G	36 (36.0)	65 (32.0)	0.5744
		A/G + A/A	64 (54.0)	138 (68.0%)	
	OR(CI95%)		<b>1.12 (0.80-1.56)</b>		
	Codominant	A/G	41 (41.0)	102 (50.2)	0.1684
		G/G + A/A	59 (59.0)	101 (49.8)	
	OR(CI95%)		<b>0.77 (0.55-1.08)</b>		
	Recessive	A/A	23 (23.0)	167 (82.3)	0.3502
		G/G + A/G	77 (77.0)	167 (82.3)	
	OR(CI95%)		<b>1.23 (0.85-1.78)</b>		
			Allele	Freq. Abs.	
		G	113(0.56)	232(0.57)	0.9497
		A	87(0.44)	174(0.43)	
	Model	Genotype	SG	CG	P
<i>XRCC1</i> (rs25487)	Dominant	T/T	46 (46.0)	98 (48.3)	0.8020
		T/C + C/C	54 (54.0)	105 (51.7)	
	OR(CI95%)		<b>0.94 (0.68-1.29)</b>		
	Codominant	T/C	38 (38.0)	79 (38.9)	0.9772
		T/T + C/C	62 (62.0)	124(61.1)	
	OR(CI95%)		<b>0.9744 (0.69-1.35)</b>		
	Recessive	C/C	16 (16.0)	26 (12.8)	0.5623
		T/T + T/C	84 (84.0)	177 (87.2)	
	OR(CI95%)		<b>1.18 (0.77-1.80)</b>		
			Allele	Abs. Freq.	
		T	130 (0.65)	275 (0.68)	0.5616
		C	70 (0.35)	131 (0.32)	
	Model	Genotype	SG	CG	P
<i>RTEL1</i> (rs6010620)	Dominant	A/A	0 (0.0)	0 (0.0)	N/C
		A/G + GG	100 (100.0)	203 (100.0)	
	OR(CI95%)		N/C		
	Codominant	A/G	99 (99.0)	203 (100.0)	0.3311
		A/A + G/G	1 (1.0)	0 (0.0)	
	OR(CI95%)		<b>0.32 (0.27-0.38)</b>		
	Recessive	G/G	1 (1.0)	0 (0.0)	0.3300
		A/A + A/G	99 (99.0)	203 (100.0)	
	OR(CI95%)		<b>3.05 (2.59-3.58)</b>		
			Allele	Abs. Freq.	
		A	99 (0.49)	203 (0.50)	0.9766
		G	101 (0.51)	203 (0.50)	

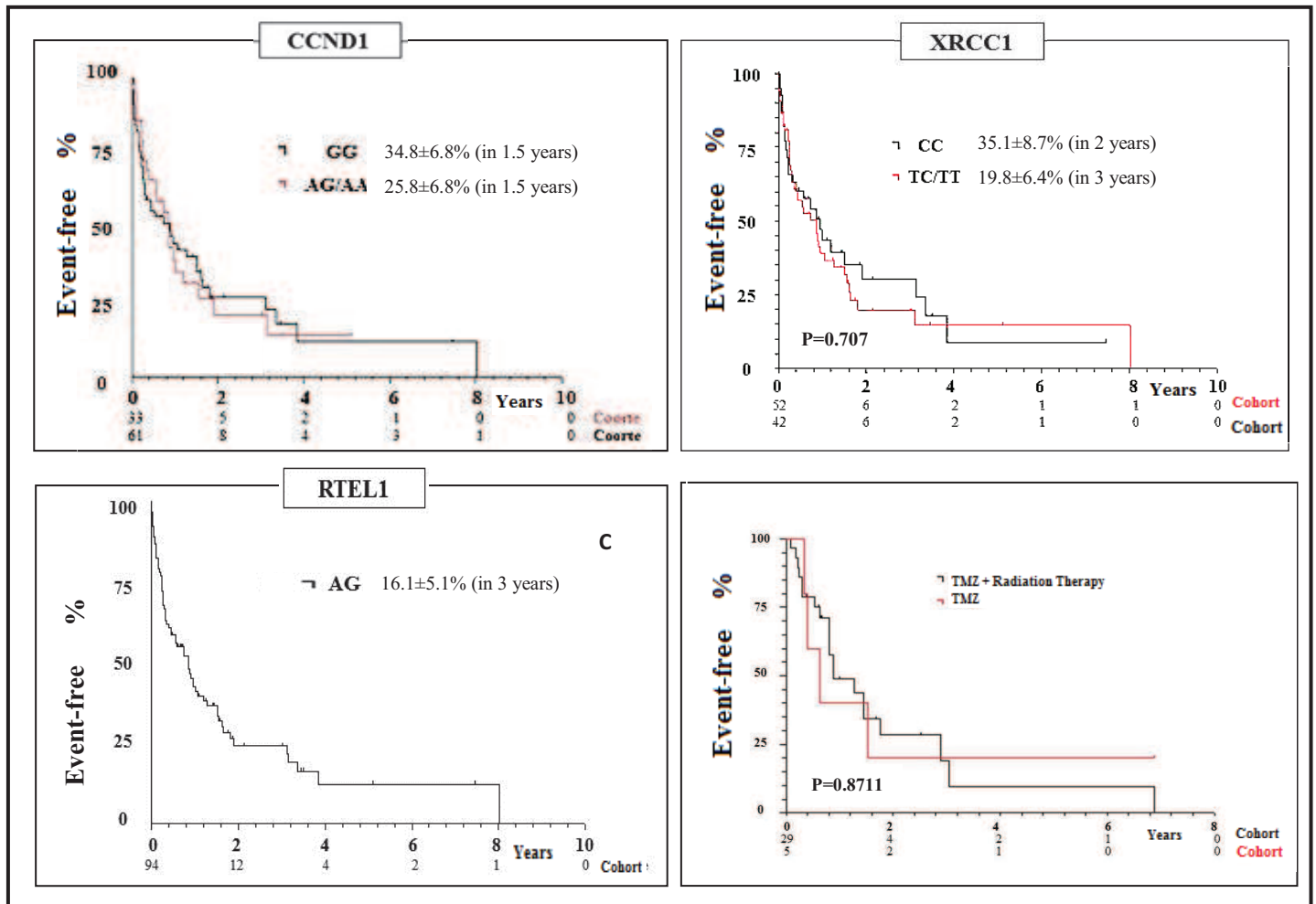
\*Chi-Square and Fischer's Tests with significance level of  $P < 0.05$ ; SG= Study Group; CG=Control Group; N= number of individuals; Abs. Freq.= Absolute Frequency; *CCND1* = Cyclin D1; *XRCC1* = X-ray repair cross complementing group 1; *RTEL1* = Regulator of telomere elongation helicase 1 and NC = Not Calculated.

**Table III.** Frequency of histological classifications, distributed according to the genotypes of *CCND1*-rs9344; *XRCC1*-rs25487 and *RTEL1*-rs601620 in patients with gliomas.

Histological Type	<i>CCND1</i> -rs9344			<i>XRCC1</i> -25478			<i>RTEL1</i> -601620		
	(N=100)		p	(N=100)		P	(N=100)		P
	AA	_/G		TT	_/C		AA	_/G	
	N(%)	N(%)		N(%)	N(%)		N(%)	N(%)	
<b>Grade I</b> N=7	0(0)	7(100)	0,1858	3(43)	4(57)	0,9269	0(0)	7(100)	N/C
<b>Grade II</b> N=7	1(14)	6(86)	0,6696	5(71)	2(29)	0,2428	0(0)	7(100)	N/C
<b>Grade III</b> N=18	6(33)	12(67)	0,7897	10(56)	8(44)	0,5240	0(0)	18(100)	N/C
<b>Grade IV</b> N=68	21(31)	47(69)	0,4858	28(41)	40(59)	0,2318	0(0)	68(100)	N/C

\*Chi-Square and Fischer's Tests with significance level of  $P < 0.05$ ; *CCND1* = Cyclin D1; *XRCC1* = X-ray repair cross complementing group 1; *RTEL1* = Regulator of telomere elongation helicase 1 and NC = Not Calculated.

**Figure 1.** Kaplan-Meier Curve for analysis of event-free survival (death) in patients with gliomas, related to genotypes; CCND1= genotype GG and AG/AA; XRCC1= genotype TT and TC/CC and RTEL1= genotype AG and patients with gliomas who received Temozolamide and Radiation Therapy.



\*Actuarial Kaplan-Meier Curve; Log Rank Test, with significance level of  $<0.05$ ; CCND1 = Cyclin D1; XRCC1 = X-ray repair cross complementing group 1; RTEL1 = Regulator of telomere elongation helicase 1; TMZ= Temozolamide; A= Image A; B= Image B; C=Image C and D=Image D.