ALINE CADURIN CUSTÓDIO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM TUMORES
GLIAIS HUMANOS**

Tese apresentada à pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Profa. Dra. Cacilda Casartelli
Orientadora

**Ribeirão Preto
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Custódio, Aline Cadurin

Análise de Polimorfismos em Tumores Gliais Humanos.
Ribeirão Preto, 2011.

141p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética
Orientador: Casartelli, Cacilda.

1. Astrocitomas. 2. Glioblastomas. 3. Polimorfismo.

“Nenhuma teoria resolve todos os enigmas com os quais se confronta em um determinado momento. Nem todas as soluções já obtidas são geralmente perfeitas. Ao contrário, é exatamente a imperfeição e a suficiência de ajustes dos dados existentes que em qualquer época, definem muitos dos desafios que caracterizam a Ciência”

(Kuhn, T.S.)

Agradecimentos

Primeiro a **Deus** por iluminar meus caminhos, dar-me forças e capacitar-me diariamente para chegar aos objetivos almejados.

Aos meus pais, maiores exemplos de vida, meu porto seguro, junto dos quais todas as dificuldades se tornam leves, muito obrigada pelo apoio e confiança em todos os momentos e em todas as escolhas.

À Profa. Dra. Cacilda Casartelli pela orientação, incentivo constante e por me receber de braços abertos em seu laboratório, dando todo apoio para realização deste trabalho.

À minha irmã Adriana, seu esposo Paulo e minha afilhada Flávia por todo o carinho, amizade, companheirismo; por sermos tão unidos.

Ao meu irmão Lucas, sua esposa Silvana e minhas sobrinhas Ana Carolina e Maria Eduarda, por todo carinho, por me receberem sempre de braços abertos em sua casa me dando todo apoio e carinho, estando do meu lado em todos os momentos bons e ruins.

Aos professores, funcionários e amigos do departamento de Genética, por todo ensinamento e ajuda que me deram. À CAPES, FAPESP e FAEPA, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Oncogenética Márcio Rogério Penha, Vanderci Massaro de Oliveira e a Francisca Rosa dos Santos Martins, que na maioria das vezes antecipavam meus pedidos de ajuda, sem os quais este trabalho não seria viável.

Às colegas do laboratório, Luciana, Juliana e Ludmila, que permitiram um ambiente favorável para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes e voluntários cujas contribuições foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos médicos do Hospital de Câncer de Barretos, Dr. Marcelo José dos Santos, Dr. José Reynaldo e Dr. Carlos Clara, pela colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas da Academia Forma Fitness, Tati, Eloá, Danilo, Fernanda, Mariana e ao meu amigo e treinador Jonny, pelo apoio, incentivo e bons momentos de risadas e descontração.

Aos meus amigos: Lu (meu irmão), Sil, Dani, Lu, Marcelinho, Kisy, Ronaldo, Bruna, Gilmar, Dani, Renata, Renato, Marcinha, pelos nossos momentos de descontração, risadas, companheirismo, carinho, sempre me apoiando e comemorando ao meu lado a cada conquista.

A todos os meus colegas do curso de inglês da Unidade CNA Campos Salles pelo carinho, apoio, incentivo e pelas boas risadas.

As meninas do Salão Taty's (Tati, Lu, Bia, Isa, Re) por me aturarem sempre ouvindo dizer: “aqui a genética é boa”; pelas risadas, conversas legais, pelos momentos de descontração e companheirismo.

Todos meus familiares e colegas que sempre me apoiaram, torceram por mim e que acreditaram em meus sonhos.

A todos vocês o meu muito obrigada!!!!

Força, Fé e Esperança!!!! Quem acredita sempre alcança!!!!

RESUMO

Custódio, A.C. Análise De Polimorfismos Em Tumores Gliais Humanos.

Os tumores do sistema nervoso central representam aproximadamente 2% de todos os tipos de cânceres. Embora a incidência dos tumores do SNC seja pequena, comparada com outras neoplasias, estes tumores estão entre as mais graves malignidades humanas, pois afetam o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades orgânicas. Os gliomas são os tumores mais comuns do SNC. Apesar do progresso marcante na caracterização da patogênese molecular dos gliomas, esses tumores permanecem incuráveis e, na maioria dos casos, refratários aos tratamentos, devido à sua heterogeneidade molecular. O aparecimento desses tumores ocorrem a partir do acúmulo de alterações genéticas nas células. Para entender o mecanismo molecular de formação e progressão tumoral é indispensável identificar os genes que acumulam essas alterações. Um polimorfismo de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) é geralmente definido como uma substituição estável de apenas uma base na molécula de DNA com frequência maior que 1%, em pelo menos uma população. Os SNPs são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente utilizados nos estudos de associação genética de várias doenças complexas, como por exemplo: distúrbios cardiovasculares, psiquiátricos e auto-imunes, obesidade, osteoporose, diabetes e câncer. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar polimorfismos entre populações caso e controle na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade aos tumores. A técnica utilizada para a análise de polimorfismos foi de PCR-RFLP onde observamos diferenças nas distribuições genotípicas entre pacientes e controles nos SNPs EGF+61, GSTP-1Ile 105 Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met e XRCC4 G1394T, onde as variantes EGF G61, Trp194, Val105, Pro206, His280, Gln632, His188, Met241 e XRCC4 T1394 foram observados com maior frequência entre os portadores de gliomas. Dessa forma, estas variantes podem ser fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento dos tumores.

Palavras-chave: Polimorfismos, Astrocitomas, Glioblastomas

ABSTRACT

Custódio, A.C. Polymorphisms Analysis in Human Glial Tumors.

The Central nervous system tumors represent about 2% of all cancers. Although the incidence of CNS tumors is small compared with other cancers, these tumors are among the most serious human malignancies, because they affect the body responsible for coordination and integration of all organic activities. Gliomas are the most common tumors of the CNS. Despite remarkable progress in characterizing the molecular pathogenesis of gliomas, these tumors remain incurable and, in most cases, refractory to treatment, due to its molecular heterogeneity. The appearance of these tumors occurs from the accumulation of genetic changes in cells. To understand the molecular mechanism of tumor formation and progression is essential to identify genes that accumulate these changes. A single base polymorphism (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) is generally defined as a stable replacement of only one base in the DNA molecule often greater than 1% in at least one population SNPs are recognized as important tools in human genetics and medical and have been widely used in genetic association studies of various complex diseases, such as: cardiovascular, psychiatric and autoimmune diseases, obesity, osteoporosis, diabetes and cancer. Thereby, the objective of this study was to analyze the polymorphisms between cases and control the intention to identify associations of these genotypes in susceptibility to tumors. The technique used for the analysis of polymorphisms were PCR-RFLP where we observe differences in genotype between patients and controls in the EGF +61, GSTP-1 Ile105Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met and XRCC4 G1394T, where the variants EGF G61, Trp194, val105, Pro206, His280, Gln632, His188, Met241 and XRCC4 T1394 were observed more frequently among patients with gliomas. Thus, these variants can be important factors of susceptibility to the tumor development.

Keywords: Polymorphisms, astrocytomas, glioblastoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	10
1.3 TUMORES ASTROCÍTICOS	15
1.4 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)	18
1.5 GENE EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)	20
1.6 GENE GSTP1 (GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1)	22
1.7 GENES XRCC (X-RAY CROSS COMPLEMENTING GROUP)	23
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GERAL	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. AMOSTRAS	34
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	36
3.3 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	37
3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
3.5 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	39
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	42
3.7 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	42
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma doença multifatorial que resulta de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais. Em geral um único fator ambiental ou apenas uma alteração genética não leva ao desenvolvimento de tumores; são necessárias várias alterações genéticas para que se desenvolva uma neoplasia (Jelonek et al., 2010). Os tumores se desenvolvem em células que estão se dividindo (Campisi, 2005). A origem de um tumor ocorre através de várias alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas, ganho de função, perda de função, polimorfismos, ocorrendo comprometimento da manutenção da integridade genômica. Assim, as alterações, tanto genéticas quanto epigenéticas, promovem a instabilidade da homeostase celular (Sugimura e Ushijima, 2000; Richardson, 2003, Jelonek et al., 2010).

Essas alterações podem ocorrer em um ou mais genes, seguidas pelo acúmulo de alterações em vários genes, levando a uma falta de estabilidade, que demonstra a complexidade da doença. Este acúmulo, em função do tempo, faz com que o tumor atinga seu maior grau de malignidade, o que, geralmente, culmina em metástase (Bartek e Lukas, 2001, Jelonek et al., 2010).

As células cancerosas invadem o tecido vizinho ao local em que elas se originaram. Essa invasão permite que as células penetrem na corrente sanguínea ou vasos linfáticos, formando tumores secundários, ou metástases, em outros locais do corpo (Thiery, 2002; Mareel e Leroy, 2003; Ministério da Saúde, 2010).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), para que todo câncer se desenvolva, é necessária a ocorrência de alterações essenciais na fisiologia celular que, juntas, determinam o crescimento maligno: perda de sinalização de parada normal de proliferação celular; perda de sinalização para diferenciação celular; sinalização autócrina para divisão celular; redução de apoptose; capacidade de transpor a membrana basal de outros tecidos e órgãos e indução de angiogênese. Para que estes processos aconteçam, várias vias bioquímicas estão envolvidas, formando uma complexa rede de sinalização celular. Estas vias apresentam-se geralmente alteradas nos processos tumorais, pois os genes que as compõem sofrem alterações, culminando na desregulação do ciclo celular (Paige, 2003). A identificação e a determinação funcional de tais genes são essenciais para o entendimento da biologia do câncer e das aplicações clínicas, como a identificação de alvos terapêuticos, detecção precoce e curso da doença (Albertson et al., 2003).

Antigamente o modelo genético do câncer era baseado em alterações cromossômicas. Atualmente diversas alterações moleculares que ocorrem entre os vários tipos de câncer, levaram à idéia de que estes envolvam muitas doenças. Os tumores sólidos progridem de tumores benignos, relativamente bem diferenciados e não invasivos, provavelmente envolvendo uma ou poucas mutações, para cânceres in situ com instabilidade genética, mas baixo potencial invasivo e metastático, sendo que por último progridem para tumores invasivos e metastáticos, através do aumento de mudanças genéticas que proporcionam adaptação a essas células em diversos outros ambientes do corpo (Feinberg et al., 2006).

Sabendo-se que o DNA é o material genético e com as poderosas tecnologias desenvolvidas, são muitas as oportunidades de estabelecer o conceito de câncer para níveis cada vez mais específicos, como para uma única molécula, e determinar quantas e quais alterações são requeridas no processo de tumorigênese. A determinação de alterações genéticas em câncer é de extrema importância, sendo que a identificação de um grande número de alterações em cânceres em progressão pode ser o método para quantificar a extensão da heterogeneidade de um tumor e avaliar pacientes quanto ao risco ou desenvolvimento de resistência a drogas (Loeb et al., 2008).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo no qual estão envolvidas anormalidades em muitos genes. A combinação de todos os genes mutados pode revelar as relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, além de identificar alvos para o desenvolvimento de tratamentos (Yeang et al., 2008.).

O câncer é um dos problemas mais comuns na medicina clínica; dados estatísticos e epidemiológicos mostram que o câncer atinge mais de um terço da população mundial, levando à morte em mais de 20% dos casos. Estima-se que no ano de 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 apontam a ocorrência de aproximadamente 489.270 casos novos de câncer, sendo esperados 236.240 casos para o sexo masculino e 253.030 casos para o sexo feminino (Ministério da Saúde – INCA, 2010).

1.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) representam aproximadamente 2% de todos os tipos de neoplasias, apresentam alta taxa de mortalidade e acometem, em muitos casos, indivíduos jovens e na fase reprodutiva da vida (Ohgaki e Kleihues, 2005; Tews et al., 2006).

A incidência anual é de aproximadamente 15 casos por 100.000 pessoas ao ano, apresentando relação direta com a idade. Do nascimento até os 4 anos de idade, a incidência é de 3,1 casos por 100.000 pessoas, apresentando uma queda na faixa etária de 15 a 24 anos. A partir dos 65 anos, a incidência aumenta progressivamente, com aproximadamente 18 casos por 100.000 pessoas ao ano (Riemenschneider e Reinferberger, 2009).

As taxas de mortalidade por tumores do SNC variam de 3 a 7 óbitos por 100.000 pessoas por ano, sendo que a incidência e mortalidade são, em geral, maiores em homens do que em mulheres (Ohgaki e Kleihues, 2005; Ohgaki, 2009.)

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, não há informações relevantes referentes à incidência, prevalência e mortalidade destes tumores no Brasil (Ministério da Saúde – INCA, 2010).

Estes tumores estão entre as mais graves malignidades humanas, pois afetam o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades orgânicas. Além disso, como cada região do cérebro tem uma função vital, a terapia empregada em outras neoplasias (remoção cirúrgica total do órgão ou do tumor com uma generosa margem de tecido normal) não pode ser aplicada na cura de tumores cerebrais, o que compromete muito a qualidade e a sobrevida do paciente (Louis et al., 2002, Ohgaki and Kleihues, 2005; Riemenschneider et al., 2010).

A predisposição genética para os tumores do sistema nervoso parece ser relativamente incomum, embora alguns tipos possam ser herdados.. Mutações na linhagem germinativa de genes supressores de tumor que caracterizam importantes síndromes genéticas apresentam um aumento da incidência de desenvolvimento de tumores cerebrais, como por exemplo, neurofibromatose tipo 1 (mutação em NF1), síndrome de Turcot (mutação em APC), síndrome de Gorlin (mutação em PTCH) e síndrome de Li-Fraumeni (mutação em P53 ou CHEK2) (Buckner et al., 2007).

A identificação dos fatores de riscos para os tumores de sistema nervoso é um processo complicado, devido à radiação ionizante, assim como a dieta, traumas na cabeça, consumo alcoólico materno, cigarro, exposição a agentes químicos, infecção por vírus, uso de drogas e outros medicamentos (Prados et al., 1998).

Uma das classificações mais aceitas é a da Organização Mundial de saúde (Kleihues et al., 2002), baseada na premissa de que cada tipo de tumor se origina de um tipo celular específico e os tumores são classificados em graus de malignidade com implicações terapêuticas e prognósticas. Através da citogenética e biologia molecular, os pesquisadores incorporaram alterações em

cromossomos e/ou em genes na classificação tumoral. A tabela 1 apresenta a classificação de 2002 da OMS e demonstra a vasta heterogeneidade dos tumores do SNC.

A classificação molecular está se mostrando muito útil, tanto para o diagnóstico, como para a orientação terapêutica e prevenção. As informações adquiridas com o auxílio da Biologia Molecular poderão ser utilizadas em novas abordagens terapêuticas, como na imunoterapia e na terapia gênica.

Tabela 1 – Proposta da OMS de classificação dos tumores que afetam o SNC (Kleihues et al., 2002).

Tumores do Tecido Neuroepitelial	
<i>Tumores Astrocitários</i>	
Astrocitoma Difuso	9400/3 ¹
Fibrilar	9420/3
Protoplasmático	9410/3
Gemistocístico	9411/3
Astrocitoma anaplásico	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Glioblastoma de células gigantes	9441/3
Gliossarcoma	9442/3
Astrocitoma pilocítico	9421/1
Xantastrocitoma pleomórfico	9424/3
Astrocitoma de células gigantes subependimário	9384/1
<i>Tumores Oligodendrogliais</i>	
Oligodendroglioma	9450/3
Oligodendroglioma anaplásico	9451/3
<i>Tumores Ependimários</i>	
Ependimoma	9391/3
Celular	9391/3
Papilar	9393/3
Tanicítico	9391/3
De células claras	9391/3
Ependimoma anaplásico	9392/3
Ependimoma mixopapilar	9394/1
Subependimoma	9383/1
<i>Gliomas Mistos</i>	
Oligoastrocitoma	9382/3
Oligoastrocitoma anaplásico	9382/3
<i>Tumores do Plexo Coróide</i>	
Papiloma do plexo coróide	9390/0
Carcinoma do plexo coróide	9390/3
<i>Tumores Neuroepiteliais de Origem Incerta</i>	
Astroblastoma	9430/3
Glioma coróide do 3º Ventrículo	9444/1
Gliomatose cerebral	9381/3

<i>Tumores Neuronais e Neuronais-Gliais Mistos</i>	
Gangliocitoma	9492/0
Gangliocitoma displásico do cerebelo (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Gangliocitoma infantil desmoplásico	9412/1
Tumor neuroepitelial disembríoplasico	9413/0
Ganglioglioma	9505/1
Ganglioglioma anaplásico	9505/3
Neurocitoma central	9506/1
Paraganglioma do filum terminale	8680/1
Liponeurocitoma cerebelar	9506/1
<i>Tumores Neuroblásticos</i>	
Neuroblastoma olfatório (Aesthesioneuroblastoma)	9522/3
Neuroepitelioma olfatório	9523/3
Neuroblastoma da glândula adrenal e do sistema do nervo simpático	9500/3
<i>Tumores Parenquimais Pineais</i>	
Pineocitoma	9361/1
Pineoblastoma	9362/3
Tumor parenquimal pineal de diferenciação intermediária	9362/3
<i>Tumores Embrionários</i>	
Meduloepitelioma	9501/3
Ependimoblastoma	9392/3
Tumores neuroectodérmicos supratentoriais primitivos (PNET)	9473
Neuroblastoma	9500/3
Ganglioneuroblastoma	9490/3
Meduloblastoma	9470/3
Meduloblastoma desmoplásico	9471/3
Meduloblastoma de Células Largas	9474/3
Medulomioblastoma	9472/3
Meduloblastoma de melanocítico	9470/3
Tumores teratóide/rabidóides atípicos	9508/3
Tumores dos Nervos Periféricos	
<i>Schwannoma</i>	
(Neurinoma, Neurilemona)	9560/0
Celular	9560/0
Plexiforme	9560/0
Melanocítico	9560/0
Neurofibroma	9540/0
Plexiforme	9550/0
<i>Perineurioma</i>	9571/0
Perineurioma Intraneural	9571/0
Perineurioma de tecido mole	9571/0
Tumores da Bainha do Nervo Periférico Malignos (MPNST)	9540/3
Epitelióide	9540/3
MPNST com diferenciação epitelial e/ou mesenquimal	9540/3
Melanocítico	9540/3
Melanocítico Psamomatoso	9540/3

Tumores das Meninges	
<i>Tumores das Células Meningoteliais</i>	
Meningioma	9530/0
Meningotelial	9531/0
Fibroso (fibroblástico)	9532/0
Transicional (misto)	9537/0
Psamomatoso	9533/0
Angiomatoso	9534/0
Microcístico	9530/0
Secretório	9530/0
Linfoplasmocitário rico	9530/0
Metaplásico	9530/0
De células claras	9538/1
Cordóide	9538/1
Atípico	9539/1
Papilar	9538/3
Rabtoide	9538/3
Meningioma Anaplásico	9530/3
<i>Tumores Não-Meningoteliais, Mesenquimais</i>	
Lipoma	8850/0
Angiolipoma	8861/0
Hibernoma	8880/0
Liposarcoma (intracranial)	8850/3
Tumor fibroso solitário	8815/0
Fibrosarcoma	8810/3
Histiocitoma fibroso maligno	8830/3
Leiomioma	8890/0
Leiomiosarcoma	8890/3
Rabdomioma	8900/0
Rabdomiossarcoma	8900/3
Condroma	9220/0
Condrossarcoma	9220/3
Osteoma	9180/0
Osteosarcoma	9180/3
Osteocondroma	9210/0
Hemangioma	9120/0
Hemangioendotelioma epitelióide	9133/1
Hemangiopericitoma	9150/1
Angiosarcoma	9120/3
Sarcoma de Kaposi	9140/3
<i>Lesões Melanocíticas Primárias</i>	
Melanocitose difusa	8728/0
Melanocitoma	8728/1
Melanoma maligno	8720/3
Melanomatose meníngea	8728/3

TUMORES DE HISTOGÊNESE INCERTA	
Hemangioblastoma	9161/1
Linfomas e Neoplasias Hematopoiéticas	
Linfomas malignos	9590/3
Plasmocitoma	9731/3
Sarcoma granulocitário	9930/3
Tumores de Células Germinativas	
Germinoma	9064/3
Carcinoma embrionário	9070/3
Tumor do saco vitelino	9071/3
Coriocarcinoma	9100/3
Teratoma	9080/1
Imaturo	9080/3
Maduro	9080/0
Teratoma com transformação maligna	9084/3
Tumores mistos de células germinativas	9085/3
TUMORES DA REGIÃO SELAR	
Craniofaringioma	9350/1
Adamantinomatoso	9351/1
Papilar	9352/1
Tumor de célula granular	9582/0
Tumores Metastáticos	

¹Código morfológico da classificação internacional de doenças para oncologia (CID-O) e nomenclatura médica sistematizada (SNOMED). Código para o comportamento: /0 para tumores benignos, /1 para tumores de baixo ou potencial maligno incerto ou para malignidade de borda, /2 para lesões *in situ*, /3 para tumores malignos.

1.3 TUMORES ASTROCÍTICOS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (Kleihues et al., 1993) os tumores astrocíticos estão divididos em: astrocitomas de baixo grau (I -II) e astrocitomas de alto grau (III – IV). Os tumores astrocíticos compreendem uma variedade de neoplasias que diferem quanto à sua localização no SNC, idade, extensão e potencial invasivo, características morfológicas, tendência para progressão e curso clínico. A formação de tumores astrocíticos é um processo complexo que ocorre pelo acúmulo de alterações gênicas que estão envolvidas na regulação da proliferação celular em vias distintas da tumorigênese (Louro et al., 2002; Riemenschneider et al., 2010).

Os astrocitomas pilocíticos (grau I) são mais comumente encontrados em crianças e, devido à sua biologia, são de bom prognóstico. Existe uma incidência aumentada de astrocitomas pilocíticos em pacientes com neurofibromatose do tipo 1, uma síndrome familiar

causada por mutações germinativas no gene NF1 (neurofibromin 1) (Listernick et al., 1999; Dubuc et al., 2010). São considerados os únicos astrocitomas benignos. Esses tumores geralmente não são agressivos e se destacam, entre os astrocitomas, pela manutenção do seu status de grau I por anos e até mesmo décadas, em contraste com os tumores astrocíticos difusos (graus II, III e IV). Contudo, embora raramente, alguns casos podem progredir para um grau de maior malignidade (Alshail et al., 1997).

Mais de 100 casos de astrocitomas pilocíticos foram analisados por citogenética e muitos outros por hibridização genômica comparativa (CGH – *comparative genomic hybridisation*) e a grande maioria dos resultados demonstrou padrões normais (Jenkins et al., 1989; Bigner et al., 1997; Zattara-Cannoni et al., 1998; Sanoudou et al., 2000). Em adultos, as alterações foram mais frequentes, mas novamente raras. Os poucos estudos de genética molecular nesses tumores demonstraram perdas alélicas de ambos os *loci* dos genes *TP53* (*tumor protein p53*) e *NF1*, nas regiões 17p e 17q, respectivamente. Em tumores esporádicos, poucas mutações no locus TP53 foram relatadas e nenhuma em NF1 (James et al., 1990; Phelan et al., 1995; Patt et al., 1996; Gutmann et al., 2000; Kluwe et al., 2001; Dubuc et al., 2010).

Os astrocitomas difusos (II) são divididos em subgrupos classificados morfológicamente. O astrocitoma fibrilar caracteriza a variante mais frequente e o astrocitoma protoplásmico a variante mais rara; o astrocitoma gemistocítico tem certa possibilidade de progredir para graus maiores. A característica principal entre todos é a presença de células apresentando atipia nuclear, sendo que as mitoses são raras e anaplasia e necrose estão ausentes (Ichimura et al., 2004). Pacientes com astrocitomas de baixo grau (grau II) têm uma sobrevida média de aproximadamente sete anos; pacientes com astrocitomas anaplásicos (grau III) têm sobrevida média de metade desse tempo (McCormack et al., 1992), enquanto que pacientes com glioblastoma têm média de 9 a 11 meses (Simpson et al., 1993). Ao contrário dos astrocitomas pilocíticos, é bem documentada a progressão dos tumores de graus II e III para tumores de malignidade maior (Chakravarti et al., 2001; Ino et al., 2001; Collins, 2004; Hartmann et al., 2004; Ichimura et al., 2004; Ohgaki, 2005; Riemenschneider et al., 2010).

Os tumores astrocíticos difusos, ao contrário dos pilocíticos, são frequentemente observados em adultos. Os astrocitomas de baixo grau (grau II) têm um pico de incidência entre os 25 e 50 anos de idade, enquanto que nos glioblastomas (grau IV), este pico é entre os 45 e 50 anos (Collins, 2004).

A principal alteração genética encontrada em tumores astrocíticos difusos é a trissomia do cromossomo 7 (Krupp et al., 2004). Mutações no gene supressor TP53 ocorrem em 60% dos astrocitomas grau II, sendo estas consideradas um evento precoce na gênese desses tumores. Os astrocitomas difusos que não apresentam esta alteração podem ter o controle do crescimento dependente de p53 alterado por algum mecanismo alternativo, como por exemplo, metilação do promotor p14^{ARF} (Huang et al., 2000; Scheie et al., 2006)

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) surgem devido a uma progressão dos astrocitomas de baixo grau que possuem alterações, como mutação de TP53 em cerca de 60% dos casos e super expressão de PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor). Estes tumores possuem um maior potencial de agressividade, com suas células progredindo mais rapidamente. Isso leva a um crescimento rápido de massas tumorais e frequentemente há um aumento da pressão intracraniana e sintomas como cefaléia e vômitos, assim como deficiências motoras de um lado ou de outro do corpo e problemas com a fala (Collins, 2004; Scheie et al., 2006; Riemenschneider et al., 2010).

Os glioblastomas (grau IV) constituem o tipo de neoplasia mais frequente e maligno do grupo de tumores cerebrais. São tumores histologicamente heterogêneos, representando um contínuo biológico com vários graus de polimorfismos celular e nuclear, atividade mitótica e proliferação vascular (Schmitt, 1983; Wesseling et al., 1994; Korshunov et al., 2005; Liu et al., 2010). Apresentam regiões de necrose, hemorragias e proliferação microvascular. Em termos genéticos, apresentam várias deleções, amplificações e mutações de ponto (Ohgaki, 2005; Rick et al., 2005; Custódio et al., 2010).

Existem duas formas de glioblastomas que estão divididos quanto a entidades clínicas e moleculares distintas: glioblastomas primários ou *de novo*, que ocorrem em pacientes idosos e são clinicamente muito agressivos, e os glioblastomas secundários, que se desenvolvem a partir de astrocitomas de baixo grau pré-existent e apresentam um curso clínico mais prolongado (Wesseling et al., 1994; Ohgaki, 2005; Riemenschneider et al., 2010).

Muitas vias estão envolvidas na iniciação e progressão dos glioblastomas secundários, dentre elas podem ser destacadas: a perda dos genes NF1 e TP53, e a ativação de vias de transdução de sinal, como a do gene PDGF (platelet-derived growth factor) e do seu receptor PDGFR (PDGF receptor). Estas vias estão envolvidas na iniciação dos tumores de baixo grau (astrocitomas pilocíticos e de baixo grau), que podem progredir para tumores de alto grau (astrocitomas anaplásicos e glioblastomas secundários). Tal progressão está associada com o descontrole da via do gene RB1 (retinoblastoma 1) em decorrência da perda do gene RB1 ou

amplificação/super expressão do gene CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) (Zhu e Parada, 2002; Reifemberger e Collins, 2004; Riemenschneider et al., 2010).

Nos glioblastomas primários, as mesmas vias genéticas são interrompidas, porém por mecanismos diferentes; por exemplo, o descontrole da via do gene TP53 geralmente ocorre por perda do gene ARF4 (ADP-ribosylation factor 4) ou, menos frequentemente, pela amplificação do gene MDM2 (transformed 3T3 cell double minute 2). Já o descontrole da via RB1 ocorre por perda do gene CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). Nos glioblastomas primários, a amplificação e/ou mutação do gene EGFR (epidermal growth factor receptor) e a perda do gene PTEN (phosphatase and tensin homolog) são os defeitos genéticos mais frequentemente detectados (Zhu e Parada, 2002; Ohgaki, 2005; Riemenschneider et al., 2010).

1.4 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)

Um polimorfismo refere-se à variação em um gene, cromossomo ou proteína, resultando na existência de uma ou mais formas, cada uma das quais tem a frequência maior que a que poderia ser mantida apenas por mutação recorrente (Young, 2007).

Um polimorfismo de base única (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) é geralmente definido como uma substituição estável de apenas uma base na molécula de DNA, com frequência maior que 1%, em pelo menos uma população (Taylor et al., 2001; Iarmacovai et al., 2008). Em estudos de genética humana, os SNPs são simplesmente referidos como marcadores bi-alélicos, uma vez que os tipos tri- e tetra-alélicos são muito raros (Brookes, 1999).

Com o projeto genoma humano concluído, um grande número de segmentos do genoma está disponível. Este fato poderá levar à identificação de todas as possíveis variações gênicas nas diferentes populações humanas, associar sua presença com fenótipos individuais, incluindo susceptibilidade a doenças e ainda determinar o impacto funcional dessas variações. A fonte mais abundante de variações no genoma humano são os polimorfismos de base única (SNP – Single Nucleotide Polymorphisms) (Suh e Vij, 2005; Osawa et al., 2009).

Os polimorfismos genéticos geralmente são encontrados em genes com baixa expressão fenotípica, com capacidade para modular a interação entre os fatores exógenos ou endógenos com alvos celulares específicos. Os alelos mais comuns determinam apenas pequenas alterações nas atividades das enzimas, portanto o risco de desenvolvimento de tumores é pequeno. Mas, quando estes polimorfismos são encontrados com certa frequência,

podem ser responsáveis por uma parcela significativa dos casos de neoplasias (Zijno et al., 2006).

Aproximadamente 90% dos polimorfismos de DNA são polimorfismos de nucleotídeo único e ocorrem devido a substituição de bases. Embora a maioria dos polimorfismos seja funcionalmente neutra, alguns têm efeito na expressão gênica ou na função da proteína codificada. Estes polimorfismos funcionais, apesar de sua baixa penetrância, podem contribuir nas diferenças entre os indivíduos, em relação à susceptibilidade e severidade das doenças únicas (Taylor et al., 2001, Iamarcovai et al., 2008).

Um passo essencial para entender a complexa relação entre genótipo – fenótipo é determinar como muitos polimorfismos influenciam o risco para o desenvolvimento de uma neoplasia (Iamarcovai et al., 2008).

Inicialmente, as expectativas eram de que os SNPs fossem apenas alguns milhares ao longo do genoma. Porém, nos primeiros anos do século XXI, esse número aumentou cerca de mil vezes. Em 2001, um consórcio internacional de mapeamento de SNPs descreveu 1,42 milhões de *loci* polimórficos. Mais importante que este grande número é a precisão de suas posições no genoma. Estima-se que exista aproximadamente um polimorfismo a cada 1,91 Kb. Isto significa que 90% das sequências de mais de 20 Kb apresentam pelo menos um SNP e esta densidade pode ser maior nas regiões gênicas. Dos genes conhecidos, 93% contêm SNPs e 98% estão a pelo menos 5 Kb distantes de um. Logo, quase todos os genes ou regiões gênicas são marcados por uma dessas sequências variáveis (Sachidanandam et al., 2001).

Por serem encontrados por todo o genoma, os SNPs geram alelos funcionais ou fisiologicamente relevantes, pois, em uma região codificante, podem ter impacto na proteína, em um íntron, podem influenciar no mecanismo de *splicing* e, no promotor, podem modificar a transcrição gênica (Krawczak et al., 1992).

Os SNPs são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente utilizados nos estudos de associação genética de várias doenças complexas, como por exemplo: distúrbios cardiovasculares, psiquiátricos e auto-imunes, obesidade, osteoporose, diabetes e câncer (Curran et al., 2001; Miller e Kwok, 2001; Lin et al., 2003; Tamura et al., 2003; Yamada et al., 2003; Hirai et al., 2005). Em seres humanos, várias análises de SNPs também têm sido conduzidas ao longo do genoma, na intenção de determinar os padrões dos haplótipos nas populações (Daly et al., 2001; Jeffreys et al., 2001; Patil et al., 2001; Reich et al., 2001; Gabriel et al., 2002). Os dados destas análises são de extrema utilidade para o estudo das bases genéticas das doenças complexas comuns (Phillips et al., 2003).

As variações na sequência genômica contribuem para a diversidade fenotípica e apontam suscetibilidade a, ou contra, qualquer tipo de doença. Deste modo, estima-se que os riscos da maioria das doenças complexas podem ser fortemente influenciados pelos padrões de SNPs em certos genes chave de suscetibilidade, ainda a serem identificados. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para variações inter-individuais de ordem genética na resposta a medicamentos, um campo de grande interesse da indústria farmacêutica. O benefício de se ter um mapa de SNPs é que este possibilita a cobertura de todo o genoma; assim, os pesquisadores podem comparar os padrões e frequências dos polimorfismos de seus pacientes e, desta forma, associá-los à doença em questão (Brookes, 1999; Lander et al., 2001).

Polimorfismos presentes em genes de reparo do DNA podem influenciar na capacidade de reparar danos, os quais podem estar associados com o risco de desenvolvimento de tumores (Wang et al., 2009, Jelonek et al., 2010).

1.5 GENE EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)

A atividade proliferativa das células cancerosas pode ser mantida através de importantes mecanismos, inclusive por descontroles autócrinos, que fazem com que as células apresentem um declínio da necessidade de fatores de crescimento exógenos. Essa independência é devida à capacidade da própria célula cancerosa de produzir altos níveis dos fatores de crescimento dos quais necessita, e essa habilidade depende da ativação de proto-oncogenes. Assim, o envolvimento dos fatores de crescimento na sobrevivência das células cancerosas e na indução da proliferação tumoral através da neoangiogênese e perda de capacidade apoptótica contribui para a progressão de diversos tipos tumorais (Araújo et al, 2007; Wang et al., 2010).

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um membro da superfamília EGF de fatores de crescimento, que também inclui TGF α , epiregulinas, betacelulinas e anfiregulinas. O EGF, como todos os fatores de crescimento, está relacionado à síntese de DNA, proliferação celular e estímulos mitogênicos em tecidos epidermais. EGF pode induzir a expressão de ciclina D, uma proteína necessária para a progressão do ciclo celular, da fase G1 para S. EGF também atua como um fator de sobrevivência para a inibição apoptótica e, conseqüentemente, promoção de crescimento tumoral, e ainda, juntamente à TGF α , atua como fator de estímulo angiogênico (Harari et al, 2007; Kovar et al., 2009).

O gene EGF está localizado no cromossomo 4, na região 4q25-27 e é codificado por um RNAm de 4.8Kb transcrito de um de 110Kb contendo 24 éxons (Laurence et al., 1990; Araújo et al., 2007; Wang et al., 2010). É proposto que a interação de EGF e EGFR pode ser

um fator de suscetibilidade e prognóstico em vários tumores, como melanoma, glioblastoma multiforme e câncer gástrico (Moulder et al, 2001; Araújo et al., 2007, Kovar et al., 2009; Wang et al., 2010).

Como um sinal mitogênico, EGF pode ativar a síntese de DNA e a proliferação celular. Desta forma, a hiperexpressão de EGF pode aumentar os níveis de diferenciação e proliferação, inibir apoptose e acentuar a capacidade de invasão de células cancerosas em muitos tipos de tumores, incluindo tumores do sistema nervoso. O gene EGF contém um domínio TATA Box atípico com sítios de ligação para muitos fatores de transcrição, como NK-KB, GAS, AP-1, Sp1 e C/EBP. Foi sugerido que tanto a expressão de EGF quanto a divisão celular são reguladas pelo promotor de EGF. Sendo assim, variações genéticas comuns na região promotora de EGF podem contribuir para diferenças na expressão de EGF e consequentemente para a susceptibilidade a doenças (Wang et al.; 2008; Kovar et al., 2009; Wang et al., 2010).

Shahbazi et al (2002) identificaram um SNP na região 5'UTR, localizado a 61 pares de base *downstream* à região promotora do gene EGF; a substituição de uma guanina (G) por adenina (A) parece aumentar a produção de EGF em diversos cânceres. Pacientes com o alelo G ou o genótipo G/G tiveram um relativo aumento de risco de melanoma, comparado ao da população normal. Em glioblastoma e câncer gástrico, também foi observado que o alelo G é um fator de risco para a carcinogênese (Kang et al, 2007; Wang et al., 2010).

A proteína EGF está envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo processos de crescimento do sistema nervoso central, diferenciação e manutenção. Lazar e Blum (1992) mostraram que no cérebro de roedores, a produção de EGF começa no início do desenvolvimento embrionário e que após o nascimento, a expressão de EGF está amplamente distribuída pelo cérebro, incluindo tronco cerebral, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e tálamo. A proteína EGF é responsável por estimular a proliferação de células ectodérmicas e mesodérmicas, além de regular o desenvolvimento dos neurônios (Puttonen et al., 2008).

O polimorfismo EGF+61G/A está associado com o aumento da expressão de EGF em glioblastomas. Este polimorfismo pode estar associado à progressão tumoral dos glioblastomas, levando ao grau mais agressivo da doença (Araújo et al., 2007; Wang et al., 2010).

O mecanismo pelo qual ocorre um aumento da expressão de EGF associado à presença do polimorfismo da região 5'UTR ainda é desconhecido, mas uma hipótese plausível seria a de que o locus 61G está próximo à região envolvida na regulação do gene EGF (Bhowmick et al, 2004; Araújo et al., 2007).

1.6 GENE GSTP1 (GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1)

As glutationas S-transferases (GSTs) constituem uma superfamília de ubiquitinas, que são enzimas multifuncionais envolvidas na desintoxicação celular de um grande número de agentes químicos endógenos e exógenos que apresentam grupos eletrofílicos funcionais. O processo é realizado através da conjugação das enzimas com um tripeptídeo glutationa. Essa reação neutraliza os sítios eletrofílicos das toxinas, tornando seu produto mais solúvel em água. Adicionalmente, essas enzimas atuam para proteger o DNA contra os danos sofridos por agentes mutagênicos (Ryberg et al., 1997; Lu et al., 2010).

A família GST é constituída de enzimas envolvidas na fase II do metabolismo que atuam na desintoxicação celular de produtos químicos ambientais, inativando uma variedade de compostos, incluindo pesticidas, carcinógenos ambientais e algumas drogas quimioterápicas (Harries et al., 1997; Syamala et al., 2007; Wan et al., 2007; Hiyama et al., 2008; Lu et al., 2010).

Os quatro membros da família GST foram identificados em humanos como: (GSTA), (GSTM), (GSTP) e (GSTT), sendo que modificações alélicas nesses genes podem levar à susceptibilidade ao câncer (Ezer et al., 2002; Roos et al., 2003; Lu et al., 2010).

Pessoas que possuem deficiências nos genes da família GST ou que produzem enzimas deficientes podem apresentar um aumento para o risco de desenvolver algum tipo de tumor. A presença de polimorfismos em GSTM1, GSTT1 e GSTP1 estão associados com a redução da atividade enzimática sobre diversos substratos, incluindo todos os encontrados no tabaco (Singh et al., 2008).

Alterações na superfamília GST estão relacionadas com o desenvolvimento de doenças e formação de tumores. O gene GSTP1 é um forte candidato a estar envolvido nessas alterações. A presença de um polimorfismo no éxon 5 desse gene leva à formação de vários tumores na população (Hiyama et al., 2008).

Os mecanismos de regulação gênica de GSTP-1 estão sendo extensivamente estudados, particularmente polimorfismos e o perfil de metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora do gene (Moyer et al., 2008).

O gene GSTP1 está localizado no cromossomo 11 na região 11q13 e possui nove éxons (White et al. 2008). Este gene possui cerca de 90% da atividade enzimática da família GST. A função dessa enzima pode ser alterada pela presença de um polimorfismo Ile105Val. Esse polimorfismo se localiza no éxon 5 do gene (rs947894) (McLeish et al., 2007; Gao et al., 2009). O fragmento desse polimorfismo possui 180pb; a enzima que reconhece o sítio de

restrição GTCTCN/NNNN é a BsmAI. Quando o alelo presente no indivíduo for A, a enzima não é clivada e o fragmento será de 180pb, mas se o alelo presente for G, a enzima é clivada, formando fragmentos de 115pb e 65pb.

A substituição Val105 resulta numa alteração da enzima e, como consequência, essa variante só consegue se ligar a substratos menos volumosos do que a variante Ile105 e dessa forma, sua especificidade envolve substratos diferentes daqueles relacionados à proteína selvagem. Outra diferença entre as variantes do polimorfismo é a estabilidade térmica. Essas características podem, em parte, ser responsáveis pela associação observada entre as variantes e o processo de carcinogênese e pelas diferenças na resposta a drogas anti-neoplásicas (Moyer et al., 2008).

Diversos estudos examinaram a relação desse polimorfismo com a formação de vários tipos de tumores como pulmão, cabeça e pescoço, testículo e mama (Ezer et al., 2002). A presença desse polimorfismo está envolvida na redução da atividade de GSTP1 em 78% das crianças portadoras de asma em Taiwan (Kabesch et al., 2004). Em outro trabalho realizado por Millikan et al., 2000, foi relatado que a presença desse polimorfismo em famílias leva à predisposição para a formação de tumores na mama.

Ezer et al., 2002 realizaram um estudo em tumores de cérebro e concluíram que a presença do polimorfismo Ile105Val pode levar ao desenvolvimento de astrocitomas pediátricos e à evolução destes para graus malignos.

Singh et al., 2008, analisando indivíduos portadores de tumores de cabeça e pescoço e uma população controle, sugeriram que o polimorfismo Ile105Val poderia levar ao desenvolvimento de tumores.

Roos et al., 2003 estudaram amostras de gliomas, meningiomas e neuromas e concluíram que a presença do polimorfismo Ile105Val está associada com o risco de pacientes portadores deste desenvolverem gliomas.

Okeu et al., 2004 analisaram o polimorfismo Ile105Val em 278 pacientes com gliomas malignos e também perceberam que a presença deste pode levar ao desenvolvimento dos tumores.

1.7 GENES XRCC (X-RAY CROSS COMPLEMENTING GROUP)

Os genes XRCC (X-ray cross complementing group) foram descobertos principalmente por sua função de atuarem na proteção das células de mamíferos contra danos causados por radiações ionizantes. Estudos determinam que esses genes são importantes na estabilidade genética do DNA. A perda de alguns desses genes não necessariamente confere

altos níveis de sensibilidade à radiação, mas eles são importantes componentes das vias de reparo do DNA (Thacker et al., 2004; Sterpone et al., 2010).

Os tumores humanos podem se desenvolver através de danos no DNA causados por raios ultra violeta, radiações ionizantes e por agentes químicos ambientais; esses danos levam a diversas disfunções celulares. Os genes de reparo possuem um papel importante na manutenção da estabilidade genômica através de diferentes trajetórias que são mediadas por excisão de bases (Sreeja et al., 2007). O sistema de reparo do DNA é crucialmente importante para a vida celular (Kawabata et al., 2005). Para garantir a integridade do genoma, um complexo sistema de reparo do DNA foi desenvolvido. O reparo por excisão de base é o primeiro mecanismo de defesa da célula contra danos no DNA e um evento importante para impedir mutagênese (Hu et al., 2005).

Danos no DNA têm um importante papel na mutagênese e carcinogêneses. Vários eventos químicos conduzem a danos no DNA como hidrólise, exposição a espécies reativas de oxigênio e outros reativos metabólicos. Esses eventos resultam em processos metabólicos endógenos, que são desencadeados por exposição a exógenos químicos. Esta combinação provavelmente possui um importante papel no desenvolvimento de muitos casos de cânceres. A modificação do DNA por oxidação está presente em muitos tecidos, incluindo tecidos tumorais (De Bont et al., 2004; Ladiges, 2006; Sterpone et al., 2010). O estresse oxidativo ocorre quando o nível de espécies reativas de oxigênio excede o nível natural dentro do corpo, causando danos macromoleculares, como no DNA (Ladiges, 2006). O produto do gene XRCC1 serve como um suporte para que proteínas específicas atuem juntas e reparem danos no DNA (Ladiges, 2006; Li et al., 2009; Wang et al., 2010).

O reparo de quebras de fita simples, induzidas por uma variedade de fatores externos e internos, incluindo as radiações ionizantes, os agentes alquilantes e as espécies reativas de oxigênio, acontece por meio do processo de reparo de excisão de bases, que depende da função da proteína de reparo do DNA XRCC1, devido à sua capacidade para interagir com as enzimas DNA polimerase beta, DNA ligase III, APE1 (apurinic endonuclease 1), PNK (polynucleotide kinase) e poli ADP-ribose polimerase [PARP – poly(ADP-ribose) polymerase] (Andreassi et al., 2009; Sterpone et al., 2010). Não foi descrita qualquer atividade enzimática para a proteína XRCC1; entretanto, ela interage com componentes enzimáticos de cada estágio do reparo de quebra da fita simples do DNA (Caldecott, 2003). Caso haja falha em algum estágio desse mecanismo de defesa, a célula fica inviável (Loizidou et al., 2008; Sterpone et al., 2010).

O gene XRCC1 localiza-se no cromossomo 19 na região 19q13.2; possui 17 éxons com aproximadamente 31.9 kb, codificando uma proteína de 633 aminoácidos. Cerca de 300 polimorfismos (SNPs) são encontrados no XRCC1 e estão listados no banco de dados dbSNP, dos quais aproximadamente 35 variantes estão localizadas em éxons ou na região promotora do gene (Wang et al., 2008; Wang et al., 2010; Sterpone et al., 2010).

Polimorfismos em genes de reparo do DNA podem estar associados com diferenças no reparo eficiente de danos no DNA e podem influenciar no risco para o desenvolvimento de tumores. Isto pode resultar em sutis alterações na estrutura das proteínas dos genes e alterar suas funções (Sreeja et al., 2007; Sterpone et al., 2010).

Vários polimorfismos são descritos no gene XRCC1 que estão envolvidos na formação de vários tipos de tumores. Foram descritos polimorfismos no éxon 6, éxon 7, éxon 9, éxon 10 e éxon 17. O polimorfismo mais frequente na população se localiza no éxon 10, seguido pelo polimorfismo do éxon 6 e após pelo éxon 9 (Ladiges, 2006; Andreassi et al., 2009; Sterpone et al., 2010).

Goode et al. (2002) demonstraram, em uma revisão, que o polimorfismo do éxon 6 Arg194Trp (rs1799782) C/T está relacionado com a redução de riscos para desenvolvimento de tumores. Um estudo realizado na Rússia com 2000 casos também associou a presença do polimorfismo com a redução para o risco de câncer de pulmão. Esses resultados são surpreendentes, tendo em vista que a presença de um polimorfismo, ou seja, a troca de um aminoácido, poderia ser deletério para a função do gene e consequentemente para o aumento do risco de desenvolver tumores (Ladiges, 2006).

No trabalho realizado por Moullan et al., 2003, os autores revelaram que a presença desse polimorfismo no éxon 6 pode estar associado ao aumento de tumores de mama. Tae et al., 2004 realizaram um estudo com pacientes com tumores de cabeça e pescoço e perceberam que a presença do polimorfismo estava relacionada com o aumento para o risco de tumores. Já Wang et al., 2008, demonstraram que a presença do polimorfismo não está relacionada com o risco de desenvolvimento de tumores de bexiga.

Essa variação de dados do polimorfismo Arg194Trp em estar ou não envolvido na formação de tumores pode estar relacionada com o tipo de tecido a ser estudado. O fragmento do polimorfismo Arg194Trp possui 160pb; a enzima de restrição que reconhece o sítio de restrição CCGG é MspI. Quando o alelo encontrado for T a enzima não é clivada e o fragmento será de 160pb, mas se o alelo for C a enzima cliva formando fragmentos de 60pb e 100pb.

Outro polimorfismo presente no gene XRCC1 é o Pro206Pro, localizado no éxon 7 (rs91592). Nesse polimorfismo ocorre a substituição do alelo selvagem A pelo alelo mutante G (Yin et al., 2007). O fragmento do polimorfismo Po206Pro possui 311pb, a enzima de restrição que reconhece o sítio GGC é Msp1. Quando o alelo encontrado for A, a enzima não cliva e o fragmento será de 311pb, mas se o alelo for G, a enzima cliva formando fragmentos de 191pb e 122 pb.

Yin et al., 2007 analisaram na população chinesa as frequências alélicas deste polimorfismo. O alelo A estava presente em 90% dos casos, enquanto apenas 10% apresentavam o alelo G. Foram analisadas 291 amostras de sangue, sendo que 232 possuíam o genótipo AA, 43 amostras o genótipo AG e nenhuma amostra apresentou o genótipo GG.

Em populações caucasianas esses dados são diferentes, indicando que existem diferenças significativas entre as diferentes populações. O polimorfismo 206Pro206 está localizado em uma região altamente conservada contendo um domínio funcional altamente importante (Yin et al., 2007).

O polimorfismo do éxon 9 Arg280His (rs25489) G/A é menos estudado que os polimorfismos do éxon 6 e éxon 10, devido à sua baixa frequência na população (Ladiges, 2006; Sterpone et al., 2010).

Hu et al., 2005 mostraram que existe um significativo aumento para o risco de desenvolvimento de tumores em pacientes que portam o alelo da histidina quando comparados com indivíduos com o genótipo arginina/arginina. Em contraste, Hung et al., 2005 relataram uma redução para o risco de câncer de pulmão entre indivíduos portadores do genótipo histidina, quando comparados com indivíduos fumantes portadores do genótipo arginina. O pequeno número de estudos limita quaisquer possíveis conclusões que sugerem a associação, dependendo de interações ambientais (Ladiges, 2006).

O estudo realizado por Takanami et al, 2005 mostrou que o polimorfismo Arg280His presente numa linhagem celular CHO exposta a MMS (compostos químicos alquilantes) que geram quebras únicas na fita de DNA, não teve sua ação bloqueada pela função do gene XRCC1. MMS requer XRCC1 para o eficiente reparo dos danos causados no DNA. Os resultados obtidos por Takanami et al, 2005 sugerem que a função de XRCC1 pode ser comprometida pela presença do alelo histidina no polimorfismo Arg280Trp. O fragmento do polimorfismo Arg280His possui 170pb; a enzima de restrição que reconhece o sítio de restrição GTAC é Rsa I. Quando o alelo encontrado for A, a enzima não cliva e o fragmento será de 170pb, mas se o alelo for G a enzima cliva formando fragmentos de 30pb e 140pb.

O polimorfismo Arg399Gln (rs25787), localizado no éxon 10, é o mais estudado entre todos os polimorfismos de genes de reparo. Em uma revisão realizada por Goode et al, 2002, foi mostrada a atuação deste polimorfismo em diferentes tipos de cânceres.

Parece que o polimorfismo não exerce nenhuma função em tumores de bexiga, pele e esôfago, mas em relação a tumores de pulmão, estômago e sistema nervoso a presença do polimorfismo pode estar envolvida com sua formação.

Um estudo realizado por Hung et al, 2005 na Europa mostrou que o polimorfismo não está envolvido com o risco de formação de tumores de pulmão naquela população. Essa variação de resultados não permite concluir evidências da associação do polimorfismo com formação de tumores (Ladiges, 2006).

Au et al, 2003, em um trabalho de citogenética, irradiaram, com raios ultravioleta, células de indivíduos portadores do polimorfismo Arg399Gln, resultando em um aumento de deleções cromossômicas. Essas deleções cromossômicas resultam da deficiência de reparo do DNA, facilitando a instabilidade genética e o aumento de mutações e de risco para desenvolvimento de tumores.

O fragmento do polimorfismo Arg399Gln possui 180pb; a enzima de restrição que reconhece o sítio de restrição CCGG é a MspI. Quando o alelo encontrado for A, a enzima não cliva e o fragmento será de 180pb, mas se o alelo for G, a enzima cliva formando fragmentos de 55pb e 125pb.

Outro polimorfismo encontrado no gene XRCC1 é o polimorfismo localizado no éxon 17 Gln632Gln (rs3547) G/A; é um polimorfismo pouco estudado. O fragmento desse polimorfismo possui 255pb; a enzima que reconhece o sítio de restrição GGCC é Hae III. Quando o alelo presente no indivíduo for A, a enzima não cliva e o fragmento será de 255pb, mas se o alelo presente for G, a enzima cliva formando fragmentos de 100pb e 155pb.

Yin et al, 2007 realizaram um estudo na população chinesa entre indivíduos que possuíam algum tipo de doença ou tumor e analisaram a frequência do polimorfismo Gln632Gln. Eles concluíram que a presença do polimorfismo está relacionada com algum tipo de alteração para o indivíduo que a possui.

Os polimorfismos encontrados no gene XRCC1 são de extrema importância, tendo em vista que esse gene é indispensável para o reparo de danos no DNA, pois sua proteína serve como um suporte para outras e para, juntas, conservarem a integridade da molécula (Sterpone et al., 2010).

Os genes XRCC2 (X-ray cross complementing group 2) e XRCC3 (X-ray cross complementing group 3) possuem a função de reparar danos causados na recombinação entre cromossomos homólogos (Loizidou et al., 2008; Andreassi et al., 2009).

O reparo de recombinação entre homólogos é um mecanismo que corrige diversos danos no DNA. O grande número de sequências repetidas pode potencialmente levar a um elevado número de interações indesejáveis entre os cromossomos. O reparo de recombinação entre os homólogos desempenha um importante papel na manutenção da integridade do genoma. Embora se saiba que as quebras de cadeias duplas são as principais indutoras de aberrações cromossômicas, os mecanismos pelos quais essas se formam estão ainda por serem resolvidos (Griffin e Thacker, 2004).

XRCC2 e XRCC3 realizam esses reparos mediados por RAD51, uma família de proteínas que desenvolve papel central na recombinação dos homólogos. RAD51 é um gene ortólogo de RecA que está presente em bactérias (Kawabata et al., 2005).

Os genes XRCC2 e XRCC3 possuem de 20% a 30% de sequências de aminoácidos idênticos ao gene RAD51; este, por sua vez interage com muitas proteínas, incluindo a proteína de XRCC2 e XRCC3. Esses genes estão envolvidos no processamento de junção das cromátides em uma etapa final de recombinação entre os homólogos. A proteína RAD51 é a molécula central da maquinaria para a recombinação entre os homólogos e outras proteínas como XRCC2 e XRCC3 são essenciais para o desenvolvimento e proliferação celular (Kawabata et al., 2005).

Deficiências nas proteínas de XRCC2 e XRCC3 levam a um aumento de erros na segregação dos cromossomos, devido a defeitos nos centrômeros, resultando em aneuploidias e outras aberrações cromossômicas, como pequenos aumentos nos telômeros (Thacker, 2005).

Os genes XRCC2 e XRCC3 são componentes importantes para a maquinaria de reparo de recombinação entre homólogos. Alterações nessa maquinaria devidas à presença de polimorfismos levam a danos que conseqüentemente podem levar ao desenvolvimento de tumores (Jiao et al., 2008).

O gene XRCC2 é um componente central que forma heterodímeros com a proteína RAD51. Altos níveis de aneuploidias e rearranjos cromossômicos foram observados em células com deficiências na proteína XRCC2 (Jiao et al., 2008).

XRCC2 está localizado no cromossomo 7 na região 7q36.1. Um raro polimorfismo está localizado na posição do nucleotídeo 31479 no éxon 3 Arg188His (rs3218536). Neste polimorfismo ocorre substituição do alelo selvagem G pelo alelo mutante A (Jiao et al., 2008).

O fragmento desse polimorfismo possui 278pb, a enzima que reconhece o sítio de restrição GT é a SexAI. Quando o alelo presente for G, a enzima não cliva e o fragmento terá 278pb, mas se o alelo for A, a enzima cliva formando dois fragmentos, um com 192pb e outro com 84pb.

O gene “X-Ray Repair Cross Complementing 3” (XRCC3) está mapeado em 14q32.3 (Tebbs et al., 1995; Manuguerra et al., 2006) e codifica a proteína XRCC3, que desempenha um importante papel na recombinação de homólogos, interagindo com RAD-51, mantendo a estabilidade cromossômica e reparando o dano no DNA (Karran, 2000; Wilding et al., 2005., Andreassi et al., 2009).

A proteína XRCC3 parece atuar na fase inicial da recombinação homóloga, na qual procura por homologia na molécula não danificada e invade a cadeia para a síntese de DNA (Bishop et al., 1998), podendo participar também dos últimos eventos de recombinação, auxiliando a estabilização do complexo de nucleoproteínas e a formação de DNA heteroduplex (Brenneman et al., 2000; Manuguerra et al., 2006).

O polimorfismo XRCC3 Thr241Met (rs861539), localizado no éxon 7, caracteriza-se pela substituição de timina (T) por citosina (C) no códon 241, levando à troca do aminoácido treonina (Thr) por metionina (Met), podendo afetar a função da enzima e/ou sua interação com outras proteínas envolvidas no reparo de danos no DNA (Matullo et al., 2001; Jiao et al., 2008; Andreassi et al., 2009). Alguns estudos têm relacionado esta variante com alguns tipos de câncer, como o de mama (Smith et al., 2003), de pulmão (Jacobsen et al., 2004) e o melanoma de pele (Winsey et al., 2000).

O fragmento desse polimorfismo possui 235pb, a enzima que reconhece o sítio de restrição CATG é a Nla III. Quando o alelo presente for C, a enzima não cliva e o fragmento terá 235pb, mas se o alelo for T, a enzima cliva formando dois fragmentos, um com 125pb e outro com 110pb.

Embora pertencentes à mesma família, os genes XRCC são integrantes de diferentes mecanismos de reparo do DNA e suas proteínas não tem similaridade nas funções bioquímicas (Cornetta et al., 2006).

O reparo por ligação das extremidades não-homólogas (NHEJ) é a via mais utilizada pelas células de mamíferos. Nesse mecanismo, as duas extremidades de uma molécula de DNA, apesar de perderem alguns nucleotídeos, são justapostas para recombinar. Um complexo enzimático realiza o processo de ligação entre as duas extremidades, porém a sequência original de DNA pode ser alterada, podendo ocasionar pequenas deleções durante o processo (Alberts, 2002; Zaha, 2003; Sankaranarayanan, 2006).

Embora várias proteínas participem do reconhecimento e na resposta à quebra na fita dupla do DNA, seis dessas proteínas estão diretamente envolvidas no reparo. Três delas são componentes da proteína quinase dependente do DNA (DNA-PK) que inclui Ku70 e Ku80 ou Ku86, que juntos formam um complexo que se liga na extremidade do DNA e à subunidade catalítica DNA-PKcs. Outras três proteínas, a ligase IV do DNA e XRCC4 funcionam como um complexo para ligar as extremidades do DNA que, em combinação com DNA-PKcs, age como uma endonuclease (Taylor e Lehmann, 1998; Xia et al., 2001; Sankaranarayanan, 2006; Mahaney et al., 2009).

Em mamíferos, defeitos nas subunidades Ku ou na DNA-PKcs resultam numa alta sensibilidade à radiação, o que sugere que todo o complexo participa deste processo (Taylor e Lehmann, 1998; Xia et al., 2001; Sankaranarayanan, 2006).

O gene XRCC4 (X-ray cross complementing group 4) está localizado no cromossomo 5 na região 5q14.2. Sua proteína desenvolve um importante papel no reparo de quebras de cadeia dupla do DNA nas extremidades de cromossomos não homólogos (Hsieh et al., 2008; Yano et al., 2009).

A proteína de XRCC4 interage diretamente com Ku70/Ku80, sendo que a hipótese é que ela serve como um suporte para ligar Ku70/Ku80 com a proteína DNA ligase 4 (Wu et al., 2008). Esses fatores Ku/70, Ku/80 e DNA ligase 4 estão todos envolvidos no reparo de quebras de cadeia dupla do DNA e qualquer alteração leva a falhas no mecanismo de reparo (Wu et al., 2008).

Embora XRCC4 seja fundamental no reparo do DNA, existem na literatura poucos estudos sobre o genoma e proteoma desse gene e sua correlação com o desenvolvimento de várias doenças (Hsieh et al., 2008).

Recentemente verificou-se que o complexo XRCC4 e DNA ligase IV podem não conseguir reparar esses danos ao DNA, devido à presença de polimorfismos em XRCC4 (Hsieh et al., 2008; Yano et al., 2009).

Polimorfismos presentes em regiões promotoras podem resultar na redução ou aumento da expressão de genes. O gene XRCC4 possui um polimorfismo na região promotora. Esse polimorfismo G1394T (rs6869366) é caracterizado pela substituição de um guanina por uma timina (Hsieh et al., 2008).

O fragmento desse polimorfismo possui 175pb, a enzima que reconhece o sítio de restrição ACN é a HpyCH4III. Quando o alelo presente for T, a enzima não cliva e o fragmento terá 175pb, mas se o alelo for G, a enzima cliva, formando dois fragmentos, um com 129pb e outro com 56pb.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por PCR-RFLP, a associação dos SNPs EGF+61, GSTP-1Ile105Val, XRCC1 Arg194Trp, Pro206Pro, Arg280His, Arg399Gln, Gln632Gln, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met e XRCC4 G1394T na suscetibilidade ao desenvolvimento de gliomas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os genótipos dos SNPs entre as populações caso e controle, na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade aos tumores.

Comparar os genótipos dos SNPs obtidos na população de pacientes com variáveis como idade, sexo, grau e subtipo tumoral, na intenção de identificar associações com essas variáveis.

Avaliar a influência da idade, sexo, grau e subtipo tumoral e os genótipos dos SNPs na taxa de sobrevida livre de óbito e de doença, na intenção de identificar fatores que possam contribuir para o prognóstico dos pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Foram estudadas 80 amostras de gliomas (astrocitomas e glioblastomas), obtidas de pacientes submetidos à cirurgia, no Departamento de Neurocirurgia da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, sem tratamento prévio (tabela 2). Após a remoção, os fragmentos tumorais foram imediatamente colocados em meio de cultura estéril (HAM-F10), contendo antibióticos e antimicóticos, e transportados para o Laboratório de Oncogenética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde foram processados.

Para a composição do grupo controle, foram recrutados 100 indivíduos residentes na cidade de Ribeirão Preto, de ambos os sexos, maiores de 18 anos e que não relataram casos de câncer na família.

As amostras tumorais foram colhidas na ocasião das cirurgias, e não exclusivamente para a pesquisa, fato que anulou qualquer desconforto desnecessário aos pacientes. Todos os pacientes ou seus responsáveis, assim como os sujeitos do grupo controle, foram devidamente informados sobre a pesquisa e ao concordarem em participar, assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização de suas amostras.

Tabela 2: Número do paciente, Sexo, Idade e Tipo de tumor dos pacientes estudados

NÚMERO DO PACIENTE	SEXO	IDADE	TIPO DE TUMOR
01	M	62	Astrocitoma Grau II
02	M	22	Astrocitoma Grau II
03	M	22	Astrocitoma Grau II
04	M	32	Astrocitoma Grau II
05	F	54	Glioblastoma
06	F	62	Glioblastoma
07	M	22	Astrocitoma Grau I
08	F	59	Astrocitoma Grau II
09	M	16	Glioblastoma
10	M	22	Astrocitoma Grau I
11	M	71	Astrocitoma Grua II
12	F	47	Glioblastoma
13	M	58	Glioblastoma
14	M	28	Astrocitoma Grau II
15	M	49	Astrocitoma Grau II
16	M	69	Glioblastoma
17	M	71	Glioblastoma
18	F	32	Astrocitoma Grau II

NÚMERO DO PACIENTE	SEXO	IDADE	TIPO DE TUMOR
19	M	42	Astrocitoma Grau III
20	M	65	Astrocitoma Grau III
21	F	46	Astrocitoma Grau I
22	F	16	Astrocitoma grau I
23	F	44	Astrocitoma Grau I
24	M	31	Glioblastoma
25	F	62	Glioblastoma
26	M	71	Glioblastoma
27	M	61	Glioblastoma
28	M	64	Glioblastoma
29	M	43	Glioblastoma
30	M	47	Glioblastoma
31	F	57	Glioblastoma
32	F	01	Astrocitoma Grau I
33	M	27	Astrocitoma Grau II
34	F	52	Astrocitoma Grau III
35	F	52	Glioblastoma
36	M	46	Astrocitoma Grau I
37	M	13	Astrocitoma Grau III
38	F	11	Glioblastoma
39	F	74	Glioblastoma
40	F	38	Glioblastoma
41	F	54	Glioblastoma
42	M	43	Astrocitoma Grau III
43	M	47	Glioblastoma
44	F	35	Glioblastoma
45	M	26	Astrocitoma Grau I
46	F	56	Astrocitoma Grau II
47	M	58	Astrocitoma Grau III
48	F	74	Astrocitoma Grau III
49	M	58	Astrocitoma Grau II
50	M	47	Glioblastoma
51	F	32	Astrocitoma Grau III
52	M	59	Astrocitoma Grau III
53	M	36	Astrocitoma Grau III
54	M	53	Glioblastoma
55	F	12	Glioblastoma
56	F	72	Glioblastoma
57	M	40	Astrocitoma Grau II
58	M	44	Astrocitoma Grau II
59	M	49	Astrocitoma Grau II
60	M	48	Glioblastoma
61	M	48	Astrocitoma Grau II
62	M	63	Glioblastoma
63	F	40	Astrocitoma Grau II
64	F	32	Astrocitoma Grau II
65	M	56	Glioblastoma
66	M	50	Glioblastoma
67	F	07	Astrocitoma Grau II
68	M	40	Astrocitoma Grau II
69	F	75	Glioblastoma
70	M	36	Astrocitoma Grau II
71	M	48	Glioblastoma

NÚMERO DO PACIENTE	SEXO	IDADE	TIPO DE TUMOR
72	M	61	Glioblastoma
73	M	57	Glioblastoma
74	M	39	Astrocitoma Grau III
75	M	54	Glioblastoma
76	M	06	Astrocitoma Grau II
77	M	22	Glioblastoma
78	M	26	Astrocitoma Grau III
79	F	58	Glioblastoma
80	M	55	Astrocitoma Grau III

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Para a extração de DNA foi utilizado aproximadamente 1 cm³ de tecido das amostras tumorais. Cada amostra foi submetida à maceração com nitrogênio líquido. Depois de pulverizada, a amostra foi transferida para um tubo de centrifuga e foram adicionados 5 mL de tampão de extração (Tris 1 M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M), 50 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 0,5 mL de SDS 20%. O tubo foi agitado por inversão até a obtenção de uma mistura completamente homogênea, que em seguida foi incubada em banho-maria a 37°C durante a noite.

No dia seguinte, foram adicionados 5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo de centrifuga. A mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para sua completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um outro tubo de centrifuga, onde foram adicionados 5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este tubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL, o volume da amostra foi medido e acrescentou-se 1/10 deste volume de acetato de amônio 7.5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado, para precipitação.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas, o DNA lavado com etanol 70%, novamente centrifugado e o etanol descartado. O DNA foi colocado para secar a 37 °C durante uma hora. Posteriormente, foram adicionados de 500 a 700 µL de água estéril ao precipitado e, após sua dissolução completa, o DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C até as análises.

A extração do DNA do sangue periférico dos controles procede-se, basicamente segundo a metodologia de Old e Higgs (1993), com algumas modificações. Foram adicionados 5 mL de sangue total em tubo de 15 mL, acrescentou-se solução salina (9 g/L de

NaCl) até 14 mL e esta mistura foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se tampão de lise de hemácias (5 mmol/L de $MgCl_2$, 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,8) até 14 mL; esta mistura também foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado e 5 mL de tampão de lise de leucócitos foram adicionados ao precipitado (0,2 mol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris-HCl, PH 7,8), além de 500 μ L de SDS a 10% e 10 μ L de proteinase K (20 mg/mL). Esta mistura foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente. No final deste período foi acrescentado 1 volume de fenol, agitou-se por 10 minutos, com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. A este tubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isopropílico (24:1), agitou - se por 10 minutos com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 2,5 vezes o volume de álcool isopropílico e a mistura foi agitada por inversão até a precipitação do DNA, que foi então transferido para um novo tubo, onde permaneceu secando por toda a noite. Passado esse período, foram adicionados de 700 a 1.000 μ L de água estéril e, após sua dissolução completa, o DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C até as análises.

3.3 DESENHO DOS *PRIMERS*

Os *primers* foram construídos a partir das sequências genômicas das regiões polimórficas, dos genes em questão, obtidas no banco de dados de SNP (dbSNP) do NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/SNP>). Para evitar a construção dos *primers* dentro de outras regiões polimórficas, foram utilizados os bancos de dados do Ensembl e do SNP500Cancer (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/>), onde foram apontados, de forma gráfica, outros SNPs que circundam os de interesse.

De posse das sequências alvo, os *primers* foram construídos com o auxílio do programa *Gene Runner* (Versão 3.05, *Hasting Software, Inc.*), de modo a flanquear os SNPs de interesse e evitar as demais bases polimórficas evidenciadas no procedimento anterior.

A Tabela 3 lista os primers construídos para os SNPs EGF+61, GSTP-1Ile105Val, XRCC1 Arg194Trp, Pro206Pro, Arg280His, Arg399Gln, Gln632Gln, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met e XRCC4 G/T.

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos SNPs EGF+61, GSTP-1Ile 105 Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met e XRCC4 G/T

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	Produto PCR (pb)
EGF	F	GAG AAA CTG TTG GGA GAG GAA	21	175
	R	GCA GGG CTG TTA AAC TCT GTG A	22	
GSTP	Ile105Val-F	CCT GCT CCC CTC CAC CCA AC	20	180
	Ile105Val-R	GCC CCT TTC TTT GTT CAG C	19	
XRCC1	ARG194TRP-F	GTG AAG GAG GAG GAT GAG AGC	21	160
	ARG194TRP-R	CCC CAG CCC CCT CTA CCC T	19	
	PRO206PRO-F	CAG GGT GGA GGA AGG TGG GC	20	311
	PRO206PRO-R	ACC CCA CCA AAG TCT GAT GA	20	
	ARG280HIS-F	TTG TCT TCT CCA GTG CCA GC	20	170
	ARG280HIS-R	ACC ACT ACC ACA CCC TGA A	19	
	ARG399GLN-F	GCG TAA GGA GTG GGT GCT GG	20	180
	ARG399GLN R	GTC TGC TGG CTC TGG GCT G	19	
	GLN632GLN F	CAA CCC CTC CCT GGC ATT CG	20	255
	GLN632GLN R	AGC ATT CTT CCC CAG CTC C	19	
XRCC2	ARG188HIS-F	ATG GAG GAG AAA GTG TGA AC	20	278
	ARG188HIS-R	TGG TTG CTG CTT TGA GAA TC	20	
XRCC3	THR241MET-F	GCT GTC TCG GGG CAT GGC TC	20	235
	THR241MET R	GCT TCC GCA TCC TGG CTA AA	20	
XRCC4	F	TAC CTC ACA AAT AAA CTA AG	20	175
	R	GAA AAC GCA AAC AAC TGG CA	20	

pb (pares de base), F (forward), R (reverse)

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As condições da PCR das regiões polimórficas de interesse, para um volume total de 25 µL, são: 50 ng de DNA, tampão 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer*, 50 µM de cada dNTP, 0,5 U de *Taq* polimerase e água Milli-Q. A PCR foi realizada de acordo com os programas listados na Tabela 4.

Tabela 4: Programas de PCR para amplificação dos SNPs TP53 Pro47Ser, Arg72Pro, WRN Cys1367Arg, EGF+61 e GSTP-1 Ile105Val.

Gene	Passos	Programa		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
EGF+61	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	55 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
GSTP Ile105Val	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	60 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
XRCC1 Arg194Trp Arg399Gln	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	60 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
XRCC1 Pro206Pro Arg280His Gln632Gln	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	58 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
XRCC2 XRCC3 XRCC4	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	56 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio, na concentração de 2%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com corrente de 150 V e os fragmentos amplificados são visualizados em transluminador com fonte de luz ultravioleta.

3.5 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após amplificação das regiões de interesse dos SNPs EGF+61, GSTP-1Ile 105 Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met e XRCC4 G/T, os produtos da reação foram submetidos ao procedimento de RFLP (restriction fragment length polymorphisms), incubados na presença das enzimas Alu I, BsmA I, Msp I, Msp I, Rsa I, Msp I, Hae III, Sex AI, Hsp 92II, HpyCH4 III (New England, BioLabs, Inc.), respectivamente, de acordo com as condições listadas nas Tabela 5 e 6.

Tabela 5 - Condições para a digestão enzimática dos produtos de PCR contendo os SNPs EGF+61, GSTP-1 Ile105Val, XRCC1 Arg194Trp, Pro206Pro e Arg280His.

	Polimorfismo				
	EGF+61	GSTP Ile105Val	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Pro206Pro	XRCC1 Arg280His
Enzima	0,2 µL de Alu I (10 U)	0,2 µL de BSMA I (10 U)	0,2 µL de Msp I (4 U)	0,2 µL de Msp I (4 U)	0,2 µL de Msp I (10 U)
Tampão	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
BSA	----	----	----	----	----
Produto PCR	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
Água	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL
Total	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Temperatura e Tempo de Incubação	37 °C por 16 horas	55 °C por 5 horas	37 °C por 4 horas	37 °C por 4 horas	37 °C por 4 horas
Temperatura e Tempo de Inativação	65 °C por 20 min	80 °C por 20 min	65 °C por 20 min.	65 °C por 20 min.	65 °C por 20 min.

Tabela 6 - Condições para a digestão enzimática dos produtos de PCR contendo os SNPs XRCC1 Arg399Gln, Gln632Gln, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met e XRCC4 G1394T

	Polimorfismo				
	XRCC1 Arg399Gln	XRCC1 Gln632Gln	XRCC2 Arg188His	XRCC3 Thr241Met	XRCC4 G1394T
Enzima	0,2 µL de Msp I (4 U)	0,2 µL de Hae III (10 U)	0,2 µL de Sex A (4 U)	0,2 µL de Hsp 92 II (1 U)	0,2 µL de HpyCh4 III (1.25 U)
Tampão	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
BSA	----	----	----	----	----
Produto PCR	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
Água	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL	10,3 µL
Total	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Temperatura e Tempo de Incubação	37 °C por 4 horas	37 °C por 1:30 horas	37 °C por 16 horas	37 °C por 16 horas	37 °C por 4 horas
Temperatura e Tempo de Inativação	65 °C por 20 min.	65 °C por 20 min.	65 °C por 20 min.	65 °C por 15 min.	80 °C por 20 min.

No polimorfismo EGF+61, a presença do alelo A61 faz com que a enzima Alu I (figura 1a) clive a sequência em dois fragmentos (70 e 105 pb) e na presença do alelo G61, a enzima não reconhece seu sítio de ligação e ocorre apenas um fragmento de 175 pb. Para analisar o polimorfismo GSTP-1, foi utilizada a enzima de restrição BsmA I (figura 1b), a qual contém um sítio de clivagem para a variante alélica Val105, clivando o genótipo homozigoto Val/Val em dois fragmentos de 115 pb e 65 pb respectivamente. O alelo selvagem Ile/Ile não é clivado e seu fragmento apresenta 180 pb. O heterozigoto Ile/Val apresenta três fragmentos (180, 115 e 65 pb). Na presença do alelo Arg do SNP XRCC1

Arg194Trp, a enzima Msp I reconhece um sítio de restrição (Figura 1c) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes para o alelo Arg194 (110 pb e 60 pb), enquanto que o alelo Trp194 permanece com 160 pb, o heterozigoto Arg/Trp apresenta três fragmentos (160 pb, 100 pb, e 60 pb). Da mesma forma, o alelo Pro206 do SNP XRCC1 Pro206Pro possui um sítio de restrição reconhecido pela enzima Msp I (Figura 1c) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes para G (191 pb e 122 pb) enquanto o alelo A permanece com 311 pb. O heterozigoto G/A gera três fragmentos (311 pb, 191 pb e 122 pb). Já no SNP, XRCC1 Arg280His é o alelo Arg280 que possui um sítio de restrição para a enzima Rsa I (Figura 1d), que após digestão enzimática produz um fragmento de 30 e 140 pb, enquanto que o alelo His280 permanece com 170 pb; o heterozigoto Arg/His gera três fragmentos (170 pb, 140 pb e 30 pb). Para analisar o polimorfismo XRCC 1 Arg399Gln, foi utilizada a enzima de restrição Msp I (figura 1c), a qual contém um sítio de clivagem para a variante alélica Gln399, clivando o genótipo homozigoto Gln/Gln em dois fragmentos de 125 pb e 55 pb respectivamente. O alelo selvagem Arg/Arg não é clivado e seu fragmento apresenta 180 pb. O heterozigoto Arg/Gln apresenta três fragmentos (180, 125 e 55 pb). Na presença do alelo G do SNP XRCC1 Gln632Gln, a enzima Hae III reconhece um sítio de restrição (Figura 1e) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes (155 pb e 100 pb), enquanto o alelo A permanece com 255 pb; o heterozigoto G/A apresenta três fragmentos (255 pb, 155 pb, e 100 pb). Para analisar o polimorfismo XRCC 2 Arg188His, foi utilizada a enzima de restrição SexAI (figura 1f), a qual contém um sítio de clivagem para o genótipo His/His (192 pb e 84 pb), enquanto o genótipo selvagem Arg188 permanece com 278 pb. O heterozigoto Arg/His apresenta três fragmentos (278pb, 192pb, 84pb). Na presença do alelo Met241 do SNP XRCC3 Thr241Met, a enzima Hsp92 II reconhece um sítio de restrição (Figura 1g) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes (125 pb e 110 pb), enquanto o alelo Thr241 permanece com 235 pb. O heterozigoto Thr/Met apresenta três fragmentos (235 pb, 125 pb, e 110 pb). Já o polimorfismo G1394T presente na região promotora de XRCC 4 possui um sítio de clivagem reconhecido pela enzima HpyCH4 III (figura 1h) gerando para o alelo G dois fragmentos (120 pb e 56 pb), enquanto o alelo T não é clivado (175 pb). Para o genótipo heterozigoto T/G são gerados três fragmentos (175 pb, 120 pb e 56 pb).

Figura 1 – Sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas Alu I (a), BsmAI (b), Msp I (c), Rsa I (d), Hae III (e), Sex AI (f), Hsp 92II (g) e HpyCH4 III (h).

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os produtos das digestões enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel de poli(acrilamida) 19:1 (acrilamida: bis-acrilamida, *Amersham Biosciences*) na concentração de 10%, sob uma corrente de 150 V em cuba vertical, juntamente com um *Ladder* de 50 pb (*Amersham Biosciences*). Após a corrida, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata (*Merck*) a 10% e fotografado.

3.7 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para o controle do processo de digestão enzimática, algumas amostras foram submetidas ao sequenciamento. Inicialmente o produto de PCR foi submetido à purificação com a utilização do kit ExoSAP-IT, utilizando-se 5µl do produto da PCR e 2µl da enzima ExoSAP. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min e a ativação da enzima se deu a 80°C durante 15 min. O produto purificado foi visualizado em gel de agarose para a confirmação de banda única. Em seguida realizou-se a reação de sequenciamento utilizando-

se o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, onde se acrescentou 1µl da amostra, 5µl do kit de sequenciamento, 1µl de *primer* e 3µl de água. O preparado foi submetido a uma reação de precipitação, onde foram utilizados 1µl de acetato de sódio (1,5M de acetato de sódio + 259mM de EDTA) e 40µl de etanol 100% gelado; o preparado foi reservado em local escuro à temperatura ambiente por 20 minutos; em seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 30 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se novamente. As amostras passaram por um processo de secagem a 60°C durante 15 minutos e foram levadas ao sequenciador.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As populações caso e controle foram testadas quando ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg, utilizando-se o programa TFGA 1.3 (Miller, 1997). Para verificar se a distribuição dos genótipos dos SNPs é semelhante entre as duas populações e se a distribuição de idade, sexo, status vital, grau e subtipo tumoral são semelhantes entre a população de pacientes foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher (F), quando necessário.

Para avaliar a influência dos genótipos dos SNPs na taxa de sobrevida dos pacientes, foram construídas curvas de Kaplan-Meier para cada uma das categorias das variáveis. A comparação para verificar se uma ou outra categoria aumenta ou não a chance de sobrevida foi realizada pelo teste de Log-Rank.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

As tabelas 7 e 8 referem-se aos pacientes avaliados neste trabalho. Foram estudados 52 homens e 28 mulheres (relação M/F de 0,65%), com idade variando entre 01 e 75 anos. Os exames histopatológicos realizados na Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos revelaram 37 Glioblastomas, 22 Astrocitomas Grau II, 8 Astrocitomas Grau III e 8 Astrocitomas Grau I. Foram avaliados 10 polimorfismos de base única (EGF, GSTP+1, XRCC1Arg194Trp, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His, XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2Arg188His, XRCC3Thr241Met, XRCC4G1394T).

Na análise do polimorfismo EGF+61 foram observados 44 pacientes homozigotos G/G e 36 pacientes heterozigotos G/A e não ocorreu nenhum homozigoto A/A. Para o polimorfismo GSTP-1 foram observados 35 pacientes homozigotos Ile/Ile, 43 pacientes heterozigotos Ile/Val e 2 pacientes homozigotos Val/Val. Em XRCC1Arg194Trp foram observados 34 pacientes homozigotos Trp/Trp, 31 pacientes heterozigotos Trp/Arg e 15 pacientes homozigotos Arg/Arg. Para o polimorfismo XRCC1Pro206Pro foram observados 35 pacientes A/A, 36 pacientes A/G e 9 pacientes G/G. Em XRCC1Arg280His foram observados 42 pacientes homozigotos Arg/Arg, 22 pacientes heterozigotos His/Arg e 16 pacientes homozigotos His/His. Para o polimorfismo XRCC1Arg399Gln foram observados 23 pacientes homozigotos Arg/Arg, 33 pacientes heterozigotos Arg/Gln e 24 pacientes homozigotos Gln/Gln. Para o polimorfismo XRCC1Gln632Gln foram observados 40 pacientes G/G, 20 pacientes A/G e 20 pacientes A/A. Em relação ao polimorfismo XRCC2Arg188His foram observados 54 pacientes homozigotos His/His, 15 pacientes heterozigotos His/Arg e 11 pacientes homozigotos Arg/Arg. Para o polimorfismo XRCC3Thr241Met foram observados 53 pacientes homozigotos Thr/Thr, 18 pacientes heterozigotos Thr/Met e 9 pacientes homozigotos Met/Met. Em relação ao polimorfismo do gene XRCC4G1394T foram observados 58 pacientes T/T, 13 pacientes T/G e 9 pacientes G/G. A figura 2 ilustra os polimorfismos analisados em gel de poliacrilamida. As figuras 2 e 3 ilustram os polimorfismos analisados em gel de poliacrilamida e as figuras 4, 5 e 6 apresentam algumas reações de seqüenciamento para os polimorfismos estudados.

As tabelas 9 e 10 descrevem os dados dos indivíduos do grupo controle incluídos no estudo. Este grupo foi composto de 63 homens e 37 mulheres (relação M/F de 1,7) com idades entre 18 e 72 anos (média de 45 anos).

Tabela 7: Análise de polimorfismo - Genes EGF+61, GSTP+1, XRCC1Arg194Trp, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His.

AMOSTRAS	EGF+61	GSTP+1	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Pro206Pro	XRCC1 Arg280His
01	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	His/His
02	G/G	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	His/His
03	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	His/His
04	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	His/His
05	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	His/His
06	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	His/His
07	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	His/His
08	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	His/His
09	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	G/G	His/His
10	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	His/His
11	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/His
12	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
13	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
14	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
15	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
16	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	G/A	Arg/His
17	G/A	Ile/Ile	Arg/Arg	G/A	Arg/Arg
18	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	G/G	Arg/Arg
19	G/G	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	Arg/His
20	G/A	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	Arg/His
21	G/A	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	Arg/Arg
22	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	G/G	Arg/His
23	G/A	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
24	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	Arg/Arg
25	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
26	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
27	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
28	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
29	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	His/His
30	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
31	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	Arg/His
32	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
33	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
34	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	G/G	Arg/Arg
35	G/A	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	Arg/His
36	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	G/G	Arg/His
37	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
38	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/His
39	G/A	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	His/His
40	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/His
41	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
42	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
43	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	G/G	Arg/Arg
44	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
45	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/His
46	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	His/His
47	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	G/G	Arg/His
48	G/A	Val/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
49	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
50	G/A	Val/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
51	G/A	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	Arg/Arg
52	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/His
53	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/His
54	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	Arg/His
55	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
56	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/His
57	G/A	Ile/Val	Trp/Trp	G/G	Arg/Arg
58	G/A	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	Arg/His
59	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
60	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
61	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg

AMOSTRAS	EGF+61	GSTP+1	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Pro206Pro	XRCC1 Arg280His
62	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	Arg/His
63	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
64	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	G/A	His/His
65	G/G	Ile/Val	Arg/Arg	G/A	Arg/Arg
66	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	G/A	Arg/Arg
67	G/G	Ile/Val	Arg/Trp	G/G	Arg/Arg
68	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	G/A	Arg/His
69	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	Arg/Arg
70	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	G/A	Arg/Arg
71	G/A	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/His
72	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	His/His
73	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	A/A	His/His
74	G/G	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/His
75	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg
76	G/A	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/His
77	G/G	Ile/Val	Trp/Trp	G/A	Arg/Arg
78	G/G	Ile/Ile	Arg/Arg	G/A	Arg/Arg
79	G/A	Ile/Val	Arg/Trp	G/A	Arg/Arg
80	G/G	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/Arg

Tabela 8: Análise de polimorfismo - Genes XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met, XRCC4 G1394T.

AMOSTRAS	XRCC1 Arg399Gln	XRCC1 Gln632Gln	XRCC2 Arg188His	XRCC3 Thr241Met	XRCC4 G1394T
01	Arg/Gln	G/G	Arg/His	Thr/Met	T/T
02	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
03	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Met	T/T
04	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
05	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Met	T/T
06	Arg/Arg	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
07	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Thr	T/T
08	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
09	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
10	Arg/Gln	G/G	Arg/His	Thr/Thr	T/T
11	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/G
12	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
13	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Met	T/T
14	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/G
15	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/G
16	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
17	Arg/Arg	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
18	Arg/Arg	G/G	His/His	Met/Met	T/T
19	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Met	T/T
20	Arg/Arg	G/G	His/His	Met/Met	T/T
21	Arg/Arg	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
22	Gln/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
23	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Thr	T/G
24	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Met	T/G
25	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Met	T/T
26	Arg/Gln	A/G	His/His	Met/Met	G/G
27	Arg/Gln	A/G	His/His	Met/Met	T/T
28	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
29	Gln/Gln	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
30	Gln/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
31	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	T/G
32	Arg/Gln	A/G	Arg/His	Thr/Thr	T/G
33	Gln/Gln	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
34	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Met	T/G
35	Gln/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
36	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
37	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
38	Gln/Gln	G/G	His/His	Met/Met	T/T
39	Gln/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
40	Gln/Gln	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
41	Arg/Arg	G/G	His/His	Thr/Met	T/T
42	Arg/Gln	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
43	Gln/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
44	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Met	T/T
45	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
46	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
47	Arg/Gln	G/G	Arg/His	Thr/Thr	G/G
48	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Thr	T/T
49	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
50	Gln/Gln	A/G	His/His	Met/Met	T/G
51	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Met	T/T
52	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Met	T/T
53	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
54	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
55	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
56	Gln/Gln	A/G	His/His	Thr/Met	T/G
57	Arg/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	G/G
58	Arg/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	T/T
59	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
60	Arg/Arg	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T

AMOSTRAS	XRCC1 Arg399Gln	XRCC1 Gln632Gln	XRCC2 Arg188His	XRCC3 Thr241Met	XRCC4 G1394T
61	Arg/Gln	G/G	His/His	Met/Met	T/T
62	Gln/Gln	A/G	His/His	Met/Met	T/T
63	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Met	T/T
64	Arg/Arg	G/G	Arg/His	Thr/Met	T/T
65	Arg/Arg	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
66	Gln/Gln	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
67	Gln/Gln	A/G	His/His	Thr/Thr	G/G
68	Arg/Arg	G/G	His/His	Thr/Thr	T/G
69	Arg/Arg	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
70	Gln/Gln	G/G	His/His	Thr/Thr	T/T
71	Arg/Arg	G/G	His/His	Thr/Met	T/T
72	Gln/Gln	A/G	His/His	Thr/Met	T/T
73	Arg/Gln	G/G	Arg/His	Thr/Met	T/T
74	Arg/Gln	A/A	Arg/His	Met/Met	T/G
75	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
76	Arg/Gln	G/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
77	Arg/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/T
78	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
79	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
80	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T

Tabela 9: Análise de polimorfismo - Genes EGF, GSTP+1, XRCC1Arg194Trp, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His no grupo controle.

AMOSTRAS	EGF+61	GSTP+1	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Pro206Pro	XRCC1 Arg280His
01	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
02	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
03	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
04	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
05	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
06	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
07	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
08	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
09	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
10	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
11	AG	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
12	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
13	GG	Ile/Val	Arg/Arg	A/G	Arg/His
14	AA	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/His
15	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
16	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
17	AA	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/His
18	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
19	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
20	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
21	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
22	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	His/His
23	AA	Ile/Ile	Trp/Trp	A/G	Arg/Arg
24	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
25	AA	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
26	AA	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
27	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
28	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
29	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
30	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	His/His
31	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
32	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
33	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
34	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
35	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/G	His/His
36	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
37	AA	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
38	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
39	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
40	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
41	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
42	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
43	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/His
44	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/His
45	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/His
46	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
47	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
48	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
49	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
50	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	His/His
51	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
52	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
53	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
54	AA	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
55	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
56	AA	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
57	AG	Ile/Val	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
58	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg

AMOSTRAS	EGF+61	GSTP+1	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Pro206Pro	XRCC1 Arg280His
59	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
60	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
61	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
62	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
63	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
64	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
65	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
66	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
67	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
68	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	His/His
69	AG	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/His
70	GG	Ile/Ile	Arg/Trp	A/A	Arg/His
71	AG	Ile/Ile	Arg/Trp	A/G	Arg/Arg
72	AA	Ile/Ile	Arg/Trp	A/G	Arg/Arg
73	AG	Ile/Val	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
74	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
75	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
76	GG	Ile/Val	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
77	AA	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
78	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
79	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
80	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
81	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
82	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg
83	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
84	AG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	His/His
85	AA	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/His
86	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
87	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
88	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
89	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
90	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/G	Arg/Arg
91	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
92	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
93	AG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
94	GG	Ile/Ile	Trp/Trp	A/A	Arg/Arg
95	AG	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
96	GG	Ile/Val	Arg/Arg	A/G	His/His
97	AG	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
98	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
99	AA	Ile/Val	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg
100	GG	Ile/Ile	Arg/Arg	A/G	Arg/His

Tabela 10: Análise de polimorfismo - Genes XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met, XRCC4 G1394T.

AMOSTRAS	XRCC1 Arg399Gln	XRCC1 Gln632Gln	XRCC2 Arg188His	XRCC3 Thr241Met	XRCC4 G1394T
01	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
02	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
03	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
04	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
05	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
06	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
07	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
08	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
09	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
10	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
11	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
12	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
13	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/G
14	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/G
15	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
16	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/G
17	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
18	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
19	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
20	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
21	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Met/Met	G/G
22	Arg/Gln	A/G	His/His	Met/Met	G/G
23	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Met	T/G
24	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Met	T/G
25	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Met	T/G
26	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
27	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	T/G
28	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
29	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
30	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
31	Arg/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/T
32	Arg/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/T
33	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
34	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
35	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Met	T/G
36	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Met	T/G
37	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
38	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
39	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Met	G/G
40	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
41	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
42	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/T
43	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
44	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
45	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
46	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
47	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
48	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
49	Arg/Arg	A/G	His/His	Thr/Thr	G/G
50	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
51	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/G
52	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
53	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Met/Met	T/T
54	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Met/Met	G/G
55	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Met/Met	T/T
56	Arg/Gln	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
57	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
58	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
59	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/T
60	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/T

AMOSTRAS	XRCC1 Arg399Gln	XRCC1 Gln632Gln	XRCC2 Arg188His	XRCC3 Thr241Met	XRCC4 G1394T
61	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
62	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
63	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
64	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
65	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
66	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
67	Gln/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	T/G
68	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
69	Arg/Arg	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
70	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
71	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
72	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
73	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
74	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
75	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
76	Arg/Gln	A/A	Arg/His	Thr/Thr	G/G
77	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
78	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
79	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
80	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
81	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
82	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
83	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T
84	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
85	Gln/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/G
86	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Met	T/G
87	Arg/Arg	A/G	Arg/Arg	Thr/Met	T/G
88	Arg/Arg	A/A	His/His	Thr/Thr	G/G
89	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
90	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
91	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Met	G/G
92	Arg/Arg	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
93	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
94	Arg/Gln	A/A	His/His	Thr/Thr	T/G
95	Arg/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
96	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
97	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
98	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	G/G
99	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/G
100	Gln/Gln	A/A	Arg/Arg	Thr/Thr	T/T

Figura 2: Análise dos polimorfismos XRCC1Pro206Pro, EGF+61, GSTP1Ile105Val, XRCC1Arg280His, XRCC1Arg399Gln e XRCC1Arg194Trp.

Figura 3: Análise dos polimorfismos XRCC1Gln632Gln, XRCC2Arg188His, XRCC3Thr241Met, XRCC4G1394T.

Figura 4: Reação de sequenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo EGF + 61; em A ocorre a presença do alelo A e em B ocorre a presença do alelo G.

Figura 5: Reação de sequenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo GSTP-1 Ile105Val; em A (fita sense) ocorre a presença do alelo A (Ile) e em B (fita antisense) ocorre a presença dos alelos C e G indicando o heterozigoto Ile/Val.

Figura 6: Reação de seqüenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo XRCC1Arg194Trp; em A ocorre a presença dos alelos C e T indicando o heterozigoto Arg/Trp e em B ocorre a presença do alelo T que representa Trp.

As frequências dos genótipos observados, tanto do grupo de pacientes quando do grupo controle, encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos EGF+61, GSTP1, XRCC1Arg194Trp, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His, XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2Arg188His, XRCC3Thr241Met e XRCC4G1394T em controles e pacientes estão apresentadas na tabela 11. Em relação ao polimorfismo EGF+61, as frequências no grupo controle de A/A, A/G e G/G foram de 23%, 44% e 33%, enquanto que nos pacientes não foram encontradas frequências para o genótipo A/A, sendo que as frequências de A/G e G/G foram 45% e 55% respectivamente ($p < 0,001$). Para o polimorfismo XRCC1Arg194Trp, as frequências de Arg/Arg, Arg/Trp e Trp/Trp para o grupo controle foram 67%, 4% e 29% respectivamente, enquanto que para os pacientes as frequências foram 18,8%, 38,8% e 42,5% ($p < 0,001$). Para o polimorfismo GSTP1 a frequência do genótipo Val/Val nos controles foi de 0%, enquanto que para os genótipos Ile/Ile e Ile/Val, as frequências foram 87% e 13%. Já entre os pacientes, as frequências para Ile/Ile, Ile/Val e Val/Val foram de 43,8%, 53,8% e 2,5% respectivamente ($p < 0,001$). As frequências alélicas da Val/Val entre pacientes e controles também apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,001$), uma vez que no grupo de paciente a frequência foi de 0,29 e entre os controles foi de 0,06.

Quando observamos os resultados obtidos para as frequências genotípicas do polimorfismo XRCC1Pro206Pro, observamos diferenças entre o grupo caso e controle ($p < 0,001$), sendo que as frequências de A/A, A/G e G/G foram de 43,8%, 45%, 11,2% entre o

grupo de pacientes e de 80% e 20% nos controles, sendo que nesses não observamos o aparecimento do genótipo G/G; sendo assim, quando analisamos as frequências alélicas da variante G/G, também observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), uma vez que, entre o grupo de pacientes a frequência foi de 0,34 e entre os controles foi de 0,1. As frequências genotípicas obtidas para o polimorfismo XRCC1Arg280His foram de 52,5% (Arg/Arg), 27,5% (Arg/His) e 20% (His/His) em pacientes e 83% (Arg/Arg), 10% (Arg/His) e 7% (His/His) em controles ($p < 0,001$).

Para o polimorfismo XRCC1Arg399Gln, as frequências genotípicas para o grupo controle foram 29% (Arg/Arg), 20% (Arg/Gln) e 51% (Gln/Gln); enquanto que para o grupo de pacientes estas frequências foram de 28,8 (Arg/Arg), 41,3% (Arg/Gln) e 30% (Gln/Gln) ($p=0,003$). A frequência alélica de Gln foi de 0,5% nos pacientes e 0,61% nos controles ($p=0,049$). Essa diferença marginal entre os dois grupos em relação à frequência alélica está muito próxima do *pValor* adotado (0,05).

Em relação ao polimorfismo XRCC1Gln632Gln, as frequências de A/A, A/G e entre os controles foram de 93% e 7%. O genótipo G/G não foi encontrado entre os controles. Já as frequências de A/A, A/G e G/G entre os pacientes foram de 25%, 25% e 50% respectivamente ($p < 0,001$). A frequência alélica de G entre controles e pacientes foi de 0,03 e 0,62 respectivamente ($p < 0,001$). Para o polimorfismo XRCC2Arg188His, as frequências genotípicas para o grupo controle foram de 68% (Arg/His), 19% (Arg/His) e 13% (His/His) e para o grupo de pacientes foram de 13,8% (Arg/Arg), 18,8% (Arg/His) e 67,5% (His/His); ($p < 0,001$).

Quando observamos os resultados obtidos para as frequências genotípicas do polimorfismo XRCC3Thr241Met, observamos diferenças entre o grupo caso e controle ($p = 0,007$), sendo que as frequências de Thr/Thr, Thr/Met, Met/Met foram de 66,3%, 22,5%, 11,3% entre o grupo de pacientes e de 86%, 9% e 5% nos controles. Em relação ao polimorfismo XRCC4G1394T, as frequências de G/G, G/T e T/T entre os controles foram de 45%, 33% e 22%, enquanto que essas frequências no grupo de pacientes foram de 11,3%, 16,3% e 72,4% ($p=0,001$).

Tabela 11- Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs entre casos e controles.

SNP	Genótipo	Grupo Caso n(%)	Grupo Controle n(%)	Pvalor
EGF+61	A/A	0 (0)	23 (23,0)	<0,001
	A/G	36 (45,0)	44 (44,0)	
	GG	44 (55,0)	33 (33,0)	
	G	0,77	0,55	<0,001
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	15 (18,8)	67 (67,0)	<0,001
	Arg/Trp	31 (38,8)	4 (4,0)	
	Trp/Trp	34 (42,5)	29 (29,0)	
	Trp	0,62	0,31	<0,001
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	35 (43,8)	87 (87,0)	<0,001
	Ile/Val	43 (53,8)	13 (13,0)	
	Val/Val	2 (2,5)	0 (0)	
	Val	0,29	0,06	<0,001
XRCC1 Pro206Pro	A/A	35 (43,8)	80 (80)	<0,001
	A/G	36 (45,0)	20 (20,0)	
	G/G	9 (11,2)	0 (0)	
	G	0,34	0,1	<0,001
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	42 (52,5)	83 (83,0)	<0,001
	Arg/His	22 (27,5)	10 (10,0)	
	His/His	16 (20,0)	7 (7,0)	
	His	0,34	0,12	<0,001
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	23 (28,8)	29 (29,0)	0,003
	Arg/Gln	33 (41,3)	20 (20,0)	
	Gln/Gln	24 (30,0)	51 (51,0)	
	Gln	0,5	0,61	0,049
XRCC1 Gln632Gln	A/A	20 (25,0)	93 (93,0)	<0,001
	A/G	20 (25,0)	7 (7,0)	
	G/G	40 (50)	0 (0)	
	G	0,62	0,03	<0,001
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	11 (13,8)	68 (68,0)	<0,001
	Arg/His	15 (18,8)	19 (19,0)	
	His/His	54 (67,5)	13 (13,0)	
	His	0,77	0,22	<0,001
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	53 (66,3)	86 (86,0)	0,007
	Thr/Met	18 (22,5)	9 (9,0)	
	Met/Met	9 (11,3)	5 (5,0)	
	Met	0,22	0,09	0,001
XRCC4 G1394T	G/G	9 (11,3)	45 (45,0)	0,001
	G/T	13 (16,3)	33 (33,0)	
	T/T	58 (72,4)	22 (22,0)	
	T	0,8	0,38	0,001

A tabela 12 apresenta a comparação entre o sexo dos pacientes estudados e os genótipos observados para os polimorfismos EGF+61, XRCC1Arg194Trp, GSTP1Ile105Val, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His, XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2Arg188His, XRCC3Thr241 e XRCC4G1394T. Pudemos observar que não foram verificadas associações significativas entre as frequências genotípicas e o sexo, ou seja, a distribuição dos genótipos dos 10 SNP avaliados se deu de forma independente do sexo dos pacientes.

Tabela 12. Distribuição dos genótipos estudados de acordo com o sexo dos pacientes.

SNP	Pacientes						
		Masculino		Feminino		Pvalor	
		n	%	n	%		
EGF+61	A/A	0	0	0	0	0,851	
	A/G	23	44,2	13	46,4		
	GG	29	55,8	15	53,6		
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	10	19,2	5	17,9	0,989	
	Arg/Trp	20	38,5	11	39,2		
	Trp/Trp	22	42,3	12	42,9		
	Arg/Trp ou Trp/Trp	42	80,8	23	82,1		0,881
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	23	44,2	12	42,9	0,902	
	Ile/Val	28	53,9	15	53,6		
	Val/Val	1	1,9	1	3,5		
	Ile/Val ou Val/Val	29	55,8	16	57,1		0,906
XRCC1 Pro206Pro	A/A	25	48,1	10	35,7	0,541	
	A/G	22	42,3	14	50,0		
	G/G	5	9,6	4	14,3		
	A/G ou G/G	27	51,9	18	64,3		0,288
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	26	50	16	57,2	0,671	
	Arg/His	16	30,8	6	21,4		
	His/His	10	19,2	6	21,4		
	Arg/His ou His/His	26	50	12	42,8		0,542
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	13	25,0	10	35,7	0,584	
	Arg/Gln	23	44,2	10	35,7		
	Gln/Gln	16	30,8	8	28,6		
	Arg/Gln ou Gln/Gln	39	75,0	18	64,3		0,313
XRCC1 Gln632Gln	A/A	16	30,8	4	14,3	0,138	
	A/G	10	19,2	10	35,7		
	G/G	26	50	14	50,0		
	A/G ou G/G	36	69,2	24	85,7		0,104
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	10	19,2	1	3,6	0,152	
	Arg/His	9	17,3	6	21,4		
	His/His	33	63,5	21	75,0		
	Arg/His ou His/His	42	80,8	27	96,4		0,086*
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	36	69,2	17	60,7	0,269	
	Thr/Met	9	17,3	9	32,2		
	Met/Met	7	13,5	2	7,1		
	Thr/Met ou Met/Met	16	30,8	11	39,3		0,442
XRCC4 G1394T	G/G	7	13,5	2	7,1	0,687	
	G/T	8	15,4	5	17,9		
	T/T	37	71,1	21	75,0		
	G/T ou T/T	45	86,5	26	92,9		0,483*

No presente trabalho, buscamos observar também se há alguma correlação entre os genótipos estudados e a idade dos pacientes em questão. Para tanto dividimos o grupo de estudo em duas classes, de acordo com suas faixas etárias: um grupo de pacientes com idade até 50 anos e o segundo grupo acima de 50 anos (Tabela 13).

Tabela 13 Distribuição dos genótipos avaliados de acordo com a idade dos pacientes.

SNP		Idade				Pvalor
		Até 50 anos		Acima de 50 anos		
		n	%	n	%	
EGF+61	A/A	0	0	0	0	0,326
	A/G	19	40,4	17	51,5	
	GG	28	59,6	16	48,5	
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	10	21,3	5	15,2	0,558
	Arg/Trp	16	34,0	15	45,5	
	Trp/Trp	21	44,7	13	39,3	
	Arg/Trp ou Trp/Trp	37	78,7	28	84,8	0,49
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	21	44,7	14	42,5	0,955
	Ile/Val	25	53,2	18	54,5	
	Val/Val	1	2,1	1	3,0	
	Ile/Val ou Val/Val	26	55,3	19	57,5	0,841
XRCC1 Pro206Pro	A/A	20	42,6	15	45,5	0,465
	A/G	20	42,6	16	48,5	
	G/G	7	14,8	2	6,0	
	A/G ou G/G	27	57,4	18	54,5	0,797
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	27	57,4	15	45,5	0,55
	Arg/His	12	25,5	10	30,3	
	His/His	8	17,1	8	24,2	
	Arg/His ou His/His	20	42,6	18	54,5	0,29
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	14	29,8	9	27,3	0,503
	Arg/Gln	17	36,2	16	48,5	
	Gln/Gln	16	34	8	24,2	
	Arg/Gln ou Gln/Gln	32	70,2	24	72,7	0,807
XRCC1 Gln632Gln	A/A	12	25,5	8	24,2	0,33
	A/G	9	19,1	11	33,3	
	G/G	26	55,4	14	42,5	
	A/G ou G/G	35	74,5	25	75,8	0,896
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	7	14,9	4	12,1	0,924
	Arg/His	9	19,1	6	18,2	
	His/His	31	66,0	23	69,7	
	Arg/His ou His/His	40	85,1	29	87,9	1,0*
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	34	72,3	19	57,6	0,334
	Thr/Met	8	17,1	10	30,3	
	Met/Met	5	10,6	4	12,1	
	Thr/Met ou Met/Met	13	27,7	17	42,4	0,169
XRCC4 G1394T	G/G	4	8,5	5	15,2	0,509
	G/T	9	19,1	4	12,1	
	T/T	34	72,4	24	72,7	
	G/T ou T/T	43	91,5	28	84,8	0,477*

Com base nas frequências observadas na tabela 9, pudemos inferir que não houve nenhuma associação significativa entre os genótipos estudados e a faixa etária dos pacientes em questão.

A tabela 14 apresenta os dados obtidos através da comparação dos genótipos com os diferentes tipos de tumores analisados (glioblastomas e astrocitomas). Para esta associação não foram verificadas associações significativas entre as frequências genotípicas e o tipo de tumor, ou seja, a distribuição dos genótipos dos 10 SNP avaliados foi independente do tipo tumoral apresentado pelos pacientes. A exceção foi o polimorfismo de XRCC1 Gln632Gln, cujas frequências genotípicas diferiram significativamente entre os pacientes com Glioblastoma e Astrocitoma ($p=0,014$).

Tabela 14- Associação dos polimorfismos avaliados com o tipo de tumor.

SNP	Tipo de Tumor					
	Glioblastoma		Astrocitoma		Pvalor	
		n	%	n	%	
EGF+61	A/A	0	0	0	0	0,466
	A/G	18	48,6	17	40,5	
	GG	19	51,4	25	59,5	
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	6	16,2	9	21,4	0,738
	Arg/Trp	14	37,9	17	40,5	
	Trp/Trp	17	45,9	16	38,1	
	Arg/Trp ou Trp/Trp	31	83,8	33	78,6	
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	15	40,5	20	47,6	0,819
	Ile/Val	21	56,8	21	50	
	Val/Val	1	2,7	1	2,4	
	Ile/Val ou Val/Val	22	59,5	22	52,4	
XRCC1 Pro206Pro	A/A	16	43,2	19	45,2	0,357
	A/G	19	51,4	17	40,5	
	G/G	2	5,4	6	14,3	
	A/G ou G/G	21	56,8	23	54,8	
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	21	56,8	20	47,6	0,709
	Arg/His	9	24,3	13	31	
	His/His	7	18,9	9	21,4	
	Arg/His ou His/His	16	43,2	22	52,4	
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	10	27,0	12	28,6	0,363
	Arg/Gln	13	35,1	20	47,6	
	Gln/Gln	14	37,9	10	23,8	
	Arg/Gln ou Gln/Gln	27	73,0	30	71,4	
XRCC1 Gln632Gln	A/A	7	18,9	12	28,6	0,014
	A/G	15	40,55	5	11,9	
	G/G	15	40,55	25	59,5	
	A/G ou G/G	30	81,1	30	71,4	
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	7	18,9	4	9,5	0,206
	Arg/His	4	10,8	10	23,8	
	His/His	26	70,3	28	66,7	
	Arg/His ou His/His	30	81,1	38	90,5	
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	22	59,5	31	73,8	0,395
	Thr/Met	10	27,0	7	16,7	
	Met/Met	5	13,5	4	9,5	
	Thr/Met ou Met/Met	15	40,5	11	26,2	
XRCC4 G1394T	G/G	4	10,8	5	11,9	0,568
	G/T	4	10,8	8	19,1	
	T/T	29	78,4	29	69,0	
	G/T ou T/T	33	89,2	37	88,1	

Na análise posterior, os tumores de baixo grau (graus I e II) e os de alto grau (graus III e IV) foram agrupados e comparados entre si em relação aos genótipos observados nos polimorfismos EGF+61, GSTP1, XRCC1Arg194Trp, XRCC1Pro206Pro, XRCC1Arg280His, XRCC1Arg399Gln, XRCC1Gln632Gln, XRCC2Arg188His, XRCC3Thr241 e XRCC4G1394T. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 15, onde não foram verificadas associações significativas entre as frequências genotípicas e os graus de tumor, ou seja, a distribuição dos genótipos dos 10 SNPs avaliados foi independente do grau tumoral apresentado pelos pacientes. Uma associação marginal, contudo, foi observada entre o polimorfismo de XRCC3 Thr241Met e os graus tumorais quando se adotou um modelo genético dominante ($p=0,056$).

Tabela 15. Distribuição dos genótipos de acordo com os graus tumorais.

SNP	Grau Tumoral					
		Alto		Baixo		Pvalor
		n	%	n	%	
EGF+61	A/A	0	0	0	0	0,547
	A/G	23	46,9	12	40,0	
	GG	26	53,1	18	60,0	
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	8	16,3	7	23,3	0,741
	Arg/Trp	20	40,8	11	36,7	
	Trp/Trp	21	42,9	12	40,0	
	Arg/Trp ou Trp/Trp	41	83,7	23	76,7	0,441
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	21	42,9	14	46,7	0,526
	Ile/Val	26	53,1	16	53,3	
	Val/Val	2	4,0	0	0	
	Ile/Val ou Val/Val	28	57,1	16	53,3	0,741
XRCC1 Pro206Pro	A/A	20	40,8	15	50,0	0,136
	A/G	26	53,1	10	33,3	
	G/G	3	6,1	5	16,7	
	A/G ou G/G	29	59,2	15	50,0	0,425
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	27	55,1	14	46,7	0,237
	Arg/His	15	30,6	7	23,3	
	His/His	7	14,3	9	30,0	
	Arg/His ou His/His	22	44,9	16	53,3	0,466
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	13	26,5	9	30,0	0,275
	Arg/Gln	18	36,75	15	50,0	
	Gln/Gln	18	36,75	6	20,0	
	Arg/Gln ou Gln/Gln	36	73,5	21	70	0,738
XRCC1 Gln632Gln	A/A	14	28,6	5	16,7	0,083
	A/G	15	30,6	5	16,7	
	G/G	20	40,8	20	66,6	
	A/G ou G/G	35	71,4	25	83,3	0,23
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	8	16,3	3	10,0	0,493
	Arg/His	7	14,3	7	23,3	
	His/His	34	69,4	20	66,7	
	Arg/His ou His/His	41	83,7	27	90,0	0,529*
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	29	59,2	24	80,0	0,161
	Thr/Met	13	26,5	4	13,3	
	Met/Met	7	14,3	2	6,7	
	Thr/Met ou Met/Met	20	40,8	6	20,0	0,056
XRCC4 G1394T	G/G	7	14,3	2	6,7	0,208
	G/T	5	10,2	7	23,3	
	T/T	37	75,5	21	70,0	
	G/T ou T/T	42	85,7	28	93,3	0,470*

Análises de regressão logística foram realizadas na tentativa de associar os haplótipos dos diferentes polimorfismos estudados com o risco de desenvolvimento dos tumores de sistema nervoso central. A tabela 16 apresenta os resultados obtidos. Em relação ao polimorfismo EGF+61, nós observamos um aumento sutil no risco de desenvolvimento tumoral para a presença do alelo G (OR=2,48; IC, 1,35- 4,55; $p=0,003$). Quando comparamos o genótipo Arg/Arg, o genótipo mais comum (selvagem) do polimorfismo XRCC1Arg194Trp, com o alelo Trp194 na população estudada, podemos observar que a presença do alelo Trp revela um risco aumentado para o desenvolvimento tumoral (OR=8,80; IC, 4,37 – 17,70; $p<0,001$). Em relação ao polimorfismo GSTP1Ile105Val, podemos observar um risco maior para o desenvolvimento de tumores de sistema nervoso central na presença da variante Val (OR=8,60; IC, 4,14 – 17,87; $p<0,001$). Indivíduos homozigotos mutantes His/His para o polimorfismo XRCC1 Arg280His apresentaram um risco 4,51 vezes maior de câncer de sistema nervoso central comparativamente aos homozigotos selvagens Arg/Arg (IC 95%: 1,72 -11,83; $p= 0,001$). Comparando o genótipo A/A do polimorfismo XRCC1Pro206Pro, como o alelo G na população estudada, podemos observar que a presença do alelo G revela um risco aumentado para o desenvolvimento tumoral (OR=5,14; IC, 2,66 – 9,95; $p<0,001$). Em relação ao polimorfismo XRCC1Arg399Gln, observamos um aumento sutil no risco de desenvolvimento tumoral para a presença do alelo Gln399 (OR=1,01; IC, 0,53 – 1,93; $p=0,971$). Quando comparamos o genótipo A/A do polimorfismo XRCC1Gln632Gln, com o alelo G na população estudada, podemos observar que a presença do alelo G revela um risco aumentado para o desenvolvimento tumoral (OR= 39, 86; IC, 15,88 – 100,0; $p<0,001$). Ao analisarmos o polimorfismo XRCC2Arg188His, podemos observar que a presença do alelo mutante His188 revela um risco aumentado para o desenvolvimento tumoral (OR=13,33; IC, 6,22 – 28,57; $p<0,001$) e que o homozigoto His/His pode aumentar o risco de câncer em cerca de 25 vezes ($p<0,001$). Em relação ao polimorfismo XRCC3Thr241Met, foi observado um aumento no risco de desenvolvimento tumoral para a presença do alelo Met241 (OR=3,13; IR, 1,50 – 6,50; $p=0,002$). Para o gene XRCC4G1394T, pudemos observar também que a presença do alelo polimórfico T está relacionada a um aumento do risco de desenvolvimento de tumores de sistema nervoso central (OR=6,45; IC, 2,90 – 14,33; $p<0,001$).

Tabela 16. Risco de câncer associado aos SNPs pesquisados.

SNP	Genótipos	Casos/Controles n	OR (IC 95%)	Pvalor
EGF+61	A/A ou AG	36/67	1	-
	GG	44/33	2,48 (1,35 - 4,55)	0,003
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	15/67	1	-
	Arg/Trp	31/4	34,62 (10,61 - 112,9)	<0,001
	Trp/Trp	34/29	5,24 (2,48 - 11,06)	<0,001
	Arg/Trp ou Trp/Trp	65/33	8,80 (4,37 - 17,70)	<0,001
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	35/87	1	-
	Ile/Val	43/13	8,22 (3,94 - 17,13)	<0,001
	Val/Val	2/0	-	0,029
	Ile/Val ou Val/Val	45/13	8,60 (4,14 - 17,87)	<0,001
XRCC1 Pro206Pro	A/A	35/80	1	-
	A/G	36/20	4,11 (2,09 - 8,08)	<0,001
	G/G	9/0	-	<0,001
	A/G ou G/G	45/20	5,14 (2,66 - 9,95)	<0,001
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	42/83	1	-
	Arg/His	22/10	4,35 (1,88 - 10,01)	<0,001
	His/His	16/7	4,51 (1,72 - 11,83)	0,001
	Arg/His ou His/His	38/17	4,41 (2,23 - 8,73)	<0,001
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	23/29	1	-
	Arg/Gln	33/20	2,08 (0,95 - 4,53)	0,064
	Gln/Gln	24/51	0,59 (0,28 - 1,23)	0,16
	Arg/Gln ou Gln/Gln	57/71	1,01 (0,53 - 1,93)	0,971
XRCC1 Gln632Gln	A/A	20/93	1	-
	A/G	20/7	13,28 (4,95 - 35,65)	<0,001
	G/G	40/0	-	<0,001
	A/G ou G/G	60/7	39,86 (15,88 - 100,0)	<0,001
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	11/68	1	-
	Arg/His	15/19	4,88 (1,93 - 12,36)	<0,001
	His/His	54/13	25,68 (10,66 - 61,83)	<0,001
	Arg/His ou His/His	69/32	13,33 (6,22 - 28,57)	<0,001
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	53/86	1	-
	Thr/Met	18/9	3,24 (1,36 - 7,75)	0,006
	Met/Met	9/5	2,92 (0,93 - 9,18)	0,057
	Thr/Met ou Met/Met	27/14	3,13 (1,50 - 6,50)	0,002
XRCC4 G1394T	G/G	9/45	1	-
	G/T	13/33	1,97 (0,75 - 5,15)	0,163
	T/T	58/22	13,18 (5,53 - 31,39)	<0,001
	G/T ou T/T	71/55	6,45 (2,90 - 14,33)	<0,001

Para avaliar a influência dos polimorfismos estudados sobre a taxa de sobrevida dos pacientes, foram construídas curvas de Kaplan-Meier. A comparação para verificar se os haplótipos observados podem diminuir ou aumentar a chance de sobrevida foi realizada pelo teste de log-Rank. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$); portanto, *pValores* menores que 0,05 indicam a existência de diferenças significativas nas taxas de sobrevida entre os genótipos comparados. Nosso estudo demonstra que apenas o polimorfismo XRCC1Pro206Pro apresentou $p<0,05$ ($p=0,028$), indicando que a presença desse polimorfismo pode alterar o tempo médio de sobrevida. Em relação aos outros polimorfismos, todos apresentaram $p>0,05$, não revelando nenhuma diferença significativa.

As comparações das taxas de sobrevida dos pacientes foram: EGF $p=0,507$, sendo que a sobrevida média dos pacientes portadores dos alelos A/G e G/G foi de cerca de 64 semanas. Para o polimorfismo XRCC1 Arg194Trp a taxa de sobrevida foi de $p=0,20$, sendo que para os pacientes portadores dos alelos Arg/Trp e Trp/Trp foi de cerca de 64 semanas. Já no polimorfismo GSTP1Ile105Val a taxa de sobrevida foi de $p=0,82$ e para os pacientes portadores dos alelos Ile/Val e Val/Val foi de cerca de 63 semanas. Em relação ao polimorfismo XRCC1Arg280His a taxa de sobrevida foi de $p=0,144$, sendo que para os portadores dos alelos Arg/His e His/His foi de cerca de 77 semanas. Para o polimorfismo XRCC1Pro206Pro a taxa de sobrevida foi de $p=0,028$, sendo que para os portadores dos alelos A/G e G/G foi de cerca de 58 semanas. Já no polimorfismo XRCC1ARG399Gln a taxa de sobrevida foi de $p=0,439$, sendo que para os portadores dos alelos Arg/Gln e Gln/Gln foi de cerca de 63 semanas. Para o polimorfismo XRCC1Gln632Gln a taxa de sobrevida foi de $p=0,048$, sendo que para os portadores dos alelos A/G e G/G foi de cerca de 60 semanas. O polimorfismo XRCC2Arg188His apresentou taxa de sobrevida de $p=0,348$, sendo que para os portadores dos alelos Arg/His e His/His foi de cerca de 68 semanas. Em relação ao polimorfismo XRCC3Thr241, a taxa de sobrevida foi de $p=0,862$, sendo que para os alelos Thr/Met e Met/Met foi de cerca de 61 semanas. Para o polimorfismo XRCC4G1394T, a taxa de sobrevida foi de $p=0,07$, sendo que para os alelos G/T e T/T foi de cerca de 69 semanas.

Na tabela 17 são descritas as proporções de óbitos e não óbitos, além do tempo médio de sobrevida (em semanas) para os genótipos de cada um dos SNPs estudados (os *pValores* são referentes aos testes de Log rank). As figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, juntamente com os resultados dos testes estão apresentadas abaixo.

Tabela 17. Taxas de sobrevida de acordo com os polimorfismos avaliados

SNP	Genótipo	Óbitos		Não Óbitos		Tempo Médio de Sobrevida	pValor
		n	%	n	%		
EGF+61	A/G	14	38,9	22	61,1	68,5	0,507
	GG	21	47,7	23	52,3	64,6	
XRCC1 Arg194Trp	Arg/Arg	5	33,3	10	66,7	69,66	0,2
	Arg/Trp	11	35,5	20	64,5	71,41	
	Trp/Trp	19	55,9	15	44,1	56,1	
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	15	42,9	20	57,1	67,47	0,82
	Ile/Val	19	44,2	24	55,8	64,01	
	Val/Val	1	50,0	1	50,0	27,8	
XRCC1 Pro206Pro	A/A	12	34,3	23	65,7	74,74	0,028
	A/G	21	58,3	15	41,7	50,2	
	G/G	2	22,2	7	77,8	83,56	
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	23	54,76	19	45,24	56,17	0,144
	Arg/His	6	27,3	16	72,7	74,11	
	His/His	6	37,5	10	62,5	75,53	
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	10	43,5	13	56,5	68,87	0,439
	Arg/Gln	13	39,4	20	60,6	68,12	
	Gln/Gln	12	50,0	12	50,0	55,13	
XRCC1 Gln632Gln	A/A	6	30,0	14	70,0	79,66	0,048
	A/G	12	60,0	8	40,0	44,51	
	G/G	17	42,5	23	57,5	66,42	
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	6	55,5	5	45,5	47,26	0,348
	Arg/His	5	33,3	10	66,7	75,75	
	His/His	24	45,5	30	55,5	65,66	
XRCC3 Thr241Met	Thr/Thr	22	41,5	31	58,5	68,32	0,862
	Thr/Met	9	50,0	9	50,0	59,9	
	Met/Met	4	45,5	5	55,5	66,3	
XRCC4 G1394T	G/G	6	66,7	3	33,3	29,24	0,07
	G/T	3	23,1	10	76,9	79,24	
	T/T	26	44,8	32	55,2	67,52

Figura 7: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo EGF + 61.

Figura 8: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC1 Arg194Trp.

Figura 9: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo GSTP1 Ile105Val.

Figura 10: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC1 Pro206Pro.

Figura 11: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC1 Arg280His.

Figura 12: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC1 Arg399Gln.

Figura 13: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC1 Gln632Gln.

Figura 14: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC2 Arg188His.

Figura 15: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC3 Thr241Met.

Figura 16: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo XRCC4 G1394T.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os genes envolvidos no processo de tumorigênese são considerados marcadores moleculares em potencial, associados com a susceptibilidade ao câncer. A predisposição a importantes tipos de câncer humano têm sido associada atualmente também aos polimorfismos genéticos, que podem apresentar, juntamente com outras alterações genéticas, importantes contribuições quanto à origem e desenvolvimento do câncer e no comportamento tumoral (Costa et al, 2008).

Os polimorfismos de base única (SNPs) são as variações encontradas em maior abundância no genoma humano e os métodos utilizados na análise dessas variações são rápidos, precisos e baratos; por esses motivos, pesquisas relacionadas a polimorfismos têm adquirido crescente popularidade, principalmente aquelas relacionadas ao estudo genético de diferentes tipos de doenças. A identificação de SNPs como fatores de risco para diferentes tipos de câncer pode ser relevante para sua prevenção, diagnóstico e prognóstico (Kirk et al, 2002).

Nós buscamos neste trabalho, através de um estudo caso-controle, investigar a relação dos polimorfismos de base única GSTP-1 Ile105Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met e XRCC4 G1394T e EGF+61 com a susceptibilidade para tumores gliais do sistema nervoso central (astrocitomas e glioblastomas).

O gene EGF, juntamente com TGF α , epiregulinas, betacelulinas e anfiregulinas constituem a superfamília EGF de fatores de crescimento. Essa classe de genes está envolvida com a síntese de DNA, proliferação celular e estímulos mitogênicos nos tecidos epidermais. O produto gênico de EGF atua como um sinal mitogênico na célula, que ativa a síntese de DNA e a proliferação celular. Dessa forma, a hiperexpressão de EGF pode levar a um aumento dos níveis de diferenciação e proliferação, inibir apoptose e acentuar a capacidade de invasão de células cancerosas em muitos tipos de tumores, incluindo tumores do sistema nervoso (Harari et al, 2007).

O polimorfismo mais bem estudado de EGF consiste na substituição de uma guanina (G) por adenina (A) na região 5' UTR do gene. Estudos indicam que esse polimorfismo está associado com o risco de desenvolvimento de alguns tipos de tumores, como melanoma, glioblastoma multiforme e câncer gástrico. Em melanoma foi observado que pacientes portadores do alelo G apresentaram um relativo aumento do risco de câncer, quando comparados com a população normal. Em glioblastoma multiforme e câncer gástrico também

foi observado que a presença do alelo G é um fator de risco para a carcinogênese (Kang et al, 2007).

Em nosso trabalho foi avaliada a relação entre o polimorfismo de EGF e o risco do desenvolvimento de gliomas. Avaliamos um total de 80 pacientes e 100 controles e observamos diferenças nas frequências genóticas entre os grupos analisados ($p < 0,0001$). Entre os pacientes, as frequências foram de 55% para G/G e 45% para G/A, e entre o grupo controle as frequências foram de 33% (G/G), 44% (G/A) e 23% (A/A), indicando que a presença do alelo G pode estar associada à formação desses tumores. Quando avaliamos a presença do alelo G e sua associação ao risco de câncer, observamos que portadores do alelo G apresentaram 2,48 vezes mais chance de desenvolverem astrocitomas e glioblastomas ($p < 0,0001$).

Wu et al (2009) analisaram 157 pacientes portadores de câncer colorretal e observaram que a distribuição do genótipo homozigoto G/G foi mais frequente entre os pacientes do que entre o grupo controle (33,1% em pacientes e 11,1% em controles), assim como a frequência alélica de G (51,3% em pacientes e 33,3% em controles) e, através desses dados, concluíram que o genótipo EGF + 61 G/G e a presença do alelo G estão significativamente relacionados ao câncer colorretal. Vishnoi et al (2008) analisaram a influência do polimorfismo EGF + 61 sobre o risco de câncer de bexiga em 126 pacientes e 190 indivíduos saudáveis. Eles observaram que o genótipo G/G estava fortemente associado ao câncer e observaram ainda que o risco foi maior no sexo feminino ($p = 0,003$). Entre os tumores de sistema nervoso, o polimorfismo EGF + 61 é bastante estudado em glioblastomas, porém não existem trabalhos que relacionem este polimorfismo aos tumores extra-axiais. Vauleon et al (2007) avaliaram 209 pacientes com glioblastoma e 214 controles e observaram a presença de G/G em 21,1% dos pacientes e 14% dos controles. Costa et al (2007) avaliaram a associação entre o polimorfismo EGF + 61 e o risco de desenvolvimento de gliomas; seus resultados demonstraram que a presença do alelo G confere alto risco de desenvolvimento desse tipo de tumor e que a presença do genótipo G/G aumenta em aproximadamente 1,50 vezes o risco de desenvolvimento de gliomas, glioblastomas e oligodendrogliomas.

Existem outros trabalhos que relacionam a presença da variante polimórfica A/A ao risco de cânceres. Upadhyay et al (2008) estudaram a influência do polimorfismo EGF + 61 em 174 pacientes portadores de câncer de esôfago e seus resultados mostraram que a presença do genótipo A/A estava significativamente associada à susceptibilidade a esse tipo de tumor, principalmente em indivíduos do sexo masculino. Outros trabalhos não encontram nenhuma associação entre esse polimorfismo e o risco de câncer. Gao et al (2008) analisaram 173

pacientes portadores de tumores de nasofaringe e não observaram nenhuma influência do polimorfismo EGF + 61 G/A no risco de câncer. Wang et al (2008) analisaram as relações entre o risco de câncer de mama em mulheres chinesas e a presença do polimorfismo EGF + 61 e não observaram nenhuma diferença significativa entre os grupos caso e controle, sugerindo que este polimorfismo não está relacionado com o risco de câncer de mama.

Wang et al (2010) analisaram a relação entre o polimorfismo EGF+61 em 677 pacientes com gliomas e 698 controles. A frequência do alelo A nos pacientes foi de 33%, enquanto nos controles essa frequência foi de 27,3%. Outros dados revelaram que o genótipo G/A e A/A estava associado com o risco de desenvolver gliomas (OR = 1.48, 95%CI: 1.17-1.87, $p = 0.001$).

Almeida et al (2010) analisaram a relação entre o polimorfismo EGF+61 e o risco do desenvolvimento de tumores extra-axiais do sistema nervoso. Foi avaliado um total de 90 pacientes e 100 controles, sendo que houve diferenças nas frequências genótípicas entre os grupos analisados ($p < 0,0001$). Entre os pacientes, as frequências foram de 74,4% para G/G, 23,3% para G/A e 2,3 para A/A, e entre o grupo controle as frequências foram de 32% (G/G), 45% (G/A) e 23% (A/A), indicando que a presença do alelo G pode estar associada à formação desses tumores. Quando avaliada a presença do alelo G e sua associação ao risco de câncer, observaram que portadores do alelo G apresentaram 13 vezes mais chance de desenvolverem câncer ($p < 0,0001$) e ainda, quando se tratava do genótipo G/G, esses indivíduos apresentavam uma chance ainda maior (OD=24,07; IC, 5,34 – 32,50; $p < 0,0001$).

As glutatonas S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas que atuam principalmente em processos de desintoxicação, catalizando a conjugação de muitos componentes hidrofóbicos e eletrofílicos através de reações de redução da glutatona. Com base em suas propriedades bioquímicas, imunológicas e estruturais, as GSTs são agrupadas em quatro classes: GSTA, GSTM, GSTP e GSTT. Os membros da família de GSTs são conhecidos por apresentarem vários polimorfismos funcionais; variantes polimórficas de GSTP-1, por exemplo, provocam alterações relacionadas ao metabolismo de xenobióticos e estão envolvidas na susceptibilidade a diversos tipos de câncer e outras doenças.

GSTP-1 é o membro da família de GSTs cujo produto gênico se encontra fortemente expresso no cérebro. Ele apresenta um polimorfismo de base única muito estudado atualmente em cânceres, a substituição A313G, que resulta na mudança do aminoácido Ile em Val na posição 105. Essa variante não é muito comum entre indivíduos caucasinos. Em populações saudáveis, 51% dos indivíduos são homozigotos para o alelo selvagem Ile/Ile, 43% são heterozigotos Ile/Val e apenas 6% são homozigotos para o alelo polimórfico Val/Val. A

substituição GSTP-1 Ile105Val está localizada próxima ao sítio de ligação ao substrato, podendo provocar uma redução da atividade enzimática de GSTP-1 (Morales et al, 2008).

Em nosso estudo, as frequências genótípicas observadas entre os pacientes foram próximas às apresentadas acima: 43,8% Ile/Ile, 53,8% Ile/Val e 2,5% Val/Val, porém encontramos diferenças significativas quando comparamos essas frequências com as obtidas para o grupo controle: 87% Ile/Ile e 13% Ile/Val ($p < 0,0001$), sendo que a ocorrência da variante polimórfica Val/Val não foi observada entre os controles. Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência de Val105 foi de 0,29 entre os pacientes e 0,06 entre os controles ($p < 0,001$), sugerindo que o alelo polimórfico Val105 pode estar envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas. A presença do alelo Val105 revelou um risco de aumento para o desenvolvimento de gliomas (OR=8,60; 95% CI= 4,14 – 17,87; $p < 0,001$).

Vários outros estudos também encontraram essa relação do alelo Val105 com o risco de cânceres. Reszka et al (2007) analisaram a influência desse polimorfismo no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Eles observaram um grande acúmulo de agentes oxidantes no sangue de indivíduos que possuíam a variante Arg105 e encontraram também maiores frequências genéticas de Arg/Arg entre pacientes com câncer de pulmão do que no grupo controle. Saxena et al (2008) realizaram um estudo caso-controle em indivíduos da população do norte da Índia, na tentativa de avaliar a relação entre o polimorfismo GSTP-1 Ile105 Val e o risco de câncer de mama. Foi observada uma chance 2,6 vezes maior de desenvolvimento desse tipo de câncer nos indivíduos portadores do genótipo Arg/Arg. Kadouri et al (2008) analisaram a influência do polimorfismo Ile105Val em pacientes com câncer de mama que também apresentavam mutações no gene BRCA e observaram um risco 3,2 vezes maior entre os portadores do alelo Arg105, sugerindo que a presença da variante Arg105 pode estar associada com o desenvolvimento do câncer de mama.

Ye et al (2006), realizaram um estudo envolvendo 23.000 indivíduos portadores de câncer de pulmão e 30.000 controles e não observaram nenhuma correlação entre o polimorfismo GSTP-1 Ile/Val e o risco de câncer de pulmão. Wideroff et al (2007) também não encontraram nenhuma relação entre o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e a presença da variante polimórfica Val105 do gene GSTP-1.

Existem poucos estudos que relacionam o polimorfismo GSTP-1 Ile105Val ao risco de tumores do sistema nervoso e os resultados obtidos nesses estudos são controversos. De Roos et al (2003) analisaram 422 portadores de gliomas, 172 portadores de meningiomas e 79 de schwannomas e observaram que a presença do genótipo Val/Val estava associada com o

aumento da incidência de gliomas e schwannomas, sendo que esse risco aumentava de acordo com o número de alelos Val (1,3 vezes em Ile/Val e 2,1 vezes em Val/Val). Schwartzbaum et al (2007) analisaram 329 casos de glioblastomas e 546 meningiomas e não encontraram associações entre o risco de tumores de sistema nervoso e a presença do polimorfismo GSTP-1 Ile105Val. Coutinho et al (2010) analisaram o polimorfismo GSTP1 Ile105Val em 78 portadores de gliomas. As frequências para os genótipos foram: 45% para Ile/Ile, 47% Ile/Val, 8% Val/Val. A frequência para a presença do alelo Val foi de 55%, sendo que, quando comparada com o grupo controle, essa frequência foi de 63%. Nesse trabalho os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo Val não influencia no desenvolvimento dos gliomas.

Os genes XRCC (X-ray cross complementing group) foram descobertos principalmente por seus papéis na proteção das células de mamíferos contra danos causados por radiações ionizantes. Estudos determinam que esses genes são importantes na estabilidade genética do DNA. Embora a perda de alguns desses genes não necessariamente confira altos níveis de sensibilidade à radiação, eles constituem componentes importantes de várias vias de reparo do DNA (Thacker e Zdzienicka, 2004; Sterpone et al., 2010). O reparo de quebras de fita simples, induzidas por uma variedade de fatores externos e internos, incluindo as radiações ionizantes, os agentes alquilantes e as espécies reativas de oxigênio, acontece por meio do processo de reparo de excisão de bases, que depende da função da proteína de reparo do DNA XRCC1 (Sterpone et al 2010).

Em nosso estudo analisamos cinco polimorfismos presentes no gene XRCC1: Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln. As frequências genotípicas para o polimorfismo Arg194Trp observadas no grupo controle foram 67% Arg/Arg, 4% Arg/Trp, 29% Trp/Trp. Para o grupo caso as frequências foram 18,8% Arg/Arg, 38,8% Arg/Trp e 42,5% Trp/Trp ($p < 0,001$). Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência de Trp foi de 0,62 entre os pacientes e 0,31 entre os controles ($p < 0,001$), sugerindo que o alelo polimórfico Trp194 pode estar envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas. A presença do alelo Trp194 revelou um risco aumentado para o desenvolvimento de gliomas (OR=8,80; 95% CI= 4,37 – 17,70; $p < 0,001$).

Han et al (2004) estudaram a frequência do polimorfismo Arg194Trp em pacientes portadores de câncer de pele, chegando à conclusão de que a presença do alelo Trp194 pode aumentar o risco de desenvolvimento desse tipo de câncer. Em um estudo realizado por Batar et al, 2010, o polimorfismo Arg194Trp foi analisado em 116 pacientes com asma, nos quais a presença do alelo Trp194 revelou um risco aumentado para o desenvolvimento dessa doença.

Liu et al, 2010 analisaram a frequência do polimorfismo Arg194Trp em 995 pacientes com câncer de mama e 1004 pessoas no grupo controle. As frequências alélicas e genótípicas não diferiram muito entre os grupos, sendo que a frequência do genótipo Arg/Trp entre os pacientes foi de 41,1% e entre os controles 37,5%. Já para o genótipo Trp/Trp, a frequência foi de 9,5% entre os pacientes e 8,8% entre os controles. Para a frequência alélica, a presença do alelo Trp entre pacientes foi de 50,3% enquanto que no grupo controle essa frequência foi de 46,3%. Com esses dados obtidos, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo Trp não interfere no risco de desenvolvimento de tumores de mama.

Wang et al (2010) trabalharam com 243 pacientes portadores de câncer de bexiga, e concluíram que a presença do alelo Trp aumenta cerca de 3,90 vezes o risco de desenvolver estes tumores, sugerindo que esse polimorfismo está envolvido na etiologia desses tumores. Meza-Espinoz et al (2009) analisaram o polimorfismo Arg194Trp em 120 pacientes com leucemia linfoblástica aguda e 120 controles. As frequências genótípicas e alélicas entre pacientes e controles não apresentaram diferenças. O genótipo Arg/Arg estava presente em 86 controles e 80 pacientes, o genótipo Arg/Trp estava presente em 31 controles e em 34 pacientes, já o genótipo Trp/Trp estava presente em 3 controles e 6 pacientes. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo Trp não interfere na etiologia desses tumores.

Yang et al (2010) analisaram a presença do polimorfismo Arg194Trp em 136 pacientes com leiomioma uterino e 140 controles. As frequências genótípicas para o grupo caso foram: 48,5% para o genótipo Arg/Arg, 41,9% para o genótipo Arg/Trp e 9,6% para o genótipo Trp/Trp. Essas frequências não diferem muito das encontradas no grupo controle, sendo que para o genótipo Arg/Arg a frequência foi de 55,7%, para Arg/Trp a frequência foi de 37,1% e para Trp/Trp a frequência foi de 7,1%. Com esses resultados os autores concluíram que o polimorfismo Arg194Trp não está associado com a etiologia de leiomioma uterino. Csejtei et al (2009) estudaram 108 pacientes com tumor de cabeça e pescoço e 102 controles. Os resultados obtidos por eles indicaram que a presença do alelo Trp não está relacionada com o desenvolvimento desse tipo de tumor, tendo em vista que os genótipos Arg194Trp e Trp194Trp apresentaram maior frequência no grupo controle.

As frequências genótípicas para o polimorfismo Arg399Gln observadas no grupo controle foram 29% Arg/Arg, 20% Arg/Gln e 51% Gln/Gln. Para o grupo caso as frequências foram 28,8% Arg/Arg, 41,3% Arg/Gln e 30% Gln/Gln ($p=0,003$). Também observamos diferenças entre as frequências alélicas: a frequência de Trp foi de 0,5 entre os pacientes e 0,61 entre os controles ($p=0,049$), sugerindo que o alelo polimórfico Gln399 não está

envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas. A presença do alelo Gln399 não revelou que ele esteja associado com o risco de desenvolvimento de gliomas (OR=1,01; 95% CI= 0,53-1,93; p=0,971).

Csejtei et al (2009) analisaram o polimorfismo Arg399Gln em 108 pacientes com tumor de cabeça e pescoço e 102 controles. As frequências genótípicas encontradas nos pacientes foram de 46,3% para o genótipo Arg/Arg, 43,5% para o genótipo Arg/Gln e 10,2% para Gln/Gln. Essas frequências obtidas foram similares no grupo controle, onde para o genótipo Arg/Arg a frequência foi de 51,9%, para o genótipo Arg/Gln a frequência foi de 40,2% e para o genótipo Gln/Gln a frequência foi de 7,9%. Com esses resultados, os autores concluíram que a presença do alelo Gln não está associada com a etiologia desses tumores. Em outro estudo realizado por Wang et al (2010) em 234 casos de tumores de bexiga e 253 controles, demonstra que a presença do alelo Gln também não está envolvida com o desenvolvimento desses tumores. As frequências genótípicas obtidas pelos pesquisadores foram de: Arg/Arg 48,3%, Arg/Gln 43,6% e Gln/Gln 8,1% no grupo caso; já no grupo controle essas frequências foram de Arg/Arg 41,5%, Arg/Gln 49,8% e Gln/Gln 8,7%. Yang et al (2010) avaliaram a presença do polimorfismo Arg194Gln em 136 pacientes com leiomioma uterino e 140 controles. As frequências genótípicas para o grupo caso foram: 34,6% para o genótipo Arg/Arg, 55,9% para o genótipo Arg/Gln e 9,6% para o genótipo Gln/Gln. Essas frequências não diferem muito das encontradas no grupo controle, sendo que para o genótipo Arg/Arg a frequência foi de 40,7%, para Arg/Gln a frequência foi de 51,4% e para Gln/Gln a frequência foi de 7,9%. Com esses resultados, os autores concluíram que o polimorfismo Arg399Gln não está associado com a etiologia de leiomioma uterino.

Meza-Espinoz et al (2009) analisaram o polimorfismo Arg194Trp em 120 pacientes com leucemia linfoblástica aguda e 120 controles. As frequências genótípicas e alélicas entre pacientes e controles não diversificaram. O genótipo Arg/Arg estava presente em 65 controles e 57 pacientes, o genótipo Arg/Trp estava presente em 47 controles e em 51 pacientes, já o genótipo Trp/Trp estava presente em 8 controles e 12 pacientes. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo Gln não interfere na etiologia desses tumores. Em um estudo de meta-análises realizado por Geng et al (2008), um total de 1334 casos de câncer gástrico e 2194 controles foi analisado segundo a presença do polimorfismo Arg399Gln. A presença do genótipo Gln/Gln não foi associada com o risco para o desenvolvimento desses tumores.

Yosunkaya et al (2010) analisaram o polimorfismo Arg399Gln em 119 pacientes com gliomas e em 120 controles. Os pacientes apresentaram alta incidência do polimorfismo,

sendo que para portadores do genótipo Arg/Gln a frequência foi de 56% e para portadores do genótipo Gln/Gln a frequência foi de 31%, sendo que a frequência do alelo Gln foi de 59%. Com esses dados os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo Gln está envolvido com o desenvolvimento de tumores e que pessoas portadoras desse alelo apresentam um risco de 3,5 vezes de desenvolverem gliomas.

As frequências genóticas para o polimorfismo Arg280His observadas no grupo controle foram 83% Arg/Arg, 10% Arg/His, 7% His/His. Para o grupo caso as frequências foram 52,5% Arg/Arg, 27,5% Arg/His e 20% His/His ($p < 0,001$). Também observamos diferenças entre as frequências alélicas: a frequência de His foi de 0,34 entre os pacientes e 0,12 entre os controles ($p < 0,001$), sugerindo que o alelo polimórfico His280 está envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas. A presença do alelo His280 revelou que ele está associado com o risco de desenvolvimento de gliomas (OR=4,41; 95% CI= 2,23-8,73; $p < 0,001$).

Wang et al (2010) analisaram a presença do polimorfismo Arg280His em 234 pacientes com câncer na bexiga e 253 controles. Para o grupo caso, as frequências para os genótipos foram: 59,8% para Arg/Arg, 37,6% para Arg/His e 2,6% para His/His. Já no grupo controle essas frequências foram de: 79,4% em Arg/Arg, 2,6% para Arg/His e para o genótipo His/His não foi detectado nenhum indivíduo. A frequência do alelo His no grupo caso foi de 0,214% enquanto que no grupo controle essa frequência foi de 0,103%. Os pesquisadores concluíram que a presença do alelo His está associada com a etiologia desses tumores e que portadores do alelo His têm um risco 2,43 vezes de desenvolver tumores de bexiga. Yang et al (2010) avaliaram a presença do polimorfismo Arg194Gln em 136 pacientes com leiomioma uterino e 140 controles. As frequências genóticas para o grupo caso foram: 47,1% para o genótipo Arg/Arg, 50% para o genótipo Arg/His e 2,9% para o genótipo His/His. No grupo controle essas frequências foram de: 75,7% para o genótipo Arg/Arg, 22,1% para Arg/His e 2% para o genótipo His/His. Em conclusão, os pesquisadores sugerem que a presença do polimorfismo Arg280His está associada com o aumento do risco para o desenvolvimento de leiomioma uterino.

Meza-Espinoz et al (2009) analisaram o polimorfismo Arg280His em 120 pacientes com leucemia linfoblástica aguda e 120 controles. As frequências genóticas e alélicas entre pacientes e controles não diversificaram. O genótipo Arg/Arg estava presente em 88 controles e 87 pacientes, o genótipo Arg/His estava presente em 31 controles e em 31 pacientes, já o genótipo His/His estava presente em 1 controle e 12 pacientes. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo His não interfere na etiologia desses tumores.

Liu et al, 2010 analisaram a frequência do polimorfismo Arg280His em 995 pacientes com câncer de mama e 1004 pessoas no grupo controle. As frequências alélicas e genotípicas não diferiram muito entre os grupos, sendo que a frequência do genótipo Arg/Arg nos pacientes foi de 20,6% e nos controles foi de 80,9%, Arg/His nos pacientes foi de 17,8% e nos controles 18,3%. Já para o genótipo His/His, a frequência foi de 1,6% nos pacientes e 0,8% nos controles. Para a frequência alélica, a presença do alelo His entre pacientes foi de 19,4% enquanto que no grupo controle essa frequência foi de 19,1%. Com esses dados obtidos, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a presença do alelo His não interfere no risco de desenvolvimento de tumores de mama. Em um estudo realizado por Kiuru et al (2008), 701 amostras de gliomas e 1560 amostras controle foram analisadas para detectar a frequência do polimorfismo Arg280His e se este estava envolvido na etiologia desses tumores. As frequências genotípicas para o grupo caso foram: 90,3% para o genótipo Arg/Arg, 9,6% para o genótipo Arg/His e 0,1% para o genótipo His/His. As frequências obtidas para o grupo controle não diferem das encontradas no grupo caso: 89,7% para o genótipo Arg/Arg, 10,1% para o genótipo Arg/His e 0,2% para o genótipo His/His. Com esses resultados os autores concluíram que a presença do polimorfismo Arg280His não está envolvida com a etiologia dos gliomas.

Outros polimorfismos estudados em nosso trabalho presentes no gene XRCC1 foram: Pro 206 Pro e Gln 632 Gln. Para esses polimorfismos existem pouquíssimos trabalhos na literatura. As frequências genotípicas para o polimorfismo Pro206Pro observadas em nosso trabalho para o grupo controle foram 80% A/A, 20% A/G, sendo que para o genótipo G/G não foi observado nenhum indivíduo em nossas amostras. Para o grupo caso, as frequências foram 43,8% A/A, 45% A/G e 11,2% G/G ($p < 0,001$). Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência de G foi de 0,34 entre os pacientes e 0,1 entre os controles ($p < 0,001$), sugerindo que o alelo polimórfico G está envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas. A presença do alelo G revelou que ele está associado com o risco de desenvolvimento de gliomas (OR=5,14; 95% CI= 2,66-9,95; $p < 0,001$).

Para o polimorfismo Gln632Gln as frequências genotípicas observadas em nosso trabalho para o grupo caso foram: 25% para o genótipo A/A, 25% para o genótipo A/G e 50% para o genótipo G/G. Para o grupo controle as frequências foram 93% para o genótipo A/A, 7% para o genótipo A/G e nenhum indivíduo do grupo controle apresentou o genótipo G/G. Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência alélica de G foi de 0,62% no grupo caso e de 0,03% no grupo controle. A presença do alelo G revelou que ele

está associado com o risco de desenvolvimento de gliomas (OR=39,86; 95% CI=15,88-100,0; $p<0,001$).

Yin et al (2008) analisaram a presença dos polimorfismos Pro206Pro e Gln632Gln em 55 mulheres portadoras de câncer de pulmão, mas que nunca haviam fumado e 74 controles. A presença do alelo G do polimorfismo Pro206Pro revelou um risco aumentado de 3,69 para o desenvolvimento de tumores de pulmão. Já para o polimorfismo Gln632Gln, os pesquisadores não encontraram nenhuma associação entre a presença do alelo G e a etiologia desse tipo de tumor. Em outro estudo realizado por Yin et al (2007), foram feitas análises da frequência dos polimorfismos Pro206Pro e Gln632Gln em indivíduos não portadores de câncer na população chinesa. Para o polimorfismo Pro206Pro foram analisados 291 indivíduos, nos quais as frequências genóticas foram: 79,7% para o genótipo A/A, 20,3% para o genótipo A/G e nenhum indivíduo apresentou o genótipo G/G. Para o polimorfismo Gln632Gln foram analisados 284 indivíduos, sendo que as frequências genóticas foram: 0,7% para o genótipo A/A, 22,2% para o genótipo A/G e 77,1% para o genótipo G/G. Han et al (2004) analisaram o polimorfismo Gln632Gln em 219 melanomas, 286 carcinomas de células escamosas, 300 carcinomas de células basais e 873 controles. Os resultados obtidos mostraram que não há diferenças entre as frequências genóticas entre casos e controles e que não há relação entre a presença desse polimorfismo e a etiologia desses tumores. Yin et al (2007) analisaram a frequência dos polimorfismos Pro206Pro e Gln632Gln em 247 casos de câncer de pulmão e 253 controles. Os pesquisadores concluíram que a presença do polimorfismo Gln632Gln não está associada à etiologia de câncer de pulmão. Em relação ao polimorfismo Pro206Pro os pesquisadores concluíram que a presença deste pode influenciar no desenvolvimento de câncer de pulmão.

Os genes XRCC2 (X-ray cross complementing group 2) e XRCC3 (X-ray cross complementing group 3) possuem a função de reparar danos causados na recombinação entre cromossomos homólogos (Loizidou et al., 2008; Andreassi et al., 2009). Esse reparo é um mecanismo que corrige diversos danos no DNA. O grande número de sequências repetidas pode potencialmente levar a um elevado número de interações indesejáveis entre os cromossomos. O reparo de recombinação entre os homólogos desempenha um importante papel na manutenção da integridade do genoma. Embora se saiba que as quebras de cadeias duplas são as principais indutoras de aberrações cromossômicas, os mecanismos pelos quais essas se formam estão ainda por resolver (Griffin e Thacker, 2004).

Para o polimorfismo XRCC2 Arg188His, as frequências genóticas observadas em nosso trabalho para o grupo caso foram: 13,8% para o genótipo Arg/Arg, 18,8% para o

genótipo Arg/His e 67,5% para o genótipo His/His. Para o grupo controle as frequências foram 68% para o genótipo Arg/Arg, 19% para o genótipo Arg/His e 13% para o genótipo His/His. Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência alélica de His foi de 0,77% no grupo caso e de 0,22% no grupo controle. A presença do alelo His revelou estar associado com o risco para o desenvolvimento de gliomas (OR=13,33; 95% CI=6,22-28,57; $p<0,001$).

As frequências observadas em nosso trabalho para o polimorfismo XRCC3 Thr241Met no grupo caso foram: 66,3% para o genótipo Thr/Thr, 22,5% para o genótipo Thr/Met e 11,3% para o genótipo Met/Met. Para o grupo controle, as frequências genótípicas foram: 86% para o genótipo Thr/Thr, 9% para o genótipo Thr/Met e 5% para o genótipo Met/Met. Também foram observadas diferenças entre as frequências alélicas; a frequência alélica de Met foi de 0,22% no grupo caso e de 0,09% no grupo controle. A presença do alelo Met revelou que ele está associado com o risco de desenvolvimento de gliomas (OR=3,13; 95% CI=1,50-6,50; $p=0,002$).

Yu et al (2010) analisaram as frequências do polimorfismo XRCC2 Arg188His em um estudo de meta-análises, onde 18.341 mulheres portadoras de câncer de mama e 19.028 controles foram avaliados. Os pesquisadores concluíram que a presença do alelo mutante His não estava associada com a etiologia de tumores de mama. Jiao et al (2008) analisaram a presença dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 Thr241Met em 468 pacientes com adenocarcinoma pancreático e 498 indivíduos controle. Os resultados obtidos pelos pesquisadores mostraram que não ocorreram diferenças nas frequências genótípicas entre os grupos casos e controles para ambos os polimorfismos e que estes não estão envolvidos na etiologia de adenocarcinoma gástrico.

Loizidou et al (2008) investigaram a associação dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 Thr241Met em 1.109 mulheres com câncer de mama e 1.177 controles. Os resultados obtidos para o polimorfismo XRCC2 Arg188His foram: 972 pacientes apresentaram o genótipo Arg/Arg, 135 apresentaram o genótipo Arg/His e 1 paciente apresentou o genótipo His/His, enquanto no grupo controle, 999 indivíduos apresentaram o genótipo Arg/Arg, 177 o genótipo Arg/His e 1 indivíduo apresentou o genótipo His/His. A frequência alélica do alelo His foi de 0,06% no grupo caso e de 0,08 no grupo controle. Para o polimorfismo Thr241Met presente no gene XRCC3 os resultados obtidos foram: 312 pacientes apresentaram o genótipo Thr/Thr, 560 apresentaram o genótipo Thr/Met e 220 pacientes apresentaram o genótipo Met/Met. Para o grupo controle esses resultados foram: 351 indivíduos apresentaram genótipo Thr/Thr, 600 apresentaram genótipo Thr/Met e 226

apresentaram genótipo Met/Met. A frequência do alelo Met foi de 0,46 no grupo caso e de 0,45 no grupo controle. Os pesquisadores concluíram que indivíduos que possuem o alelo His do polimorfismo XRCC2 possuem um “efeito protetor” contra o desenvolvimento de tumores de mama. Já para o polimorfismo do gene XRCC3 os pesquisadores concluíram que a presença do alelo Met não interfere na etiologia de tumores de mama.

Han et al (2004) analisaram a presença dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 Thr241Met em 220 pacientes portadores de câncer endometrial e 666 controles. Os pesquisadores concluíram que a presença dos polimorfismos estudados em mulheres não altera o risco para desenvolvimento desses tumores. Em outro estudo realizado por Brooks et al (2008), a presença dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 thr241Met foram analisadas em 612 pacientes portadoras de câncer de mama e 612 controles. As frequências genóticas dos polimorfismos obtidas entre caso e controle não apresentaram variações. Com esses resultados os autores concluíram que a presença dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 Thr241Met não estão envolvidos na etiologia dos tumores de mama.

Tranah et al (2004) estudaram 556 casos de adenoma coloretal e 557 controles. Neste trabalho os pesquisadores analisaram se a presença dos polimorfismos XRCC2 Arg188His e XRCC3 Thr241Met estavam envolvidos na etiologia desses tumores. As frequências genóticas para ambos os polimorfismos encontradas entre casos e controles foram semelhantes, ressaltando apenas que o genótipo His/His do polimorfismo XRCC2 Arg188his, não foi encontrado nem no grupo caso e nem no grupo controle. Com esses resultados os pesquisadores concluíram que esses polimorfismos não estão envolvidos na etiologia desses tumores.

Em um estudo realizado por Kiuru et al (2008), 701 amostras de gliomas e 1560 amostras controles foram analisadas para detectar a frequência do polimorfismo XRCC3 Thr241Met e se este estava envolvido na etiologia desses tumores. As frequências genóticas para o grupo caso foram: 41,1% para o genótipo Thr/Thr; 45,5% para o genótipo Thr/Met e 13,4% para o genótipo Met/Met. As frequências obtidas para o grupo controle não diferem tanto das encontradas no grupo caso: 46,6% para o genótipo Thr/Thr, 38,4% para o genótipo Thr/Met e 15% para o genótipo Met/Met. Com esses resultados, os autores concluíram que a presença do polimorfismo Thr241Met presente no gene XRCC3 não está envolvida com a etiologia dos gliomas.

Para o polimorfismo XRCC4 G1394T, as frequências genóticas observadas em nosso trabalho para o grupo caso foram: 11,3% para o genótipo G/G, 16,3% para o genótipo G/T e 72,4% para o genótipo T/T. Para o grupo controle, as frequências foram 45% para o

genótipo G/G, 33% para o genótipo G/T e 22% para o genótipo T/T. Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência alélica de T foi de 0,8% no grupo caso e de 0,38% no grupo controle. A presença do alelo T revelou estar associada com o risco para o desenvolvimento de gliomas (OR=6,45; 95% CI=2,90-14,33; p=0,001).

Bau et al (2010) analisaram a presença do polimorfismo XRCC4 G1394T em 370 pacientes tailandeses com câncer colorretal e 370 controles. Os pesquisadores observaram diferenças nas frequências genotípicas entre os grupos casos e controles. Para o grupo caso as frequências observadas foram: 0,8% para o genótipo G/G, 21,9% para o genótipo G/T e 77,3% para o genótipo T/T. No grupo controle as frequências foram: 11,9% para o genótipo G/G, 88,1% para o genótipo T/T, sendo que para o genótipo G/G nenhum indivíduo foi detectado. As frequências alélicas no grupo caso para o alelo T foram de 88,2% e no grupo controle foram de 94%; já para o alelo G a frequência no grupo caso foi de 11,8% e no grupo controle foi de 6,0%. Com os dados obtidos no trabalho os pesquisadores concluíram que a presença do alelo G do polimorfismo G1394T é um fator de risco para a etiologia de câncer colorretal.

No estudo realizado por Wu et al (2010), o polimorfismo XRCC4 G1394T foi analisado em 266 crianças com leucemia e 266 controles. O genótipo G/G não foi encontrado no grupo controle e nem no grupo caso. As frequências do genótipo G/T no grupo caso foram de 33,1% e no grupo controle foram de 20,3%; já para o genótipo T/T a frequência no grupo caso foi de 66,9% e no grupo controle foi de 79,7%. Os pesquisadores concluíram que a presença de apenas um alelo G, como no caso do genótipo G/T pode influenciar na etiologia de leucemias em crianças. Hsu et al (2009) estudaram a presença do polimorfismo XRCC4 G1394T em 164 pacientes com câncer de pulmão e 640 controles. Os pesquisadores concluíram que a presença do alelo G é um fator de risco e que portadores do genótipo G/T apresentam susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer de pulmão.

O polimorfismo XRCC4 G1394T foi estudado em 158 pacientes com câncer de bexiga e 158 controles. Os pesquisadores concluíram que a presença do genótipo G/T e do alelo G podem estar envolvidos com a etiologia de câncer de bexiga (Chang et al, 2009). Hsieh et al (2008) analisaram o polimorfismo XRCC4 G1394T em 136 pacientes com endometriose e 112 controles. As frequências genotípicas para o grupo caso foram 91,1% para o genótipo T/T, 5,2% para o genótipo T/G e 0,7% para o genótipo G/G. Para o grupo controle as frequências foram 79,4% para o genótipo T/T, 17,9% para o genótipo T/G e 2,7% para o genótipo G/G. Os pesquisadores concluíram que a presença do polimorfismo XRCC4G1394T pode estar associada com a susceptibilidade de endometrioses.

Em outro estudo realizado por Hsieh et al (2008), o polimorfismo XRCC4 G1394T foi analisado em 120 pacientes com leiomioma e 112 controles. As frequências genóticas obtidas para o grupo caso foram: 91,7% para o genótipo T/T, 6,7% para o genótipo G/T e 1,7% para o genótipo G/G; sendo a frequência do alelo T 95% e 5% para o alelo G. Já no grupo controle as frequências foram de 79,4% para o genótipo T/T, 17,9% para o genótipo G/T e 2,7% para o genótipo G/G enquanto que as frequências para o alelo T foram de 88,4% e para o alelo G 11,6%. Os pesquisadores concluíram que o polimorfismo 1394T presente no gene XRCC4 está associado com alta susceptibilidade para o desenvolvimento de leiomioma. Chiu et al (2008) analisaram o polimorfismo G1394T do gene XRCC4 em 636 casos de câncer oral e 636 controles. O genótipo G/G não foi detectado entre os grupos caso e controle; as frequências para o genótipo T/T no grupo caso e controle foram de 91,5% e 94% respectivamente enquanto que para o genótipo G/T essas frequências foram de 8,5 no grupo caso e 6% no grupo controle. Com esses resultados os autores concluíram que o polimorfismo G1394T do gene XRCC4 não está envolvido na etiologia de câncer oral.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste trabalho pudemos concluir que apenas o polimorfismo Arg399Gln presente no gene XRCC1 não apresentou nenhuma associação e/ou progressão com os tumores gliais do sistema nervoso.

Analizando os polimorfismos XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Gln 632 Gln, pudemos perceber que a presença das variantes polimórficas Trp194, Pro206 (alelo A), His280 e Gln632 (alelo G) está relacionada com a ocorrência de tumores gliais e que a presença dessas variantes aumenta o risco desses tumores. A presença do alelo Trp194 na população estudada aumentou o risco de câncer em quase 9 vezes entre seus portadores. Para o alelo A Pro206 o risco de câncer na população estudada foi de 5 vezes entre seus portadores. Em relação ao alelo His280 o risco de câncer foi de quase 5 vezes, enquanto que a presença do alelo G Gln632 foi de 39,86 vezes, sendo este o maior risco apresentado nos portadores de gliomas em nosso trabalho.

Em relação ao gene GSTP-1, concluímos que o alelo Val105 foi mais freqüente entre os indivíduos com câncer e que a presença desse alelo na população estudada aumentou o risco de câncer em quase 9 vezes entre seus portadores.

A freqüência do genótipo selvagem G/G do polimorfismo EGF+61 foi maior nos pacientes (principalmente entre os portadores de astrocitomas) do que no grupo controle e a presença desse alelo pode influenciar no risco de desenvolvimento de astrocitomas e glioblastomas nos indivíduos estudados.

Para o polimorfismo Arg188His presente no gene XRCC2 pudemos concluir que a presença do alelo His188 na população estudada revelou um aumento para o risco de câncer de 13 vezes entre seus portadores.

Em relação ao gene XRCC3, concluímos que o alelo Met241 foi mais freqüente nos indivíduos com câncer e que a presença desse alelo na população estudada aumentou o risco de câncer em 3 vezes entre seus portadores.

Para o polimorfismo G1394T presente no gene XRCC4 podemos concluir que a presença do alelo T1394 na população estudada revelou um aumento para o risco de câncer de 6 vezes para seus portadores.

Não foram verificadas associações significativas entre as freqüências genotípicas e os graus de tumor (alto ou baixo), ou seja, a distribuição dos genótipos dos 10 SNPs avaliados foi independente do grau tumoral apresentado pelos pacientes. Uma associação marginal,

contudo, foi observada entre o polimorfismo de XRCC3 Thr241Met e os graus tumorais quando se adotou um modelo genético dominante ($p=0,056$).

Também não foram verificadas associações significativas entre as frequências genotípicas e a idade, ou seja, a distribuição dos genótipos dos 10 SNPs avaliados foi independente da faixa etária dos pacientes.

Para as frequências genotípicas e o sexo não foram verificadas associações significativas entre a distribuição dos genótipos dos 10 SNPs avaliados; essas frequências se deram de forma independente do sexo dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON N DG, COLLINS C, MCCORMICK F, GRAY JW. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nature Genetics**. 2003, 34(4):369-76.

ALBERTS BJA, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER R. Molecular Biology on the Cell. New York: **Garland Science**, 2002.

ALMEIDA LO, CUSTÓDIO AC, SANTOS MJ, ALMEIDA JRW, CLARA CA, PINTO GR, REY JA, CASARTELLI C. The A61 G EGF polymorphism is associated with development of extraaxial nervous system tumors but not with overall survival. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. 2010, 198:15-21.

ALONSO ME, BELLO MJ, ARJONA D, GONZALEZ-GOMEZ P, LOMAS J, DE CAMPOS JM, KUSAK ME, ISLA A, REY JA. Analysis of the NF2 gene in oligodendrogliomas and ependymomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 2002, 134(1):1-5.

ALSHAIL E, RUTKA JT, BECKER LE, HOFFMAN HJ. Optic chiasmatic-hypothalamic glioma. **Brain Pathol**. 1997, 7(2):799-806.

ANDREASSI MG, FOFFA I, MANFREDI S BOTTO N, CIOPPA A, PICNO E. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **Mutation Research**. 2009, 666:57-63.

ARAÚJO A, RIBEIRO R, AZEVEDO I, COELHO A, SOARES M, SOUSA B, PINTO D, LOPES C, MEDEIROS R, SCAGLIOTTI VG. Genetics Polymorphisms of the Epidermal Growth Factor and Related Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer – A review of the literature. **The Oncologist**. 2007, 12:201-210.

AU WW, SALAMA SA, SIERRA-TORRES CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environ Health Perspect**. 2003, 111(15):1843-850.

BAU DT, YANG MD, TSOU YA, LIN SS, WU CN, HSIEH HH, WANG RF, TSAI CW, CHANG WS, HSIEH HM, SUN SS, TSAI RY. Colorectal cancer and genetic polymorphism of DNA double-strand break repair gene XRCC4 in Taiwan. **Anticancer Research**. 2010, 7:2727-30

BARTEK J, LUKAS J. Are all cancer genes equal? **Nature**. 2001, 411(6841):1001-2000.

BATAR B, GUVEN M, ONARAN I, TUTLUOGLU B, KANIGUR-SULTUYBEK G. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and the risk of asthma in a Turkish population. **Allergy Asthma Proceedings**. 2010, 31(4):349-54.

BHOWMICK DA, ZHUANG Z, WAIT SD, WEIL RJ. A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. **Cancer Research**. 2004, 64(4):1220-3.

BIGNER SH, MCLENDON RE, FUCHS H, MCKEEVER PE, FRIEDMAN HS. Chromosomal characteristics of childhood brain tumors. **Cancer Genet Cytogenet**. 1997, 97(2):125-34.

BISHOP DK, EAR U, BHATTACHARYYA A, CALDERONE C, BECKETT M, WEICHSELBAUM RR, SHINOHARA A. XRCC3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. **Journal Biological Chemistry**. 1998, 273:21482-21488.

BRENNEMAN MA, WEISS AE, NICKOLOFF JA, CHEN DJ. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. **Mutat Research**. 2000, 459:89-97.

BROOKS J, SHORE R E, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, CURRIE D, AFANASYEVA Y, KOENING KL, ARSLAN A A, TONIOLO P, WIRGIN I. Polymorphisms in RAD51, XRCC2, and XRCC3 are not related to breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarker Prev**. 2008, 17(4):1016-1019.

BROOKES AJ. The essence of SNPs. **Gene**. 1999, 234,2:177-186.

BUCKNER JC, BROWN PD, O'NEILL BP, MEYER FB, WETMORE CJ, UHM JH. Central nervous system tumors. **Mayo Clinic Proceedings**. 2007, 82(10):1271-1786.

CAIRNCROSS JG, UEKI K, ZLATESCU MC, LISLE DK, FINKELSTEIN DM, HAMMOND RR, SILVER JS, STARK PC, MACDONALD DR, INO Y, RAMSAY DA, LOUIS DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. **Journal of the National Cancer Institute**. 1998, 90(19):1473-1479.

CALDECOTT KW. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair (Amst)**. 2003, 2(9):955-69.

CAMPISI J. Suppressing cancer: The importance of being senescent. **Science**. 2005, 309(5736):886-887.

CHAKRAVARTI A, DELANEY MA, NOLL E, BLACK PM, LOEFFLER JS, MUZIKANSKY A, DYSON NJ. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. **Clinical Cancer Research**. 2001, 7(8):2387-2395.

CHANG CH, CHANG CL, TSAI CW, WU HC, CHIU CF, WANG RF, LIU CS, LIN CC, BAU DT. Significant association of an XRCC4 single nucleotide polymorphism with bladder cancer susceptibility in Taiwan. **Anticancer Research**. 2009, 29(5):1777-82.

CHENG J, BAO S, RICH JN. Potential Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells in Glioblastoma. **Biochem Pharmacol**, 2010.

CHIU CF, TSAI MH, TSENG HC, WANG CL, WANG CH, WU CN, LIN CC, BAU DT. A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients. **Oral Oncology**. 2008, 44: 898–902

COLLINS VP. Brain tumours: classification and genes. **Journal Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2004, 75(2):2-11.

CORNETTA T, FESTA F, TESTA A, COZZI R. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. 2006, 22(2):537-545.

COSTA S, PINTO D, PEREIRA D, RODRIGUES H, CAMESELLE-TEIJEIRO J, MEDEIROS R, SCHMITT F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. **BMC Cancer**. 2008, 8:32.

COSTA BM, FERREIRA P, COSTA S, CANEDO P, OLIVEIRA P, SILVA A, PARDAL F, SURIANO G, MACHADO JC, LOPES JM, REIS RM. Association between functional EGF + 61 polymorphism and glioma risk. **Clinical Cancer Research**. 2007, 13:2621-2626.

COUTINHO P, SANDIM V, OLIVEIRA JA, ALVES G, HATAGIMA A. Lack of association between glutathione S-transferase polymorphisms and primary glioma in a case-control study in Rio de Janeiro. **Genetics and Molecular Research**. 2010, 9(1):539-544.

CSEJTEI A, TIBOLD A, KOLTAI K, VARGA Z, SZANYI I, GOBEL G, PRANTNER I, STEFFLER D, FEHER GY, BLASIO AD, EMBER I, KISS I. Association between XRCC1 Polymorphisms and Head and Neck Cancer in a Hungarian Population. **Anticancer Research**. 2009, 29: 4169-4174.

CURRAN JE, LEA RA, RUTHERFORD S, WEINSTEIN SR, GRIFFITHS LR. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. **International Journal Cancer**. 2001, 95(4):271-5.

CUSTÓDIO A, CALLES A, PÉREZ-SEGURA P. Response to erlotinib in recurrent glioblastoma multiforme showing coexpression of EGFRvIII and PTEN. **Clinical Translational Oncology**. 2010, 12(4):310-314.

DALY MJ, RIOUX JD, SCHAFFNER SF, HUDSON TJ, LANDER ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. **Nature Genetics**. 2001, 29(2):229-32.

DE BONT R, VAN LAREBEKE N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**. 2004,19(3):169-85.

DUBUC AM, NORTHCOTT PA, MACK S, WITT H, PFISTER S, TAYLOR MD. The genetics of pediatric brain tumors. **Current Neurology Neuroscience Reports**. 2010, 10(3):215-223.

EBERT C, VON HAKEN M, MEYER-PUTTLITZ B, WIESTLER OD, REIFENBERGER G, PIETSCH T, VON DEIMLING A .Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. **American Journal Pathology**. 1999, 155(2):627-32.

EZER R, ALONSO M, PEREIRA E, KIM M, ALLEN CJ, MILLER CD, NEWCOMBR EW. Identification of glutathione S-transferase (GST) polymorphisms in brain tumors and association with susceptibility to pediatric astrocytomas. **Journal of Neuro-Oncology**. 2002, 59:123-34.

FEINBERG AP, OHLSSON R, HENIKOFF S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Rev Genetics**. 2006,7(1):21-33.

GABRIEL SB, SCHAFFNER SF, NGUYEN H, MOORE JM, ROY J, BLUMENSTIEL B, HIGGINS J, DEFELICE M, LOCHNER A, FAGGART M, LIU-CORDERO SN, ROTIMI C, ADEYEMO A, COOPER R, WARD R, LANDER ES, DALY MJ, ALTSHULER D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**. 2002, 296 (5576):2225-2229.

GAO Y, PAN X, SU T, MO Z, CAO W, GAO F. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis and HuGE review. **European Journal of Cancer**. 2009, 3003-3014.

GAO LB, WEI YS, ZHOU B, WANG YY, LIANG WB, LI C, LI Y, BAI P, FANG WL, XUE H, ZHANG L. No association between epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 2008, 185(2):69-73.

GENG J, ZHANG YW, HUANG GC, CHEN LB. XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and gastric cancer risk: A meta-analysis. **World Journal Gastroenterology**. 2008,14(43): 6733-6737.

GOODE EL, ULRICH CM, POTTER JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Epidemiol Biomarkers Prevention**. 2002, 11(12):1513-530.

GRIFFIN CS, THACKER J. The role of homologous recombination repair in the formation of chromosome aberrations. **Cytogenetics Genome Research**. 2004, 104:21-27.

GUTMANN DH, DONAHOE J, BROWN T, JAMES CD, PERRY A .Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. **Neuropathol Applied Neurobiology**. 2000, 26(4):361-7.

HAN J, HANKINSON SE, COLDITZ GA, HUNTER DJ. Genetic variation in XRCC1, sun exposure, and risk of skin cancer. **British Journal of Cancer**. 2004, 91:1604 – 1609

HAN J, HANKINSON SE, HUNTER DJ, DE VIVO I. Genetic variations in XRCC2 and XRCC3 are not associated with endometrial cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 2004, 13:330-331.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell**. 2000, 100(1):57-70.

HARARI MP, ALLEN WG, BONNER AJ. Biology of interactions: Antiepidermal Growth Factor Receptor Agents. **Journal of Clinical Oncology**. 2007, 25(26):4057-4065.

HARRIES LW, STUBBINS MJ, FORMAN D, HOWARD GCW, WOLF CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis**. 1997, 18(4):641-644.

HARTMANN C, MUELLER W, VON DEIMLING A. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. **Journal Molecular Medicine**. 2004, 82(10):638-55.

HIYAMA T, YOSHIHARA M, TANAKA S, CHAYAMA K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). **International Journal of Oncology**. 2008, 32: 945-973.

HIRAI M, SUZUKI S, HINOKIO Y, YAMADA T, YOSHIKUNI S, SUZUKI C, SATOH J, OKA Y. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research Clinical Practice**. 2005, 69(3):287-292.

HSIEH YY, BAU T, CHANG CC, TSAI CH, CHEN CP, TSAI FJ. XRCC4 codon 247*A and XRCC4 promoter – 1394*T related genotypes but not XRCC4 intron 3 gene polymorphism are associated with higher susceptibility for endometriosis. **Molecular Reproduction and Development**. 2008, 75:946-951.

HSIEH YY, CHANG CC, BAU DT, YEH LS, TSAI FJ, TSAI CH. X-ray repair cross-complementing group 4 (XRCC4) promoter – 1394 T – related genotype, but not XRCC4 codon 247/intron 3 or xeroderma pigmentosum group D codon 312, 751/ promoter – 114, polymorphisms are correlated with higher susceptibility to myoma. **Fertility and Sterility**. 2008, 90:1417-1423.

HSU NY, WANG HC, WANG CH, CHANG CL, CHIU CF, LEE HZ, TSAI CW, BAU DT. Lung cancer susceptibility and genetic polymorphism of DNA repair gene XRCC4 in Taiwan. **Cancer Biomark**. 2009, 5(4):159-65.

HU Z, MA H, CHEN E, WEI Q, SHEN H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**. 2005, 14(7):1810-1818.

HUANG H, COLELLA S, KURRER M, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. **Cancer Research**. 2000, 60: 6868-74.

HUNG RJ, BRENNAN P, CAZIAN F, SZESZENIA-DABROWSKA N, ZARIDZE D, LISSOWSKA J, RUDNAI P, FABIANOVA E, MATES D, FORETOVA L, JANOUT V, BENCKO V, CHABRIER A, BOREL S, HALL J, BOFFETTA P. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. **Journal National Cancer Institute**. 2005, 97(8):567-76.

IARMACOVAI G, BONSAÍ S, BOTTA A, BAAN RA, ORSIERE T. Genetic Polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**. 2008, 658: 215-233.

ICHIMURA K, OHGAKI H, KLEIHUES P, COLLINS VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. **Journal Neurooncology**. 2004, 70(2):137-60.

INO Y, BETENSKY RA, ZLATESCU MC, SASAKI H, MACDONALD DR, STEMMER-RACHAMIMOV AO, RAMSAY DA, CAIRNCROSS JG, LOUIS DN. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. **Clinical Cancer Research**. 2001, 7(4):839-845.

JACOBSEN NR, RAASCHOU-NIELSEN O, NEXØ B, WALLIN H, OVERVAD K, TJØNNELAND A, VOGEL U. XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. **Cancer Lett**. 2004, 213:67-72.

JAMES CD, HE J, CARLBOM E, MIKKELSEN T, RIDDERHEIM PA, CAVENEE WK, COLLINS VP. Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. **Genes Chromosomes Cancer**. 1990, 2(2):94-102.

JEFFREYS AJ, KAUPPI L, NEUMANN R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. **Nature Genetics**. 2001, 29(2):217-22.

JELONEK K, GDOWICZ-KOSOK A, PIETROWSKA M, BORKOWSKA M, KORFANTY J, RZESZOWSKA-WOLNY J, WIDAK P. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. **Journal Applied Genetics**. 2010, 51(3):343-352.

JENKINS RB, KIMMEL DW, MOERTEL CA, SCHULTZ CG, SCHEITHAUER BW, KELLY PJ, DEWALD GW. A cytogenetic study of 53 human gliomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 1989, 39(2):253-279.

JIAO L, HASSAN MM, BONDY ML, WOLFF RA, EVANS DB, ABBRUZZESE JL, LI D. XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. **American Journal Gastroenterology**. 2008, 103:360-367.

KABESCH M, HOEFLER C, CARR D. ET AL. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. **Thorax**. 2004, 59(7):569-5773.

KADOURI L, KOTE-JARAI Z, HUBERT A, BARAS M, ABELIOVICH D, HAMBURGER T, PERETZ T, EELES RA. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. **Br J Cancer**. 2008, 98(12):2006-10.

KANG S, KIM JS, PARK NH, SONG YS, PARK SY, KANG SB, LEE HP. Epidermal growth factor 61 A/G polymorphism and uterine cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**. 2007, 17(2):492-496.

KARRAN P. DNA double strand break repair in mammalian cells. **Curr Opin Genet Dev**. 2000, 10:144-150.

KAWABATA M, TERUYUKI K, NISHIBORI M. Role of recA/Rad51 Family proteins in mammals. **Acta Med. Okayama**. 2005, 59(1):1-9.

KIRK BW, FEINSOD M, FAVIS R, KLIMAN RM, BARANY F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. **Nucleic Acids Res**. 2002, 30(15):3295-311.

KIURU A, LINDHOLM C, HEINÄVAARA S, ILUS T, JOKINEN P, HAAPASALO H, SALMINEN T, CHRISTENSEN HC, FEYCHTING M, JOHANSEN C, LÖNN S, MALMER B, SCHOEMAKER MJ, SWERDLOW AJ, AUVINEN A. XRCC1 and XRCC3 variants and risk of glioma and meningioma. **J Neurooncol.** 2008, 88:135–142.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathol.** 1993, 3(3):255-68.

KLEIHUES P, LOUIS DN, SCHEITHAUER BW, ET AL. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2002, 61(3):215-225.

KLUWE L, HAGEL C, TATAGIBA M, THOMAS S, STAVROU D, OSTERTAG H, VON DEIMLING A, MAUTNER VF. Loss of NF1 alleles distinguish sporadic from NF1-associated pilocytic astrocytomas. **Journal Neuropathology Experimental Neurology.** 2001, 60(9):917-20.

KORSHUNOV A, SYCHEVA R, GOLANOV A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. **Cancer.** 2005, 104:825-832.

KOVAR FM, THALLINGER C, MARSIK CL, PARKMANN T, PUHALLA H, HASLACHER H, WRBA F, WAGNER OF, GRUENBERGER T, ENDLER G. The EGF 61A/G polymorphism – a predictive marker for recurrence of liver metastases from colorectal cancer. **Wien Klin Wochenschr.** 2009, 121: 638–643.

KRAWCZAK M, REISS J, COOPER DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Human Genetics.** 1992, 90(1-2):41-54.

KRUPP W, GEIGER K, SCHOLDER R, SIEGERT G, FROSTER UG. Cytogenetic and molecular cytogenetic analyses in diffuse astrocytomas. **Cancer Genetics Cytogenetics.** 2004, 153: 32-8.

LADIGES WC. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. **Oncogene.** 2006, 25:1612-1619.

LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, ET AL. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature.** 2001, 409(6822):860-921.

LAURENCE DJ, GUSTERSON BA. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. **Tumour Biol.** 1990, 11(5):229-261.

LAZAR LM, BLUM M. Regional distribution and developmental expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α mRNA in mouse brain by a quantitative nuclease protection assay. **Journal Neuroscience**. 1992, 12(5):1688-1697.

LI H, HA TC, TAI BC. XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: A meta-analysis. **The Breast**. 2009, 18:183-191.

LIN RC, WANG XL, DALZIEL B, Caterson ID, Morris BJ. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. **Obesity Research**. 2003, 11(6):802-808.

LISTERNICK R, CHARROW J, GUTMANN DH. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. **American Journal Medicine Genetics**. 1999, 89(1):38-44.

LIU L, YUANG P, LIU L, WU C, ZHANG X, GUO H, ZHONG R, XU Y, WU J, DUAN S, RUI R, WU T, NIE S, MIAO X, LIN D. A functional 277T>C polymorphism in XRCC1 is associated with risk of breast cancer. **Breast Cancer Research Treat**. 2010, DOI10.1007/s10549-010-0959-z.

LOEB LA, BIELAS JH, BECKMAN RA. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. **Cancer Research**. 2008, 68(10):3551-3557.

LOIZIDOU MA, MICHAEL T, NEUHAUSEN SL, NEWBOLD RF, MARCOU Y, KAKOURI E, DANIEL M, PEPADOPOULOS P, MALAS S, KYRIACOU K, HADJISAVVAS A. Genetic polymorphism in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. **Breast Cancer Research Treat**. 2008, 112:575-579.

LOUIS DN, POMEROY SL, CAIRNCROSS JG. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer Cell**. 2002, 1(2):125-128.

LOURO DI, LLERENA JRJ, MELO MSV, ASHTON-PROLLA P, CONFORTI-FROES N. Genética Molecular do Câncer. **MSG Produção Editorial**. 2002, 2º Edição.

LU S, WANG Z, CUI D, LIU H, HAO X. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 34,658 subjects. **Breast Cancer Research Treat**. 2010, DOI 10.1007/s10549-010-0969-x.

MAHANEY BL, MEEK K, LEES-MILLER SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. **Biochemical Journal**. 2009, 417: 639–650.

MANUGUERRA M, SALETTA F, KARAGAS MR, BERWICK M, VEGLIA F, VINEIS P, MATULLO G. XRCC3 and XPD/ERCC2 Single Nucleotide Polymorphisms and the Risk of Cancer: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**. 2006, 164: 297–302.

MAREEL M, LEROY A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiology Review**. 2003, 83:337-376.

MATULLO G, PALLI D, PELUSO M, GUARRERA S, CARTURAN S, CELENTANO E, KROGH, V, MUNNIA A, TUMINO R, POLIDORO S, PIAZZA A, VINEIS P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. **Carcinogenesis**. 2001, 22:1437-1445.

MCCORMACK BM, MILLER DC, BUDZILOVICH GN, VOORHEES GJ, RANSOHOFF J. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults--1977-1988. **Neurosurgery**. 1992, 31(4):636-42.

MCLEISH S, TURNER SW. Gene environment interactions in asthma. **Archives Disease Childhood**. 2007, 92:1032-1035.

MEZA-ESPINOZ JP, PERALTA-LEAL V, GUTIERREZ-ANGULO M, MACIA-GOMES N, AYALA-MADRIGAL ML, BARROS-NUÑEZ, DURAN-GONZALEZ J, LEAL-UGARTE E. XRCC1 polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia. **Genetics Molecular Research**. 2009, 8 (4): 1451-1458.

MILLER MP. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. **Computer software distributed by author**, 1997.

MILLER RD, KWOK PY. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. **Human Molecular Genetics**. 2001, 10(20):2195-2198.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA A SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO A VIGILÂNCIA (COMPREV). Atlas de Mortalidade por câncer no Brasil – 1979-1999. Rio de Janeiro: INCA. 2002, p.412. Os dados dessa publicação estão disponíveis no site <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 10/05/2010.

MILLIKAN R, PITTMAN G, TSE CK, SAVITZ DA, NEWMAN B, BELL D. Glutathione S-transferases M1, T1 and P1 and breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**. 2000, 9:567-573.

MOULLAN N, COX DG, ANGELE S, ROMESTING P, GERARD JP, HALL J. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. 2003, 12:1168-1174.

MOULDER SL, YAKES FM, MUTHUSWAMY SK, BIANCO R, SIMPSON JF, ARTEAGA CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**. 2001, 61(24):8887-95.

MORALES E, SUNYER J, CASTRO-GINER F, ESTIVILL X, JULVEZ J, RIBAS-FITO N, TORRENT M, GRIMALT JO, DE CID R. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on cognitive functioning effects induced by p,p'-DDT among preschoolers. **Environmental Health Perspectives**. 2008, 116(11):1581-5.

MOYER AM, SALAVAGGIONE OE, WU TY, MOON I, ECKLOFF BW, HILDEBRANDT MA, SCHAID DJ, WIEBEN ED, WEINSHILBOUM RM. Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomics studies. **Cancer Research**. 2008, 68(12):4791-801.

OHGAKI H. Epidemiology of brain tumors. **Methods Molecular Biology**. 2009, 472:323-42.

OHGAKI, H. Genetic pathways to glioblastomas. **Neuropathology**. 2005, 25(1):1-7.

OHGAKI H, KLEIHUES P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathology**. 2005, 109(1):93-108.

OKEU MF, SELVAN M, WANG LE, STOUT L, ERANA R, AIREWELE G, ADATTO P, HESS K, OSMAN FA, GROVES M, YUNG AWK, LEVIN VA, WEI Q, BONDY M. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma. **Clinical Cancer Research**. 2004, 10:2618-2625.

OLD JM, HIGGS DR. Gene Analysis. In: D. J. Weatherall (Ed.). The Thalassemias: Methods in Hematology. Scotland: Churchill Livingstone. **Gene Analysis**. 1993, 74-102.

OSAWA K. Gene Polymorphisms and Chemotherapy in Non-small Cell Lung Cancer. **Chin J Lung Cancer**. 2009, 12: 837-840.

PAIGE AJ. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. **Cell Molecular Life Science**. 2003, 60(10):2147-2163.

PATIL N, BERNO AJ, HINDS DA, BARRETT WA, DOSHI JM, HACKER CR, KAUTZER CR, LEE DH, MARJORIBANKS C, MCDONOUGH DP, NGUYEN BT, NORRIS MC, SHEEHAN JB, SHEN N, STERN D, STOKOWSKI RP, THOMAS DJ, TRULSON MO, VYAS KR, FRAZER KA, FODOR SP, COX DR. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. **Science**. 2001, 294(5547):1719-1723.

PATT S, GRIES H, GIRALDO M, CERVOS-NAVARRO J, MARTIN H, JÄNISCH W, BROCKMÖLLER J. P53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. **Human Pathology**. 1996, 27(6):586-589.

PHELAN CM, LIU L, RUTTLEDGE MH, MÜNTZNING K, RIDDERHEIM PA, COLLINS VP. Chromosome 17 abnormalities and lack of TP53 mutations in paediatric central nervous system tumours. **Human Genetics**. 1995, 96(6):684-690.

PHILLIPS MS, LAWRENCE R, SACHIDANANDAM R, ET AL. Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. **Nature Genetics**. 2003, 33(3):382-387.

PRADOS MD, BERGER MS, WILSON CB. Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. **CA Cancer Journal Clinical**. 1998, 48(6):331-360.

PUTTONEN S, KELTIKANGAS-JARVINEN L, ELOVAINIO M, KIVIMAKI M, RONTU R, LEHTIMAKI T. Temperamental activity and epidermal growth factor A61G polymorphism in Finnish adults. **Neurophysiology**. 2008, 56(4):208-212.

RESZKA E, WASOWICZ W, GROMADZINSKA J. Antioxidant defense markers modulated by glutathione S-transferase genetic polymorphism: results of lung cancer case-control study. **Genes Nutrition**. 2007, 2(3):287-94.

REICH DE, CARGILL M, BOLK S, IRELAND J, SABETI PC, RICHTER DJ, LAVERY T, KOUYOUJIAN R, FARHADIAN SF, WARD R, LANDER ES. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature**. 2001, 411(6834):199-204.

REIFENBERGER G, COLLINS VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **Journal Molecular Medicine**. 2004, 82:656-70.

RICK JN, HANS C, JONES B, IVERSEN ES, MCLENDON RE, RASHEED BKA, DOBRA A, DRESSMAN HK, BIGNER DD, NEVINS JR, WEST M. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. **Cancer Research**. 2005, 65(10):4051-4058.

RICHARDSON B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Research Review**. 2003, 2(3):245-261.

RIEMENSCHNEIDER MJ, JEUKEN JWM, WESSELING P, REIFENBERGER G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. **Acta Neuropathol**. DOI 10.1007/s00401-010-0736-4.

RIEMENSCHNEIDER MJ, REIFENBERGER G. Molecular neuropathology of gliomas. **International Journal Molecular Science**. 2009, 10:184-212.

ROOS AJD, ROTHMAN N, INSKIP PD, LINET MS, SHAPIRO WR, SELKER RG, FINE HA, BLACK PM, PITTMAN GS, BELL DA. Genetic polymorphisms in GSTM1, P1, T1, AND CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 2003, 12:14-22.

RYBERG D, SKAUG V, HEWER A, PHILLIPS DH, HARRIES LW, WOLF CR, OGREID D, ULVIK A, VU P, HAUGEN A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. **Carcinogenesis**. 1997, 18(7):1285-1289.

SACHIDANANDAM R, WEISSMAN D, SCHMIDT SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**. 2001, 409(6822):928-933.

SANKARANARAYANAN K. Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: current status and emerging perspectives. **Journal Radiation Research**. 2006, 47:57-66.

SANOUDOU D, TINGBY O, FERGUSON-SMITH MA, COLLINS VP, COLEMAN N. Analysis of pilocytic astrocytoma by comparative genomic hybridization. **British Journal Cancer**. 2000, 82(6):1218-1222.

SAXENA A, DHILLON VS, RAISH M, ASIM M, REHMAN S, SHUKLA NK, DEO SV, ARA A, HUSAIN SA. Detection and relevance of germline genetic polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTs) in breast cancer patients from northern Indian population. **Breast Cancer Research Treatment**. 2008, 24.

SHAHBASI M, PRAVICA V, NASREEN N, FAKHOURY H, FRYER AA, STRANGE RC, HUTCHINSON PE, OSBORNE JE, LEAR JT, SMITH AG, HUTCHINSON I. V. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. **Lancet**. 2002, 359(9304):397-401.

SCHEIE D, ANDRESEN PA, CVANCAROVA M, ET AL. Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendrogial tumors. **American Journal Surgery Pathology**. 2006, 30:828-37.

SCHMITT HP. Rapid anaplastic transformation in gliomas of adulthood: selection in neuro oncogenesis. **Pathology Research Practice**. 1983, (176):313-323.

SCHWARTZBAUM JA, AHLBOM A, LONN S, WARHOLM M, RANNUG A, AUVINEN A, CHRISTENSEN HC, HENRIKSSON R, JOHANSEN C, LINDHOLM C, MALMER B, SALMINEN T, SCHOEMAKER MJ, SWERDLOW AJ, FEYCHTING M. An international case-control study of glutathione transferase and functionally related polymorphisms and risk of primary adult brain tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2007, 16(3):559-65.

SIMPSON JR, HORTON J, SCOTT C, ET AL. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. **International Journal Radiation Oncology Biology Physics.** 1993, 26(2):239-244.

SINGH M, SHAH PP, SINGH AP, RUWALI M, MATHUR N, PANT MC, PARMAR D. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. **Mutation Research.** 2008, 638:184-194.

SMITH TR, MILLER MS, LOHMAN K, LANGE EM, CASE LD, MOHRENWEISER HW, HU JJ. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. **Cancer Letters.** 2003, 190:183-190.

SREEJA L, SYAMALA SV, SYAMALA V, HARIHARAN S, RAVEENDRAN PB, VIJAYALEKSHMI RV, MADHAVAN J, ANKATHIL R. Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India. **Journal Cancer Research Clinical Oncology.** 2007, DOI 10.1007/s00432-007-0328-4.

SUGIMURA T, USHIJIMA T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. **Mutant Research.** 2000, 462(2-3):235-246.

SUH Y, VIJG J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutant Research.** 2005, 573(1-2):41-53.

STERPONE S, COZZI R. Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids.** 2010,doi:10.4061/2010/780369.

SYAMALA VS, SREEJA L, SYAMALA V, RAVEENDRAN PB, BALAKRISHNAN R, KUTTAN R, ANKATHIL R. Influence of germline polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in familial versus breast cancer susceptibility and survival. **Familial Cancer**, 2007 (Imprint).

TAE K, LEE IS, PARK BJ, PARK CW, KIM KR, CHO IY, KIM LI, PARK BL, SHIN HD. Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. **International Journal Cancer** 2004, 111:805-808.

TAMURA K, SUZUKI M, ARAKAWA H, TOKUYAMA K, MORIKAWA A. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. **International Archives Allergy Immunology**. 2003, 131(1):33-38.

TAKANAMI T, NAKAMURA J, KUBOTA Y, HORIUCHI S. The Arg280His polymorphism in X-ray repair cross-complementing gene 1 impairs DNA repair ability. **Mutant Research**. 2005, 582(1-2):135-145.

TAYLOR EM, LEHMANN AR. Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms. **International Journal Radiation Biology**. 1998, 74(3):277-286.

TAYLOR JG, CHOI EH, FOSTER CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. **Trends Molecular Medicine**. 2001,7(11):507-512.

TEBBS RS, ZHAO Y, TUCKER JD, SCHEERER JB, SICILIANO MJ, HWANG M, LIU N, LEGERSKI RJ, THOMPSON LH. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. **Proceedings National Academy Science USA**. 1995;92:6354-6358.

TEWS B, FELSBURG J, HARTMANN C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifemberger G, Lichter P. Identification of novel oligodendroglioma associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. **International Journal Cancer**. 2006, 119: 792-800.

THACKER J, ZDZIEBICKA MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. **DNA Repair**. 2004, 3:1081-1090.

THACHER J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. **Cancer Letters**. 2005, 219:125-135.

THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. **Nature Rev**. 2002, 2:442-454.

TRANAH G J, GIOVANNUCCI E, MA J, FUNCHS C, HANKINSON S E, HUNTER D J. XRCC2 and XRCC3 polymorphisms are not associated with risk of colorectal adenoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2004, 13(6):1090-1091.

UPADHYAY R, JAIN M, KUMAR S, GHOSHAL UC, MITTAL B. Interaction of EGFR 497Arg>Lys with EGF +61A>G polymorphism: modulation of risk in esophageal cancer. **Oncology Research**. 2008, 17(4):167-74.

URIOSTE M, MARTINEZ-RAMIREZ A, CIGUDOSA JC, COLMENERO I, MADERO L, ROBLEDO M, MARTÍNEZ-DELGADO B, BENÍTEZ J. Complex cytogenetic abnormalities including telomeric associations and MEN1 mutation in a pediatric ependymoma. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 2002, 138(2):107-110.

VAULEON E, AUGER N, AMIEL AB, DONADEY FL, KALOSHI G, LEJEUNE J, DELATTRE JY, THILLET J, SANSON M. The 61 A/G EGF polymorphism is functional but is neither a prognostic marker nor a risk factor for glioblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. 2007, 172:33-37.

VISHNOI M, PANDEY SM, MODI DR, KUMAR A, MITTAL B. Genetic susceptibility of epidermal growth factor $\beta 1$ 509C>T gene polymorphisms with gallbladder cancer. **Human Immunology**. 2008, 69:360-367.

WAN J, SANCHEZ DD. Antioxidant enzyme induction: A new protective approach against the adverse effects of diesel exhaust particles. **Inhalation Toxicology**. 2007, 19(1):177-82.

WANG C, SUN Y, HAN R. XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: A meta-analysis. **Oncology**. 2008, DOI:10.1016/j.urology.2007.12.059.

WANG N, DONG XJ, ZHOU RM, GUO W, ZHANG XJ, LI Y. An investigation on the polymorphisms of two Dna repair genes and susceptibility to ESCC and GCA of high-incidence region in northern China. **Molecular Biology Rep**. 2009, 36:357-364.

WANG B, WANG D, HUANG G, ZHANG C, XU D, ZHOU W. XRCC1 polymorphisms and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. **International Journal Colorectal Diseases**. 2010; 25:313–321.

WANG M, WIN C, ZHU J, YUAN L, FU G, ZHANG Z, YIN C. Genetic Variants of XRCC1, APE1, and ADPRT Genes and Risk of Bladder Cancer. **Dna and Cell Biology**. 2010, 29(6):303-311.

WANG S, ZHAO Y, RUAN Z, CHEN H, FAN W, CHEN J, WU Q, QIAN J, ZHANG T, HUANG Y, LU D. Association between EGF +61 G/A and glioma risk in a Chinese population. **BMC Cancer**. 2010, 10:221; 1-13.

WESSELING P, VAN DER LAAK JAWM, DE LEEUW H, REUTER DJ, BURGER PC. Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. **Journal Neurosurgery**. 1994, 81:902-909.

WHITE DL, LI D, NURGALIEVA Z, EL-SERAG HB. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: A huge systematic review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**. 2008, 167(4):377-389.

WIDEROFF L, VAUGHAN TL, FARIN FM, GAMMON MD, RISCH H, STANFORD JL, CHOW WH. GST, NAT1, CYP1A1 polymorphisms and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. **Cancer Detection and Prevention**. 2007, 31(3):233-6.

WILDING CS, RELTON CL, REES GS, TARONE RE, WHITEHOUSE CA, TAWN EJ. DNA repair gene polymorphisms in relation to chromosome aberration frequencies in retired radiation workers. **Mutation Research**. 2005, 570:137-145.

WINSEY SL, HALDAR NA, MARSH HP, BUNCE M, MARSHALL SE, HARRIS AL, WOJNAROWSKA F, WELSH KI. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. **Cancer Research**. 2000, 60:5612-5616.

WU KH, WANG CH, YANG YL, PENG CT, LIN WD, TSAI FJ, LIN DT, BAU DT. Significant Association of XRCC4 Single Nucleotide Polymorphisms with Childhood Leukemia in Taiwan. **Anticancer Research**. 2010, 30(2):529-33.

WU CN, LIANG SY, TSAI CW, BAU DT. The Role of XRCC4 in Carcinogenesis and Anticancer Drug Discovery. **Anti-Cancer Drug Discovery**. 2008, 3: 209-219.

WU GY, HASENBERG T, MAGDEBURG R, BONNINGHOFF R, STURM JW, KEESE M. Association Between EGF, TGF-beta1, VEGF Gene Polymorphism and Colorectal Cancer. **World Journal Surgery**. 2009, 33(1):124-9.

YAMADA Y, ANDO F, NIINO N, SHIMOKATA H. Association of polymorphisms of interleukin-6, osteocalcin, and vitamin D receptor genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**. 2003, 88(7):3372-3378.

YANG Y, ZHAI XD, GAO LB, LI SL, WANG Z, CHEN GD. Genetic polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and risk of uterine leiomyoma. **Molecular Cell Biochemical**. 2010, 338:143-147.

YANO KI, MOROTOMI-YANO K, ADACHI N, AKIYAMA H. Molecular Mechanism of Protein Assembly on DNA Double-strand Breaks in the Non-homologous End-joining Pathway. **Journal Radiation Research**. 2009, 50: 97-108.

YE Z, SONG H, HIGGINS JP, PHAROAH P, DANESH J. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. **PLoS Medicine**. 2006, 3(4):91.

YEANG CH, MCCORMICK F, LEVINE A. Combinatorial patterns of somatic gene mutation in cancer. **FASEB Journal**. 2008, 22(8):2605-2622.

YIN J, VOGEL U, MA Y, QI R, WANG H. Association of DNA repair gene XRCC1 and lung cancer susceptibility among nonsmoking Chinese women. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 2009,188(1):26-31.

YIN J, QI R, MA Y, SU Z, WANG H. Genetic polymorphisms of DNA repair gene: XRCC1 Pro206Pro and Gln632Gln in a chinese han population. **Biochemical Genetics**. 2008, 45:815-21.

YIN J, VOGEL U, MA Y, QI R, SUN Z, WANG H. The DNA repair gene *XRCC1* and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. **Lung Cancer**. 2007, **56**:153—160

YOSUNKAYA E, KUCUKYURUK B, ONARAN I, GUREL CB, UZAN M, KANIGUR-SULTUYBEK G. Glioma risk associates with polymorphisms of DNA repair genes, XRCC1 and PARP1. **Br J Neurosurg**. 2010, 24(5):561-5.

YOUNG ID. Genética Médica. Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan SA**. 2007.

YU KD, CHEN AX, QIU LX, FAN L, YANG C, SHAO ZM. XRCC2 Arg188His polymorphism is not directly associated with breast cancer risk: evidence from 37,369 subjects. **Breast Cancer Res Treat**. 2010, 123:219–225.

XIA FDG, TAGHIAN JS, DEFRANK ZC, ZENG H, WILLERS G, ILIAKIS S, POWELL N. Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. 2001, 98(15):8644-9.

ZAHA AFHB. & PASSAGLIA LMP. Biología Molecular Básica Porto Alegre: **Mercado Aberto**, 2003.

ZATTARA-CANNONI H, GAMBARELLI D, LENA G, Dufour H, Choux M, Grisoli F, Vagner-Capodano AM. Are juvenile pilocytic astrocytomas benign tumors? A cytogenetic study in 24 cases. **Cancer Genetics Cytogenetics**. 1998, 104(2):157-160.

ZHU Y, PARADA LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nature Reviews Cancer**. 2002, 2(8):616-626.

ZIJNO A, VERDINA A, GALTÍ R, LEOPARDI P, MARCON F, ANDREOLI C, ROSSI S, CREBELLÍ R. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. **Mutation Research**. 2006, 600(1-2):184-192.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Genetics and Molecular Research 9 (4): 2328-2334 (2010)

Título: GSTP1 Ile105Val polymorphism in astrocytomas and glioblastomas

Autores: Aline Cadurin Custódio¹, Luciana Oliveira Almeida¹, Govanny Rebouças Pinto^{1,3},
Marcelo José Santos², José Reinaldo Walter Almeida², Carlos Antônio Clara², Juan Atunes
Rey⁴ e Cacilda Casartelli¹.

¹Departamento de Genética, Laboratório de Oncogenética, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil

³Laboratório de Genética Humana e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí,
Parnaíba, PI, Brasil

⁴Departamento de Cirurgia Experimental, Laboratório de Oncogenética Molecular, Hospital
Universitário “La Paz”, Madrid, Espanha

ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs) constitute a superfamily of ubiquitous multifunctional enzymes that are involved in the cellular detoxification of a large number of endogenous and exogenous chemical agents that have electrophilic functional groups. People who have deficiencies in this family of genes are at increased risk of developing some types of tumors. We examined GSTP1 Ile105Val polymorphism using PCR-RFLP in 80 astrocytoma and glioblastoma samples. Patients who had the Val allele of the GSTP1 Ile105Val polymorphism had an increased risk of tumor development (odds ratio = 8.60; 95% confidence interval = 4.74-17.87; $P < 0.001$). Overall survival of patients did not differ significantly. We suggest that GSTP1 Ile105Val polymorphisms are involved in susceptibility to developing astrocytomas and glioblastomas.

Key words: Polymorphism; GSTP1; Astrocytoma; Glioblastoma

INTRODUCTION

Tumors of the central nervous system (CNS) represent approximately 2% of all cancers, with an estimated 4.2 to 5.4 per 100.000 individuals per year (Ohgaki and Kleihues, 2005). Although the incidence of CNS tumors is small compared to other cancers, these are among the most serious human malignancies, since they affect the coordination and integration of all body activities. Moreover, as each region of the brain has a vital function, the therapy used in other cancers (total surgical removal of the organ or tumor with a generous margin of normal tissue) cannot be applied to cure patients with brain tumors (Louis et al., 2002; Ohgaki and Kleihues, 2005). Gliomas are the most common tumors of the CNS. Despite the remarkable progress in the characterization of the molecular pathogenesis of gliomas, these tumors remain incurable and, in most cases, refractory to treatment due to their molecular heterogeneity (Kleihues et al., 2002).

Astrocytomas account for the large majority of gliomas, making up 70% of the total, and can be divided into: pilocytic astrocytomas (grade I), including low-grade astrocytomas (grade II), anaplastic (grade III), and glioblastoma (grade IV) (Kleihues et al., 2002). The importance of the grading scheme of malignancy based on histopathology is indicated by the patient's survival. Patients with low-grade astrocytomas (grade II) have a median survival of about seven years, and patients with anaplastic astrocytomas (grade III) have a mean survival of half that time (McCormack et al., 1992), while patients with glioblastoma have an average of 9 to 11 months (Simpson et al., 1993). Unlike astrocytomas, the progression of grade II and III tumors for most malignant tumors is well documented (Ino et al., 2001; Collins, 2004; Hartmann et al., 2004; Ichimura et al., 2004; Ohgaki, 2005). Ng and Lam (1998) suggested the division of glioblastomas into two clinical and molecular distinct entities: primary glioblastomas or new ones, which occur in elderly patients and are clinically very aggressive, and secondary glioblastomas, which develop from preexisting low-degree astrocytomas and have a more prolonged clinical course.

Several studies have examined the relationship of this polymorphism with the formation of various types of tumors such as lung, head and neck, testicular, and breast (Ezer et al., 2002). The presence of this polymorphism is involved in reducing the activity of GSTP1 in 78% of children with asthma in Taiwan (Kabesch et al., 2004). Ezer et al. (2002) conducted a study on brain tumors and concluded that the presence of the Ile105Val polymorphism may lead to the development of pediatric astrocytomas and their progression to malignant grades. The GSTP1 gene is located on chromosome 11 in the 11q13 region and

possesses nine exons (White et al., 2008). This gene accounts for about 90% of the enzymatic activity of the glutathione S-transferase (GST) family.

The activity of GSTP1 enzyme can be altered by the presence of the polymorphism Ile105Val. This polymorphism is located in exon 5 of the gene (rs947894) (McLeish and Turner, 2007). In the present research, a case-control study was conducted to examine the genotype distribution of Ile105Val single-nucleotide polymorphism (SNP) and to search for an association between astrocytomas and glioblastomas and GSTP1 SNP, using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) approach.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Eighty gliomas were analyzed; they had been surgically resected from previously treated patients under the care of the Neurosurgery Department of Fundação Pio XII, Cancer Hospital of Barretos (Barretos, SP, Brazil). The samples, classified according to WHO criteria, were: 43 astrocytomas and 37 glioblastomas. The clinical outcome, including length of survival, was obtained from patient records. For SNP studies, blood samples were collected from 100 healthy individuals to serve as controls. Because of the highly heterogeneous ethnic composition of the Brazilian population, the individuals of the control group were selected from the general population of São Paulo State, with no family history of cancer in first-degree relatives.

DNA extraction and primer construction

DNA extraction was performed using proteinase K and phenol-chloroform according to routine molecular biology protocols. Primers were constructed using the Gene Runner 3.05 program (Hasting Software, Inc.) from the gene sequence of the GSTP1 Ile105Val polymorphism, obtained from the dbSNP of NCBI (accession No. rs 947894). Table 1 shows the primers and PCR product sizes.

Table 1. Polymerase chain reaction primers

Primers		Sequence	Length (bp)	Pcr product (bp)
SNT GSTP1 Ile105Val	Ile105Val-F	CCT GCT CCC CTC CAC CCA AC	20	180
	Ile105Val R	GCC CCT TTC TTT GTT CAG C	19	

PCR = polymerase chain reaction; SNP = single nucleotide polymorphism

PCR was carried out in a final volume of 25 μ L containing 50 ng genomic DNA template, 1X PCR buffer with 2 mM $MgCl_2$, 0.4 μ M of each primer (Invitrogen), 50 μ M dNTPs (Amersham Biosciences) and 0.5 U DNA polymerase (Biotools). The PCR cycling conditions were: 94°C for 5 min, followed by 35 denaturation cycles of 30 s at 94°C, 30 s of annealing at 60°C, and 30 s of extension at 72°C, and a final elongation cycle at 72°C for 5 min. For RFLP, the PCR products were digested by *BSMA* (10 U at 55°C for 5 h - Ile105Val). *BSMA* recognizes a restriction site at Val105 (GTCTCN/NNNN) and generates two fragments of different sizes (115 and 65 bp), while Ile105 allele generates only one fragment of 180 bp. DNA fragments were electrophoresed through a 10% acrylamide:bisacrylamide gel (19:1) and stained with silver nitrate.

Statistical analysis

PCR-RFLP - The independence of alleles (Hardy-Weinberg equilibrium) was ensured using the chi-square test. The distribution of genotype and allele frequencies among patients and controls was compared using chi-square and Fisher exact tests. Overall survival curves were obtained using the Kaplan-Meier method and compared with a log-rank test. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated using a logistic regression model. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed with GraphPad InStat 4.0 and GraphPad Prism 5.0 softwares (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Analysis of tumor and control populations according to the GSTP1 Ile105Val

Eighty patients and 100 control subjects were included in this study. The patient sample comprised 28 females and 52 males (M/F ratio = 0.65), and the control sample consisted of 63 males and 37 females (M/F ratio = 1.7). The average age of the patient group was 45 years (range = 1-75) and of the control group, 45 years (range = 18-72). Genotype frequencies in controls and patients were in Hardy-Weinberg equilibrium. Allele and genotype frequencies of GSTP1 Ile105Val in controls and patients are shown in Table 2. The frequencies of Ile/ Ile and Ile/Val among controls were 87 and 13%, while in patients the frequencies Ile/Ile, Ile/ Val and Val/Val were 43.8, 53.8 and 2.5%, respectively ($P < 0.0001$);

Val105 allele frequency was statistically significant between cases and controls (0.29 and 0.06, respectively, $P < 0.001$).

Table 2. Allele and genotype frequencies in case and control groups.

SNP	Genotype	Case group	Control group	P
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	35 (43,8%)	87 (87%)	<0,001
	Ile/Val	43(53,8%)	13 (13%)	
	Val/Val	2 (2,5%)	0(0)	
Val105 allele frequency		0,29	0,06	<0,001

Data are reported as number with percent in parentheses. SNP = single nucleotide polymorphism.

Comparison of overall survival of patients according to GSTP1 Ile105Val genotype did not show significant differences ($P = 0.82$). In the GSTP1 Ile105Val genotype, the median survival of patients with Ile/Val and Val/Val was 63 weeks (Figure 1).

Figure 1. Overall survival in patients according to GSTP1 Ile105Val single nucleotide polymorphism.

DISCUSSION

The concept of neoplastic transformation links together two types of genetic background of cancer with the same final results. Besides entirely somatic cell gene deregulation, a genetically determined susceptibility is taken into account. The predisposition to cancer results from the inheritance of altered alleles of genes, which are usually of the tumor suppressor type. The glutathione S-transferase (GSTs) constitutes a superfamily of ubiquitin, which are multifunctional enzymes involved in cellular detoxification of a large number of endogenous and exogenous chemical agents that have electrophilic functional groups (Ryberg et al.; 1997). The GSTP1 gene encodes the pi class of enzymes and this gene has been extensively examined in association with risk of cancer (White et al., 2007). The

influence of GSTP1 Ile105Val polymorphism on cancer with inconsistent results has been reported from different parts of the world (Syamala et al., 2007).

In this study, we determined the relationship between GSTP1 Ile105Val SNPs and susceptibility to cancer and patient survival in 80 astrocytomas and glioblastomas. Several studies have examined the relationship between this polymorphism with the formation of various types of tumors as lung, head and neck, testicular and breast (Ezer et al., 2002). The presence of this polymorphism is involved in reducing the activity of GSTP1 in 78% of children with asthma in Taiwan (Kabesch et al., 2004). In another study, Millikan et al., 2000 reported that the presence of this polymorphism in families leads to predisposition to the formation of tumors in the breast.

The present case-control study showed that the Val105 was more frequent in the cancer population than in non-cancer populations (0.29 and 0.06 respectively, $P < 0.001$), and that the presence of this genotype may increase the risk of developing astrocytomas and glioblastomas (OR = 8,60; 95%CI = 4,14-17,87; $P < 0.001$). Ezer et al., 2002 conducted a study in brain tumors and concluded that the presence of the Ile105Val polymorphism may lead to the development of pediatric astrocytomas and its evolution to malignant grades. Singh et al., 2008 related to the presence of the Ile105Val polymorphism in individuals with head and neck tumors, suggesting that this polymorphism could lead to tumor development when compared with the control of population.

Reszka et al., 2007 analyzed the influence of this polymorphism on the risk of developing lung cancer. They observed a large accumulation of oxidants in the blood of individuals who had the variant Val105 and also found higher frequencies of genetic Val/Val among patients with lung cancer than in the control group. Saxena et al, 2008 conducted a case-control study in individuals of the population of northern India in an attempt to assess the relationship between polymorphisms Ile105Val GSTP-1 and risk of breast cancer. They observed 2,6 times a great chance of developing this type of cancer in individuals with genotype Val/Val. Kadouri et al., 2008 analyzed the influence of the Ile105Val polymorphism in patients with breast cancer who also had mutations in the BRCA gene and observed a risk 3,2 times higher among carriers of the Val105 allele, suggesting that the presence of the Val105 variant may be associated with the development breast cancer.

Ye et al., 2006 conducted a study involving 23.000 individuals with cancer lung and 30.000 controls and saw no association between polymorphism GSTP-1 Ile/Val and the risk of lung cancer. Wideroff et al., 2007 also found no relationship between the development of gastric adenocarcinoma and the presence of polymorphic variant Val105 gene GSTP-1. De

Roos et al., 2003 analyzed 422 patients with gliomas, 172 patients with meningiomas and 79 schwannomas and observed that the presence of Val/Val genotype was associated with increased incidence of gliomas and schwannomas, and risk increased according to with the number of Val alleles (1.3 fold in the Ile/Val and 2.1 times in Val/Val). Schwartzbaum et al., 2007 analyzed 329 cases of meningiomas and gliomas and 546 found no association between the risk of tumors of the nervous system and the presence of GSTP-1 polymorphism Ile105Val.

Roos et al., 2003 analyzed samples of gliomas, meningiomas and neuromas and concluded that the presence of the Ile105Val polymorphism is associated with the risk of such patients to develop gliomas. Okeu et al., 2004 analyzed the Ile105Val polymorphism in 278 patients with malignant gliomas and also noted that the presence of this leads to the development of tumors.

In summary, our study provides evidence that GSTP1 Ile105Val may contribute to the etiology of human astrocytomas and glioblastomas, since the allele Val105 was found more frequently in patients than controls, but there was no association between the genotypes and the patients' survival.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients who took part in this investigation. We thank Vanderci Massaro de Oliveira and Marcio Rogério Penha for the technical support provided in this study. Reseach supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA).

REFERENCES

Collins VP. Brain tumours: classification and genes (2004). *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 75: 2-11.

D Roos AJ, Rothman N, Inskip PD, Linet MS, Shapiro WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Pittman GS, Bell DA (2003). Genetic polymorphisms in GSTM1, P1, T1, AND

CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12:14-22.

Ezer R, Alonso M, Pereira E, Kim M, Allen CJ, Miller CD, Newcombr EW. Identification of glutathione S-transferase (GST) polymorphisms in brain tumors and association with susceptibility to pediatric astrocytomas (2002). *Journal of Neuro-Oncology* 59:123-34.

Hartmann C, Mueller W, Von Deimling A . Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors (2004). *J. Mol. Med* 82:638-655.

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P et al (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J. Neurooncol* 70:137-160.

Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC et al (2001). Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin. Cancer Res* 7:839-845.

Kabesch M, Hoefler C, Carr D. et al (2004). Glutathione s transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax* 59:5769-5773.

Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, Baras M, Abeliovich D, Hamburger T, Peretz T, Eeles RA (2008). Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. *Br J Cancer* 98:2006-2010.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol Exp. Neurol* 61:215-225.

Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG . Focus on central nervous system neoplasia (2002). *Cancer Cell* 1:125-128.

McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, et al (1992) Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults-1977-1988. *Neurosurgery* 31:636-642.

Mcleish S, Turner SW . Gene environment interactions in asthma (2007). *Arch. Dis. Child* 92:1032-1035.

Millikan R, Pittman G, Tse CK, Savitz DA, Newman B, Bell D (2000). Glutathione S-transferases M1, T1 and P1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:567-573.

Ng HK, Lam PY . The molecular genetics of central nervous system tumors (1998). *Pathology* 30:196-202.

Ohgaki H . Genetic pathways to glioblastomas (2005). *Neuropathology* 25:1-7.

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

Okeu MF, Selvan M, Wang LE, Stout L, Erana R, Airewele G, Adatto P, Hess K, Osman FA, Groves M, Yung AWK, Levin VA, Wei Q, Bondy M (2004). Glutathione S-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma. *Clinical cancer Research* 10:2618-2625.

Reszka E, Wasowicz .W, Gromadzinska J (2007). Antioxidant defense markers modulated by glutathione S-transferase genetic polymorphism: results of lung cancer case-control study. *Genes Nutr* 2:287-294.

Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, OGREID D, Ulvik A, Vu P, Haugen A (1997). Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 18:1285-1289.

Saxena A, Dhillon VS, Raish M, Asim M, Rehman S, Shukla NK, Deo SV, Ara A, Husain SA (2008). Detection and relevance of germline genetic polymorphisms in glutathione

S-transferases (GSTs) in breast cancer patients from northern Indian population. *Breast Cancer Res Treat* 24.

Schwartzbaum JA, Ahlbom A, Lonn S, Warholm M, Rannug A, Auvinen A, Christensen HC, Henriksson R, Johansen C, Lindholm C, Malmer B, Salminen T, Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Feychting M (2007). An international case-control study of glutathione transferase and functionally related polymorphisms and risk of primary adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:559-565.

Simpson JR, Horton J, Scott C, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials (1993). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 26:239-244.

Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D (2008). Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutation Reserthead* 638:184-194.

Syamala VS, Sreeja L, Syamala V, Raveendran PB, Balakrishnan R, Kuttan R, Ankathil R (2007). Influence of germline polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in familial versus breast cancer susceptibility and survival. *Familial Cancer* (Imprint).

Wideroff L, Vaughan TL, Farin FM, GammonMD, Risch H, Stanford JL, Chow WH (2007). GST, NAT1, CYP1A1 polymorphisms and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Cancer Detect Prev* 31:233-6.

White DL, LI D, Nurgalieva Z, EL-Serag HB (2008). Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: A huge systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 167:377-389.

Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Danesh J (2006). Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLos Med* 3: 91.

ANEXO II – ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Ribeirão Preto, 22 de dezembro de 2010.

Prezada Profa. Dra. A. C. Custódio,

O artigo “**Analysis of the polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1 Arg 399 Gln in gliomas**”, (GMR 1125), foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research (GMR), e revisado por nosso editor técnico, a fim de manter a qualidade de nossa revista.

Peço, neste momento, que **reveja cuidadosamente o texto** (arquivo anexo) e incorpore as modificações sugeridas. Caso não aceite alguma, informe-nos em folha separada.

Por favor, devolva- nos o mais rápido possível a versão final do artigo.

Aproveito a oportunidade para solicitar o pagamento da taxa de R\$ 1.000,00 referente aos custos de publicação do artigo (GMR 1094).

Ratifico que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Seguem as informações para pagamento via depósito bancário:

Banco do Brasil - Ag. 3312-x – C/C 160.314-0

Em favor de Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto

Assim que o depósito for realizado, favor encaminhar comprovante de pagamento e os dados para emissão da Nota Fiscal (nome/instituição, CPF/CNPJ, endereço de emissão e envio da nota). **Não esqueça de identificar, ao enviar a cópia do comprovante, o número do seu artigo GMR 1094.**

Contando com sua compreensão, agradecemos.

Atenciosamente,

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

Título: Analysis of the polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399 Gln in gliomas.

Autores: Aline Cadurin Custódio¹, Luciana Oliveira Almeida¹, Govanny Rebouças Pinto^{1,3},
Marcelo José Santos², José Reinaldo Walter Almeida², Carlos Antônio Clara², Juan Atunes
Rey⁴ e Cacilda Casartelli¹.

¹Departamento de Genética, Laboratório de Oncogenética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil

³Laboratório de Genética Humana e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil

⁴Departamento de Cirurgia Experimental, Laboratório de Oncogenética Molecular, Hospital Universitário “La Paz”, Madrid, Espanha

ABSTRACT:

XRCC genes (X-ray cross complementing group) were discovered mainly for their roles in protecting mammalian cells against damage caused by ionizing radiation. Studies determined that these genes are important in the genetic stability of DNA. Although the loss of some of these genes does not necessarily confer high levels of sensitivity to radiation, they have been found to represent important components of various pathways of DNA repair. To ensure the integrity of the genome, a complex system of DNA repair was developed. Base excision repair is the first defense mechanism of cells against DNA damage and a major event in preventing mutagenesis. Repair genes may play an important role in maintaining genomic stability through different pathways that are mediated by base excision. In the present study, we examined XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 Arg399Gln polymorphism using PCR-RFLP in 80 astrocytoma and glioblastoma samples. Patients who had the allele Trp of the XRCC1 Arg194Trp polymorphism had an increased risk of tumor development (OR=8.80; confidence interval at 95% (95% CI) = 4.34 – 17.70; P <0.001), as did the allele Gln of XRCC1 ARG399Gln (OR=1.01; 95% CI, 0.53 – 1.93; P=0.971). Comparison of overall survival of patients did not show significant differences. We suggest that XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 ARG399Gln polymorphisms are involved in susceptibility for developing astrocytomas and glioblastomas.

Key words: Polymorphism; XRCC1; astrocytoma; glioblastoma

INTRODUCTION

Tumors of the central nervous system (CNS) represent approximately 2% of all cancers, with an estimated 4.2 to 5.4 per 100,000 individuals per year (Ohgaki and Kleihues, 2005). Although the incidence of CNS tumors is small compared with other cancers, these are among the most serious human malignancies, since they affect coordination and integration of all organic activities. Moreover, as each region of the brain has a vital function, the therapy used in other cancers (total surgical removal of the organ or tumor with a generous margin of normal tissue) cannot be applied to cure brain tumors (Louis et al., 2002, Ohgaki and Kleihues, 2005). Gliomas are the most common tumors of the CNS. Despite the remarkable progress in the characterization of the molecular pathogenesis of gliomas, these tumors remain incurable and, in most cases, refractory to treatment due to their molecular heterogeneity (Kleihues et al., 2002).

Astrocytomas account for the large majority of gliomas, making up 70% of the total, and can be divided into: pilocytic astrocytoma (grade I), including low-grade astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III) and glioblastoma (grade IV) (Kleihues et al., 2002). The relevance of the graduated scheme of malignancy based on histopathology is indicated by patient survival. Patients with low-grade astrocytomas (grade II) have a median survival of about seven years, patients with anaplastic astrocytomas (grade III) have a mean survival of half of that time (McCormack et al., 1992), while patients with glioblastoma have an average of 9 to 11 months (Simpson et al., 1993). Unlike grade I astrocytomas, the progression of tumors of grades II and III for most malignant tumors is well documented (Ino et al., 2001; Collins, 2004; Hartmann et al., 2004; Ichimura et al., 2004; Ohgaki, 2005). Ng and Lam (1998) suggested the division of glioblastomas into two clinically and molecularly distinct entities: primary glioblastomas or new ones, which occur in elderly patients and are clinically very aggressive, and secondary glioblastomas, which develop from preexisting low grade astrocytomas and have a more prolonged clinical course.

Human tumors may develop through DNA damage caused by ultraviolet rays, ionizing radiation and environmental chemicals. This causes accumulation of DNA damage leading to tumor development and various cellular dysfunctions. The DNA repair system is crucially important for cellular life (Kawabata et al., 2005). To ensure the integrity of the genome, a complex system of DNA repair was developed. Base excision repair is the first defense mechanism of cells against DNA damage and a major event in preventing mutagenesis (Hu et al., 2005). Repair genes may play an important role in maintaining

genomic stability through different pathways mediated by base excision repair (Sreeja et al., 2007).

The repair of single strand breaks induced by a variety of external and internal factors, including ionizing radiation, alkylating agents and reactive oxygen species, occurs through the process of base excision repair, which depends on the function of DNA repair protein XRCC1, due to its ability to interact with the enzymes DNA polymerase beta, DNA ligase III, APE 1 (apurinic endonuclease 1), PNK (polynucleotide kinase) and poly ADP-ribose polymerase {PARP – poly (ADP – ribose) polymerase}. No enzymatic activity for protein XRCC1 has been described, but it interacts with enzymatic components of each stage of the repair of single strand breaks in DNA (Caldecott, 2003). If there is failure at some stage, this defense mechanism is not feasible in the cell (Loizidou et al., 2008).

The XRCC1 gene is located on chromosome 19 in region 19q13.2 and has 17 exons, with approximately 31.9 kb encoding a protein of 633 amino acids. About 300 polymorphisms (SNPs) in XRCC1 have been found and are listed in the dbSNP database, of which approximately 35 variants are located in exons or the promoter region of the gene (Wang et al., 2008). Several polymorphisms described in the XRCC1 gene are involved in the formation of various types of tumors. Polymorphisms in exon 6 and exon 10 were described. The most frequent polymorphism in the population is located in exon 10, followed by the polymorphism of exon 6 (Ladiges, 2006).

Polymorphism of exon 6 ARG194TRP (rs179982) C/T is associated with reduced risk for developing tumors. The fragment length polymorphism Arg194Trp is 160 bp; restriction enzyme recognizing the restriction site is CCGG MspI. When the T allele is found, the enzyme will not cleave and will yield a fragment of 160 bp, but if the C allele is found, the enzyme cleaves, forming 60-bp and 100-bp fragments.

The Arg399Gln polymorphism (rs25787) located in exon 10 is the most studied among all polymorphisms of repair genes. In a review, Goode et al. (2002) showed the role of this polymorphism in different types of cancers. In tumors of the bladder, skin and esophagus, it seems that the polymorphism does not exert any function, but for lung, stomach and nervous system cancer, the presence of the polymorphism could be involved in tumor formation. The fragment of the Arg399Gln polymorphism is 180 bp, and the restriction enzyme recognizes the restriction site CCGG MspI. When the allele A is found, the enzyme does not cleave and will generate a fragment of 180 bp, but if the allele is G the enzyme will cleave, forming fragments of 55 bp and 125 bp.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Eighty gliomas were analyzed, which had been surgically resected from previously untreated patients under the care of the Neurosurgery Department of Fundação Pio XII, Cancer Hospital of Barretos (Barretos, SP, Brazil). The samples, classified according to the WHO criteria, included 43 astrocytomas and 37 glioblastomas. The clinical outcome, including length of survival, was obtained from patient records. For SNP studies, blood samples of 100 healthy individuals were collected for controls. Because of the highly heterogeneous ethnic composition of the Brazilian population, the individuals of the control group were selected from the general population of São Paulo State, with no family history of cancer in first-degree relatives.

DNA extraction and primer construction

DNA extraction was performed using proteinase K and phenol-chloroform according to routine molecular biology protocols. Primers were constructed using the Gene Runner 3.05 program (Hasting Software, Inc.) from the gene sequence of the XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 ARG399Gln polymorphisms, obtained in the dbSNP of NCBI (accession numbers rs1799782 and rs25787, respectively). Table 1 shows the primers and PCR product sizes.

Table 1. Polymerase chain reaction primers

	Primer	Sequence	Length (bp)	PCR product (bp)
SNP XRCC1Arg194Trp	Arg164Trp – F	GTG AAG GAG GAG GAT GAG AGC	20	160
	Arg164Trp R	CCC CAG CCC CCT CTA CCC T	19	
SNP XRCC1Arg399Gln	Arg399Gln – F	GCG TAA GGA GTG GGT GCT GG	20	180
	Arg399Gln R	GTC TGC TGG CTC TGG GCT G	19	

PCR = polymerase chain reaction; SNP = single nucleotide polymorphism

PCR was carried out in a final volume of 25 µL containing 50 ng genomic DNA template, 1xPCR buffer with 2 mM MgCl₂, 0.4 µM of each primer (Invitrogen), 50 µM dNTPs (Amersham Biosciences) and 0.5 U DNA polymerase (Biotools). The PCR cycling conditions were: 94°C for 5 min, followed by 35 denaturation cycles of 30 s at 94°C, 30 s of annealing at 60°C, and 30 s of extension at 72°C, and a final elongation cycle at 72°C for 5 min. For RFLP, the PCR products were digested by *MspI* (4 U at 37°C for 4 h - XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 Arg399Gln). *MspI* recognizes a restriction site at Arg194 allele

(C▼CGG) and generates two fragments of different sizes (110 and 60 bp), while the Trp194 allele generates only one fragment of 160 bp. For XRCC1, when the polymorphism Arg399Gln occurs, the enzyme MspI generates two fragments of different sizes for Gln399 alleles (125 and 55 bp), and only one fragment (180 bp) for the Arg399 allele. DNA fragments were electrophoresed through a 10% acrylamide:bisacrylamide gel (19:1) and stained with silver nitrate.

PCR products were purified and submitted to bidirectional sequencing, to further confirm the reliability of the genotype analysis. The PCR products were purified with ExoSAP (USB), followed by sequencing with the DYEnamic ET Dye Terminator kit (Amersham Bioscience), according to instructions.

Statistical analysis

PCR-RFLP. The independence of alleles (Hardy-Weinberg equilibrium) was ensured using the chi-square test. The distribution of genotype and allele frequencies among patients and controls was compared using the chi-square and Fisher's exact tests. Overall survival curves were obtained using the Kaplan-Meier method and compared with a log-rank test. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated using a logistic regression model. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed with GraphPad InStat 4.0 and GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Analysis of tumors and control populations according to the XRCC1 codon 194 and codon 399 SNPs

Eighty patients and 100 control subjects were included in this study. The patient sample comprised 28 females and 52 males (M/F ratio = 0.65) and the control sample consisted of 63 males and 37 females (M/F ratio = 1.7). Mean age of the patient group was 45 years (range = 1-75) and of the control group 45 years (range = 18-72). Genotype frequencies in controls and patients were in Hardy-Weinberg equilibrium. Allele and genotype frequencies of XRCC1 Arg194Trp and Arg399Gln in controls and patients are shown in Table 2. The frequencies of Arg/Arg, Arg/Trp and Trp/Trp among controls were 67, 4 and 29%, while in patients the frequencies Arg/Arg, Arg/Trp and TRp/Trp were 18.8; 38.8 and 42.5%, respectively ($P < 0.0001$).

Table 2. Allele and genotype frequencies in case and control groups.

SNP	Genotype	Case group	Control group	P
XRCC1Arg194Trp	Arg/Arg	15 (18.8)	67 (67.0)	<0.001
	Arg/Trp	31 (38.8)	4 (4.0)	
	Trp/Trp	34 (42.5)	29 (29.0)	
	Trp	0.62	0.31	
XRCC1Arg399Gln	Arg/Arg	23 (28.8)	29 (29.0)	0.003
	Arg/Gln	33 (41.3)	20 (20.0)	
	Gln/Gln	24 (30.0)	51 (51.0)	
	Gln	0.5	0.61	

Data are reported as number with percent in parentheses. SNP = single nucleotide polymorphism.

Logistic regression analysis for the investigation of polymorphism association with risk of astrocytomas and glioblastomas is presented in Table 3. Compared to Arg/Arg, the most common genotype of the polymorphism XRCC1 Arg194Trp in the study population, the genotypes with the presence of allele Trp revealed an increased risk of tumor development (OR=8.80; 95% CI, 4.37 – 17.70; P<0.001). When the polymorphism XRCC1 Arg399Gln was analyzed, we observed a small increased risk of tumor development for the presence of the allele Gln (OR=1.01; 95% CI, 0.53 – 1.93; P=0.971).

Table 3. Association of XRCC1 Arg194Trp and ARG399Gln single nucleotide polymorphisms with risk of cancer

SNP	Genotype	Case/control	OR (95%CI)	P
XRCC1Arg194Trp	Arg/Arg	15/67	1	<0.001
	Arg/Trp	31/4	34.62 (10.61 - 112.9)	
	Trp/Trp	34/29	5.24 (2.48 - 11.06)	
	Arg/Trp or Trp/Trp	65/33	8.80 (4.37 - 17.70)	
XRCC1Arg399Gln	Arg/Arg	23/29	1	0.064
	Arg/Gln	33/20	2.08 (0.95 - 4.53)	
	Gln/Gln	24/51	0.59 (0.28 - 1.23)	
	Arg/Gln or Gln/Gln	57/71	1.01 (0.53 - 1.93)	

SNP = single nucleotide polymorphism.

Comparison of overall survival of patients according to XRCC1 Arg194Trp genotypes showed a significant difference (P = 0.20) when compared to controls, and Arg399Gln genotype did not show significant differences (P = 0.439). In the XRCC1 Arg194Trp genotype, the median survival of patients with Arg/Arg, Arg/Trp and Trp/Trp was 64 weeks, and in XRCC1 Arg399Gln genotype the median survival of patients with Arg/Arg, Arg/Gln and Gln/Gln was 63 weeks (Figures 1 and 2).

Figure 1. Overall survival in patients according to XRCC1Arg194Trp single nucleotide polymorphism.

Figure 2. Overall survival in patients according to XRCC1Arg399Gln single nucleotide polymorphism.

DISCUSSION

SNPs are recognized as important tools in human genetics and medicine and have been widely used in genetic association studies of various complex diseases, such as cardiovascular, psychiatric and autoimmune diseases, obesity, osteoporosis, diabetes and cancer (Curran et al., 2001; Miller and Kwok, 2001; Lin et al., 2003; Tamura et al., 2003; Yamada et al., 2003; Hirai et al., 2005). In humans, several reviews of SNPs have also been conducted throughout the genome with the intention of determining the patterns of the haplotypes in the populations studied (Daly et al., 2001; Jeffreys et al., 2001; Patil et al., 2001; Reich et al., 2001; Gabriel et al., 2002). Data from these tests are extremely useful for

studying the genetic basis of common complex diseases (Phillips et al., 2003). Polymorphisms in DNA repair genes may be associated with differences in the efficient repair of DNA damage and may influence the risk for developing tumors. This can result in subtle changes in the structure of proteins from genes and alter their functions (Sreeja et al., 2007).

In this study, we determined the relationship between XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399Gln and susceptibility to cancer and patient survival in 80 gliomas. Goode et al. (2002) showed in a review that the polymorphism of exon 6 ARG194Trp is associated with reduced risk for developing tumors.

This was confirmed by an analysis of 38 cases of controls in a Chinese population. A study conducted in Russia with 2000 cases also showed the presence of the polymorphism ARG194Trp associated with reduced risk of lung cancer. These results are surprising considering that the presence of a polymorphism, the exchange of one amino acid, could be deleterious to gene function and could consequently increase the risk of developing tumors (Ladiges, 2006).

There are some explanations considering the presence of a polymorphism not associated with the risk of cancer, one of which is that some studies may present misleading, inaccurate answers.

In the case of this variant, there is strong evidence of a large number of studies suggesting links between its presence and the formation of tumors.

A study by Moullan et al. (2003) revealed that the presence of the polymorphism ARG194Trp in exon 6 may be associated with increased occurrence of breast tumors. Tae et al. (2004) conducted a study of patients with head and neck tumors and found that the presence of this polymorphism was associated with increased risk of tumors.

A study by Wang et al. (2008) showed that the presence of this polymorphism is not related to the risk of developing bladder tumors. The data variation, showing that this polymorphism is involved with the genesis of tumors in some cases and not in others, may be related to the type of tissue considered.

Loizidou et al. (2008) conducted a study of patients with breast cancer and found that the XRCC1Arg194Trp polymorphism showed no association with disease development. Improta et al. (2008), in analyzing 104 patients with colorectal and lung cancer, found no changes in the tumors related to polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399Gln.

A review by Goode et al. (2002) revealed the role of XRCC1Arg399Gln polymorphism in different types of cancer. In tumors of the bladder, skin and esophagus, it

seems that the polymorphism does not exert any function, but for lung, stomach and nervous system the presence of the polymorphism could be involved in tumor formation.

The presence of the 399Gln variant was reported to be associated with the risk of head and neck cancer (Sturgis et al. 1999), breast cancer (Li et al. 2009), and lung cancer (Improta et al., 2008; Sreeja et al., 2007).

Au et al. (2003) irradiated cells of individuals carrying the Arg399Gln polymorphism with ultraviolet rays and found an increase in chromosomal deletions. These chromosomal deletions resulted from a deficiency of DNA repair, facilitating genetic instability, increased mutations and risk for development of tumors.

Felini et al. (2007) observed no association between XRCC1Arg399Gln polymorphism and gliomas; this agrees with a previous hospital-based case control study. Loizidou et al. (2008) reported that the XRCC1Arg399Gln polymorphism was not associated with risk of development of breast cancer. Wang et al. (2004) did not find any statistically significant differences in the distributions of XRCC1Arg399Gln in 309 patients with gliomas.

Jelonek et al. (2010) observed an association between XRCC1 Arg399Gln polymorphism and colorectal cancer: Arg/Arg homozygotes (GG) were more frequent in the control groups, and Gln/Gln homozygotes (AA) were more frequent in the cancer group, while the frequency of heterozygotes (G/A) was similar in the patients and control group. Consequently, the XRCC1 399Gln (A) allele was overrepresented in the cancer group and was associated with an increased risk of sporadic colorectal cancer.

In summary, our study provides evidence that the XRCC1Arg194Trp polymorphism may contribute to the etiology of human astrocytomas and glioblastomas, since the allele Trp194 was found more frequently in patients than in controls and because its presence is associated with the genotype and the patients' survival. XRCC1Arg399Gln revealed a small increased risk of tumor development for the presence of the allele Gln and did not show significant differences in patient survival.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients who took part in this investigation. We thank Vanderci Massaro de Oliveira and Marcio Rogério Penha for the technical support provided in this study. Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA).

REFERENCES

Au WW, Ssalama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. (2003). *Environ Health Perspect* 111(15):1843-850..

Collins VP. Brain tumours: classification and genes. (2004). *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 75: 2-11.

Curran JE, Lea RA, Rutherford S, et al. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer.(2001). *Int J Cancer* 95(4):271-5, 2001.

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, et al. High-resolution haplotype structure in the human genome. (2001). *Nat Genet* 29(2):229-32.

Felini MJ, Olshan AF, Schoeder JC, North KE, Carozza SE, Kelsey KT, Li M, Wiencke JK, Wrensch MR. DNA repair polymorphisms XRCC1 and MGMT and risk of adult gliomas. (2007). *Neuroepidemiology* 29:55-58.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. (2002). *Science* 296(5576):2225-2229.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. (2002). *Epidemiol Biomarkers Prev* 11(12):1513-530.

Hartmann C, Mueller W, Von Deimling A. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors.(2004). *J Mol Med* 82(10):638-55.

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, et al. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. (2005). *Diabetes Res Clin Pract* 69(3):287-292.

Hu Z, Ma H, Chen E, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. (2005). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(7):1810-1818.

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, et al. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. (2004) *J Neurooncol* 70(2):137-60.

Improta G, Sgambato A, Bianchino G, Zupa A, Grieco V, La Torre G, Traficante A, Cittadini A. Polymorphism of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: A case-control study in a southern Italian population. (2008). *Anticancer Research* 28:2941-2946.

Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. (2001). *Clin Cancer Res* 7(4):839-845.

Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. (2001). *Nat Genet* 29(2):217-22.

Jelonek K, Gdowicz-Kosok A, Pietrowska M, Borkowska M, Korfanty J, Rzeszowska-Wolny J, Widak P. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. (2010). *J Appl Genet* 51(3):343–352.

Kawabata M, Teruyuki K, Nishibori M. Role of recA/Rad51 Family proteins in mammals. (2005). *Acta Med. Okayama* 59(1):1-9.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. (2002). *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3):215-225.

Ladiges WC. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. (2006) *Oncogene* 25:1612-1619.

Li H, Há CT, Tai CB. XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: A meta-analysis. (2009). *The Breast* 18:183–191.

Lin RC, Wang XL, Dalziel B, et al. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. (2003). *Obes Res* 11(6):802-808.

Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. (2002). *Cancer Cell* 1(2):125-128.

Loizidou MA, Michael T, Neuhausen SL, Newbold RF, Marcou Y, Kakouri E, Daniel M, Pepadopoulos P, Malas S, Kyriacou K, Hadjisavvas A. Genetic polymorphism in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. (2008). *Breast Cancer Res Treat* 112:575-579.

McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, et al. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults--1977-1988. (1992). *Neurosurgery* 31(4):636-42.

Miller, R. D.; Kwok, P. Y. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. **Hum Mol Genet**, v.10, n.20, p.2195-2198, Oct 1. 2001.

Moullan N, Cox DG, Angele S, Romesting P, Gerard JP, Hall J. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. (2003). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12:1168-1174.

Ng HK, Lam PY . The molecular genetics of central nervous system tumors (1998). *Pathology* 30:196-202.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. (2005). *Neuropathology* 25(1):1-7.

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

Patil N, Berno AJ, Hinds DA, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21.(2001). *Science* 294(5547):1719-1723.

Phillips MS, Lawrence R, Sachidanandam R, et al. Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots.(2003). *Nat Genet* 33(3):382-387.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. (2001). *Nature* 411(6834):199-204.

Simpson JR, Horton J, Scott C, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. (1993). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26(2):239-244.

Sreeja L, Syamala SV, SYamala V, Hariharan S, Raveendran PB, Vijayalekshmi RV, Madhavan J, Ankathil R. Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India. (2007). *J Câncer Res Clin Oncol*. DOI 10.1007/s00432-007-0328-4.

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. (1999). *Carcinogenesis*. 20(11):2125-9.

Tae K, Lee IS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho IY, Kim LI, Park BL, Shin HD. Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population.(2004). *Int. J. Can* 111:805-808.

Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, et al. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. (2003). *Int Arch Allergy Immunol* 131(1):33-38.

Wang Li-E, Bondy ML, Shen H, El-Zein R, Aldape K, Cao Y, Pudavalli V, Levin VA, Alfred Yung WK, Wei Q. Polymorphism of DNA repair genes and risk glioma. (2004). *Cancer Research* 64: 5560-5563.

Wang N, Dong XJ, Zhou RM, Guo W, Zhang XJ, Li Y. An investigation on the polymorphisms of two DNA repair genes and susceptibility to ESCC and GCA of high-incidence region in northern China. (2009). *Mol Biol Rep* 36:357-364.

Yamada Y, Ando F, Niino N, et al. Association of polymorphisms of interleukin-6, osteocalcin, and vitamin D receptor genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. (2003). *J Clin Endocrinol Metab* 88(7):3372-3378.