

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

Bárbara Roberta Ongaratti

**Expressão de Marcadores de Reparo
de DNA e Marcadores de
Proliferação em Gliomas.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2020**

Bárbara Roberta Ongaratti

Expressão de Marcadores de Reparo de DNA e Marcadores de Proliferação em Gliomas.

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

Orientador: Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima
Coorientadora: Dra. Miriam da Costa Oliveira

**Porto Alegre
2020**

Catálogo na Publicação

Roberta Ongaratti, Bárbara

Expressão de Marcadores de Reparo de DNA e Marcadores de Proliferação em Gliomas / Bárbara Roberta Ongaratti.

-- 2020.

114 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

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

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

1. Gliomas. 2. Reparo do DNA. 3. Proliferação. 4. Imuno-histoquímica. I. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima**, pela oportunidade de contínuo aprendizado e desenvolvimento científico durante o mestrado e doutorado, pelo interesse, disponibilidade, estímulo e convivência e por ser um exemplo de profissional e de pessoa.

À minha coorientadora, **Dra. Miriam da Costa Oliveira**, pela parceria e confiança depositadas em mim, pelo impulso para o conhecimento de novas áreas e pela chance de crescimento na ciência.

Às minhas amigas e colegas, **Geraldine Trott** e **Camila Rossi**, que estiveram juntas durante todo o caminho. Agradeço pela amizade e companhia nas horas de incertezas e agonias, mas também nas de realizações e felicidades.

Aos colegas de laboratório, especialmente aos técnicos **Teresinha Stein**, **Giuliano Rizzotto** e **Dra. Keli Reiter** pela competência, por compartilharem seus conhecimentos, por me incentivarem e pelos valiosos momentos de descontração.

À **Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho**, pelos ensinamentos e experiências transmitidos sempre com tanto carinho. Obrigada também pelos deliciosos bolos que sempre trazem alegria ao laboratório.

Ao **Dr. Nelson Pires Ferreira** e à **Dra. Carolina Rech**, pela inestimável contribuição.

Aos alunos de iniciação científica, principalmente **Anita Machado Maciel**, **Tainá Mafalda dos Santos** e **Bruna Araujo**, pela disposição e alegria durante o período em que trabalhamos juntas.

À minha psicóloga, **Andressa Garcia**, pela força e por me ajudar a reconhecer a minha capacidade.

Ao meu noivo, **Víctor Gasperin**, pela compreensão, incentivo e paciência durante os momentos árdios dessa jornada. Obrigada por estar sempre presente e por ser meu parceiro de vida.

À minha mãe, **Noeli Dilli**, pelas oportunidades, pelo incentivo e pelo amor. Por valorizar o conhecimento e sempre me mostrar o caminho correto.

À minha avó, **Erna Dilli** (*in memoriam*), por ser meu exemplo de mulher forte e independente.

Aos meus irmãos **Jeverson** e **Ederson**, cunhadas, **Francielly** e **Bruna**, e sobrinhas, **Laura** e **Júlia**, por valorizarem minha trajetória e me incentivarem a alçar voos mais altos.

Finalmente, a todos amigos que estiveram presentes durante esse período, me incentivando e alegrando meus dias.

Resumo da Tese

Introdução: Os gliomas correspondem a 80% dos tumores malignos de sistema nervoso central. Apesar do progresso na caracterização da patogênese, permanecem incuráveis e, na maioria dos casos, resistentes aos tratamentos. Estudos sugerem que o sistema de reparo de DNA está correlacionado à tumorigênese e à progressão em gliomas. **Objetivos:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica (IHQ) dos marcadores de reparo do DNA XRCC2, XRCC3 e XRCC4 e dos marcadores de proliferação celular Ki-67, p53, PCNA e ciclina D1 e suas relações com variáveis clínicas em gliomas. **Materiais e métodos:** Foram incluídos 39 pacientes com gliomas. A técnica IHQ foi aplicada para determinar a expressão dos marcadores e as variáveis clínicas foram obtidas a partir dos prontuários. **Resultados:** A idade média de $52 \pm 12,8$ anos, sendo 59% homens e 82% dos casos gliomas de alto grau (GAG). Os pacientes com GAG apresentaram-se 13 anos mais velhos ao diagnóstico ($p=0,015$). Pacientes com >50 anos mostraram risco cinco vezes maior de apresentar recrescimento/recidiva ($p=0,017$). XRCC2 e XRCC3 mostraram-se expressas em todos os casos e XRCC4 em 97,4% dos casos. A marcação forte de XRCC4 foi correlacionada à menor sobrevida global ($p=0,009$). Ki-67 e p53 mostraram correlação positiva com o grau tumoral ($p<0,0001$ e $p=0,011$) e entre si ($p=0,026$). PCNA e ciclina D1 mostraram correlação positiva com a idade ($p=0,045$ e $p=0,016$). A expressão de PCNA mostrou correlação positiva com a de XRCC3 ($p=0,019$). **Conclusão:** A expressão de XRCC2, XRCC3 e XRCC4 na quase totalidade dos casos demonstra que as vias de reparo por recombinação homóloga (HR) e por junção das extremidades não-homólogas (NHEJ) estão ativadas em gliomas independentemente do grau. A correlação

entre a expressão do PCNA e de XRCC3 demonstra que essas atuam em consonância na HR nos gliomas. O XRCC4 demonstrou ser um potencial preditor de menor sobrevida global em pacientes com gliomas.

Palavras-chave: gliomas, reparo do DNA, proliferação, imuno-histoquímica

Abstract

Introduction: Gliomas correspond to 80% of malignant tumors of the central nervous system. Despite progress in characterizing the pathogenesis, they remain incurable and, in most cases, resistant to treatments. Studies suggest that the DNA repair system is correlated with tumorigenesis and progression in gliomas. **Objectives:** To evaluate the immunohistochemical expression (IHC) of DNA repair markers XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and of cell proliferation markers Ki-67, p53, PCNA, and cyclin D1 and their relationship with clinical variables in gliomas. **Materials and methods:** 39 patients with gliomas were included. The IHC technique was applied to determine the expression of the markers and clinical variables were obtained from medical records. **Results:** The average age of 52 ± 12.8 years, 59% of whom were men and 82% of cases with high-grade gliomas (GAG). GAG patients were 13 years older at diagnosis ($p=0.015$). Patients >50 years of age were five times more likely to develop recurrence-regrowth ($p=0.017$). XRCC2 and XRCC3 were shown to be expressed in all cases and XRCC4 in 97.4% of cases. The strong XRCC4 marking was correlated with lower overall survival ($p=0.009$). Ki-67 and p53 showed a positive correlation with the tumor grade ($p < 0.0001$ and $p=0.011$) and with each other ($p=0.026$). PCNA and cyclin D1 showed a positive correlation with age ($p=0.045$ and $p=0.016$). PCNA expression showed a positive correlation with that of XRCC3 ($p=0.019$). **Conclusion:** The expression of XRCC2, XRCC3, and XRCC4 in almost all cases demonstrates that the repair pathways by homologous recombination (HR) and by non-homologous end joining (NHEJ) are activated in gliomas regardless of degree. The correlation between PCNA expression and XRCC3 demonstrates that these proteins act in consonance in

the HR pathway in gliomas. XRCC4 has been shown to be a potential predictor of lower overall survival in patients with gliomas.

Keywords: gliomas, DNA repair, proliferation, immunohistochemistry

Lista de abreviaturas

1p/19q: braço curto do cromossomo 1/braço longo do cromossomo 19

BER: do inglês, *base excision repair*

CCND1: do inglês, *gene encoding cyclin D1 protein*

CDK4: do inglês, *cyclin dependent kinase 4*

CDK6: do inglês, *cyclin dependent kinase 6*

Ciclina D1: proteína ciclina D1

DAB: do inglês, *3, 3'-diaminobenzidine*

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DNA-PKcs: do inglês, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*

DSB: do inglês, *double-strand break*

G0: *gap 0*

G1: *gap 1*

G2: *gap 2*

GAG: gliomas de alto grau

GBG: gliomas de baixo grau

H3K27M: do inglês, *histone 3-lysine-27-methionine*

HR: do inglês, *homologous recombination*

HRP: do inglês, *horseradish peroxidase*

IDH: do inglês, *isocitrate dehydrogenase*

IHC: do inglês, *immunohistochemistry*

IHQ: imuno-histoquímica

kDa: kilodalton

Ki-67: proteína Ki-67

Ku70: do inglês, *Ku autoantigen 70kDa*

Ku80: do inglês, *Ku autoantigen 80kDa*

M: mitótica

MMR: do inglês, *mismatch repair*

MRN: Mre11-RAD50-Nbs1

NER: do inglês, *nucleotide excision repair*

NHEJ: do inglês, *non-homologous end joining*

OMS: Organização Mundial da Saúde

p53: proteína p53

PCNA: do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*

RAD51: do inglês, *DNA repair protein RAD51 homolog 1*

RAD52: do inglês, *DNA repair protein RAD52 homolog 2*

RAD54: do inglês, *DNA repair and recombination protein RAD54-like*

RELA: do inglês, *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*

RPA: do inglês, *replication protein A*

S: sintética

SNC: sistema nervoso central

TMZ: temozolamida

TP53: gene codificador da proteína p53

UV: ultravioleta

XLF: *XRCC4-like factor*

XRCC: do inglês, *X-ray repair cross complementing*

XRCC1: do inglês, *X-ray repair cross complementing 1*

XRCC2: do inglês, *X-ray repair cross complementing 2*

XRCC3: do inglês, *X-ray repair cross complementing 3*

XRCC4: do inglês, *X-ray repair cross complementing 4*

XRCC5: do inglês, *X-ray repair cross complementing 5*

XRCC6: do inglês, *X-ray repair cross complementing 6*

XRCC7: do inglês, *X-ray repair cross complementing 7*

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição dos tipos histológicos dos gliomas.....	16
Figura 2: Danos ao DNA e mecanismos de reparo.....	25
Figura 3: Reparo de quebra de dupla fita de DNA (DSB) por recombinação homóloga (HR) ou junção de extremidades não-homólogas (NHEJ).....	29
Figura 4: Ação de proteínas envolvidas na proliferação durante as fases do ciclo celular.....	34
Figura 5. Marcação imuno-histoquímica dos marcadores de proliferação em gliomas: a) Ki-67; b) p53; c) PCNA; d) ciclina D1. Aumento 40X.....	92
Figura 6. Marcação imuno-histoquímica de XRCC2 em gliomas: a) marcação fraca; b) marcação moderada; c) marcação forte. Aumento 40X.....	92
Figura 7. Marcação imuno-histoquímica de XRCC3 em gliomas: a) marcação fraca; b) marcação moderada; c) marcação forte. Aumento 40X.....	93
Figura 8. Marcação imuno-histoquímica de XRCC4 em gliomas: a) marcação fraca; b) marcação moderada; c) marcação forte. Aumento 40X.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 1:Classificação dos gliomas pela OMS.....	17
--	----

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1. GLIOMAS.....	15
1.1.1 Epidemiologia e classificação	15
1.1.2. Fatores de risco	18
1.1.3. Localização e sintomas	19
1.1.4. Tratamento	19
1.1.5. Sobrevida	22
1.2. MECANISMOS DE REPARO DE DNA.....	23
1.2.1. Recombinação homóloga (HR) e de junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)	26
1.3. FAMÍLIA XRCC.....	27
1.3.1. Proteína XRCC2	28
1.3.2. Proteína XRCC3	31
1.3.3. Proteína XRCC4	32
1.4. MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO.....	33
1.4.1. Proteína Ki-67	35
1.4.2. Proteína p53	36
1.4.3. Proteína PCNA	37
1.4.4. Proteína ciclina D1	38
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
3. OBJETIVOS	57
3.1. OBJETIVO GERAL.....	57
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	58
5. CONCLUSÕES	85
6. APÊNDICES	87
6.1. JUSTIFICATIVA PARA TAMANHO DA AMOSTRA.....	87
6.2. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	88
6.3. MARCAÇÕES IHQ.....	92
6.4. TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO (2016-2020).....	94

7. ANEXOS	105
7.1 PARECERES DOS COMITÊS DE ÉTICA.....	106

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. GLIOMAS

1.1.1. Epidemiologia e classificação

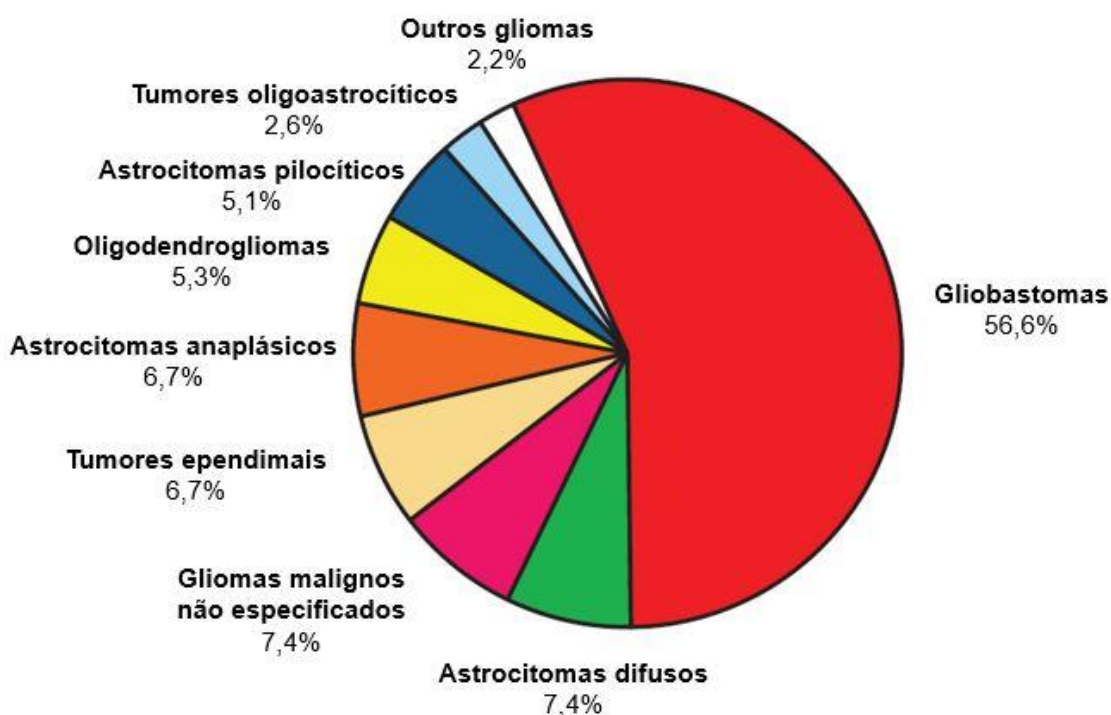
Os gliomas são tumores neuroepiteliais originários das células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e ependimócitos) (Davis, 2018). Os astrócitos atuam na regulação das funções cerebrais implicadas na neurogênese e sinaptogênese, controlando a permeabilidade da barreira hematoencefálica e mantendo a homeostase extracelular (Siracusa *et al.*, 2019), os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios (Michalski e Kothary, 2015), os ependimócitos revestem os ventrículos e o canal central da medula e, por estarem em contato direto com o líquido cefalorraquidiano, desempenham papel na estabilidade hídrica (Kovacs, 2017).

Os gliomas correspondem a 26% dos tumores primários e a 81% dos tumores malignos de sistema nervoso central (SNC), com taxa de incidência variando de 4,67 a 7,3 a cada 100.000 habitantes (Larjavaara *et al.*, 2007; Gousias *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2017; Ostrom *et al.*, 2018). Quanto ao sexo, são 1,3 vezes mais diagnosticados em homens do que em mulheres. Fatores hormonais como a exposição ao estrogênio, principalmente antes da menopausa, e características genéticas têm sido sugeridos como possíveis explicações para a menor predominância de gliomas em mulheres (Felini *et al.*, 2009; Kabat *et al.*, 2011; Ostrom *et al.*, 2018). Com base em suas características histológicas e em seu comportamento, os gliomas são classificados em graus que variam de I a IV. O grau I é atribuído aos tumores delimitados, não infiltrativos

e com baixa atividade mitótica, o grau II aos tumores difusos e infiltrativos com atipia citológica isolada, o grau III aos tumores que mostram anaplasia, hipercromasia e aumento da atividade mitótica e o grau IV aos tumores que, além de anaplasia, hipercromasia e aumento da atividade mitótica, mostram proliferação microvascular e/ou necrose (Louis *et al.*, 2007).

Em relação ao tipo histológico, o glioblastoma (grau IV) é o mais frequente (56,6%), seguido pelo astrocitoma difuso (grau II) (7,4%). Ver Figura 1.

Figura 1. Distribuição dos tipos histológicos dos gliomas



Fonte: Adaptado de Ostrom *et al.*, 2018.

Além de considerar os graus, em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Louis *et al.*, 2016) agregou parâmetros moleculares como mutações,

codeleções, ampliações e fusões de genes, entre outros na classificação, a fim de definir os diferentes tipos tumorais. A classificação dos gliomas difusos foi redefinida e novos tipos tumorais foram incluídos. Os gliomas foram divididos em astrocíticos, oligodendrogliais e ependimais, a especificação em graus foi mantida e foi acrescentado o *status* genético de IDH (*isocitrate dehydrogenase*), H3K27M (*Histone 3-Lysine-27-Methionine*), RELA (*V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A*) e deleções no 1p/19q (braço curto do cromossomo 1/braço longo do cromossomo 19). Conforme a nova classificação, a nomenclatura dos gliomas é formada pelo tipo histológico, determinado no exame de anátomopatológico, seguido das características genéticas (Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Ver Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos gliomas pela OMS.

Astrocitomas difusos e oligodendrogliomas	Grau
Astrocitoma difuso IDH mutante	II
Astrocitoma anaplásico IDH mutante	III
Glioblastoma IDH selvagem	IV
Glioblastoma IDH mutante	IV
Glioma difuso H3K27M mutante	IV
Oligodendroglioma IDH mutante e 1p/19q codeletados	II
Oligodendroglioma anaplásico, IDH mutante e 1p/19q codeletados	III
Outros tumores astrocíticos	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma subependimal de células gigantes	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III
Tumores ependimais	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma RELA positivo	II ou III
Ependimoma anaplásico	III

IDH: *isocitrate dehydrogenase*; H3K27M: *Histone 3-Lysine-27-Methionine*; 1p/19q: *braço curto do cromossomo 1/braço longo do cromossomo 19*; RELA: *V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A* (Adaptado de Louis *et al.*, 2016).

As taxas de incidência de gliomas por idade variam de acordo com a histologia, os gliomas de baixo grau (graus I e II) (GBG) têm um pico de incidência entre a terceira e quarta década de vida, enquanto que os gliomas de alto grau (graus III e IV) (GAG) têm este pico após a sétima década (Dolecek *et al.*, 2012; Ostrom *et al.*, 2018).

1.1.2. Fatores de risco

Assim como a maioria dos tumores cerebrais, a etiologia dos gliomas não é completamente compreendida, fatores como síndromes hereditárias e agentes cancerígenos ambientais, por exemplo a exposição a radicais livres, à radiação ionizante e aos raios ultravioleta (UV), podem aumentar o risco de desenvolver esses tumores (Ohgaki e Kleihues, 2005; Sadetzki *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2011).

Alterações relacionadas à célula de origem, ao acúmulo de mutações e à redução da vigilância imune podem ser possíveis causas para o aumento da incidência de gliomas, principalmente em pacientes acima de 50 anos (Cahill e Turcan *et al.*, 2018). Síndromes hereditárias estão associadas com um maior risco de desenvolver gliomas como, por exemplo, a neurofibromatose tipo I relacionada com maior incidência de astrocitomas, a neurofibromatose tipo II com ependimomas, a síndrome de Lynch e a síndrome de Li-Fraumeni com glioblastomas (Goodenberger e Jenkins, 2012; Ostrom *et al.*, 2014), no entanto, essas representam uma pequena proporção, menos de 5% dos casos de gliomas. Cerca de 5 a 10% dos gliomas ocorrem em pacientes que têm histórico familiar. Parentes de primeiro grau têm um risco duas vezes maior de desenvolver gliomas, especialmente quando o tumor se desenvolve em pacientes jovens (Goodenberger e Jenkins, 2012).

1.1.3. Localização e sintomas

A localização dos gliomas mostra associação com o grau tumoral, a grande maioria dos GAG localiza-se na região supratentorial, que compreende os lobos cerebrais, sendo mais frequentes no lobo frontal e no lobo temporal, enquanto que os GBG surgem a partir de estruturas mais profundas como ventrículos, cerebelo e tronco cerebral (Larjavaara *et al.*, 2007; Ostrom *et al.*, 2019).

A localização anatômica dos gliomas, além de contribuir para os sintomas, impacta na escolha da abordagem cirúrgica e no prognóstico do paciente. O subtipo tumoral, os resultados clínicos e os padrões de crescimento podem se correlacionar com a localização do tumor (Lim *et al.*, 2007; Bohman *et al.*, 2010; Steed *et al.*, 2016).

Alguns pacientes com gliomas não apresentam sintomas e o tumor pode ser um achado incidental. Os sintomas, quando presentes, são causados principalmente pelo aumento da pressão intracraniana, mas também dependem da localização e do tamanho tumoral. Cefaleia, convulsões, mudanças de comportamento, náuseas, vômitos e perda da visão são os mais frequentes (Nayak e Reardon, 2017). Os sintomas têm grande impacto na qualidade de vida do paciente e podem influenciar na escolha do tratamento (Minniti *et al.*, 2013).

1.1.4. Tratamento

A ressecção cirúrgica é a abordagem terapêutica inicial, além de ser parte fundamental, quando se considera a sobrevida dos pacientes. Tem como principal objetivo o diagnóstico anátomopatológico e, quando viável, a ressecção máxima do tumor (Pouratian *et al.*, 2007; Lara-Velazquez *et al.*, 2017). A

natureza invasiva e infiltrativa dos gliomas muitas vezes inviabiliza a ressecção total curativa, sendo a ressecção parcial a melhor escolha, devido à possibilidade de minimizar perdas de funções neurológicas, como déficits motores, de linguagem e neurocognitivos (Sanai e Berger, 2018).

A radioterapia induz a morte celular direta, através da radiação ionizante, e indireta, através da produção de radicais livres causando oxidação e dano ao DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Santacroce *et al.*, 2013). A quantidade de doses, frações e a duração do tratamento vão depender da tolerância à radioterapia, da idade do paciente, do tamanho e grau tumoral (Lawrence *et al.*, 2010). Diversas técnicas podem ser aplicadas aos gliomas, como a radioterapia com intensidade modulada e a radioterapia conformacional tridimensional que contam com o auxílio de *softwares* que identificam se a radiação está sendo aplicada no local exato (MacDonald *et al.*, 2007). Existe também a radioterapia com feixes de prótons, técnica que fornece radiação apenas quando esses feixes atingem o tumor, causando menos danos ao tecido circundante (Jhaveri *et al.*, 2018). A radioterapia estereotáxica atua através da aplicação de feixes de radiação que se encontram, tendo como ponto central o tumor cerebral, causando danos às células tumorais mesmo em áreas muito pequenas (Redmond e Mehta, 2015).

Em relação aos efeitos colaterais, podem ser divididos em agudos e tardios. Os agudos ocorrem durante ou logo após o tratamento e tendem a ser mais leves e tratáveis, geralmente desaparecem após algumas semanas, sendo os mais comuns fadiga, alterações de pele na área irradiada, perda de cabelo, náusea e vômitos (Maquilan *et al.*, 2014; Sourati *et al.*, 2017). Os efeitos colaterais tardios podem levar meses ou até anos para se desenvolver e ocorrem

na área que recebeu radiação, se apresentam como desmielinização, gliose, edema, lesão vascular e necrose por coagulação (Chan *et al.*, 1999).

A quimioterapia é geralmente realizada com TMZ (temozolomida), agente que atua metilando o DNA, impedindo a proliferação de células tumorais. A TMZ é a principal escolha no tratamento dos gliomas devidos aos seus efeitos colaterais mais brandos, baixa toxicidade sistêmica, permeabilidade à barreira hematoencefálica e alta capacidade de penetração nas células tumorais (Hart *et al.*, 2013). Existem outros agentes quimioterápicos utilizados no tratamento dos gliomas, como os alquilantes de DNA (carmustina, lomustin, procarbazona, vincristina) e os inibidores de angiogênese (bevacizumab e cediranib) (Taal *et al.*, 2015). Quanto aos efeitos colaterais da quimioterapia, os principais são náusea, vômito, supressão da medula óssea (leucopenia, trombocitopenia, linfopenia) e hepatotoxicidade. Reações cutâneas alérgicas são observadas com o uso de TMZ, além de infecções oportunistas, especialmente por *Pneumocystis carinii* (Taal *et al.*, 2015).

Para os GAG, a ressecção cirúrgica é seguida por quimio e radioterapia (Sze *et al.*, 2013; Nayak e Reardon, 2017). Já para os GBG, o tratamento adjuvante pode ser considerado para aqueles pacientes que têm risco elevado, como àqueles com gliomas de linhagem astrocítica, IDH tipo selvagem e ressecção parcial do tumor (Forst *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2016; Geurts e van den Bent, 2019).

Os gliomas podem desenvolver resistência aos tratamentos de quimio e radioterapia e isso pode ser devido à ação das vias de reparo de DNA. O princípio dessas terapias é causar danos ao DNA das células cancerosas, levando às quebras de dupla fita (*double-strand breaks* - DSB), dessa forma as

vias de reparo são ativadas e, caso essa ativação ocorra de forma rápida e eficaz, pode impedir a morte das células tumorais (Santivasi e Xia, 2013; Sousa *et al.*, 2015).

1.1.5. Sobrevida

Diversos fatores influenciam o tempo de sobrevida após o diagnóstico, como por exemplo, a idade do paciente, a extensão da ressecção, o grau histológico e o tratamento adjuvante (Wang *et al.*, 2019). A idade é considerada um fator de risco significativo para prever o prognóstico em pacientes com gliomas, mostrando correlação com menor sobrevida livre de doença e global, principalmente em pacientes com mais de 50 anos (Ohgaki e Kleihues, 2005; Ho *et al.*, 2014; Houshyari *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2017; Kumthekar *et al.*, 2017).

A ressecção máxima do tumor, além de contribuir na melhora dos sintomas e na qualidade de vida, favorece o aumento da sobrevida livre de doença e global, tanto nos GBG, quanto nos GAG (Almeida *et al.*, 2015; Duffau, 2016; Hervey-Jumper e Berger, 2016). Quanto à histologia, tumores de origem astrocítica têm comportamento mais agressivo, pior resposta ao tratamento e menor sobrevida em relação aos de origem oligodendroglioma (Louis *et al.*, 2007; Ostrom *et al.*, 2014). Os GBG apresentam sobrevida consideravelmente superior aos GAG, com tempo médio variando de 4 a 13 anos, dependendo do subtipo tumoral (Schomas *et al.*, 2009; Van den Bent, 2014), enquanto os GAG apresentam sobrevida de 12 a 26 meses (Stupp *et al.*, 2005; Houshyari *et al.*, 2015; Noiphithak e Veerasarn, 2017).

A quimioterapia em combinação com a radioterapia aumentou significativamente a taxa de sobrevida livre de doença e global em comparação

com pacientes tratados apenas com radioterapia (Stupp *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2017). Porém, mesmo com os avanços em relação aos tratamentos, o prognóstico dos gliomas permanece desfavorável e a taxa de recrescimento/recidiva é alta, sendo de aproximadamente 70% para pacientes com GBG e de 90% para os GAG (McNeill, 2016). Isso ocorre devido à heterogeneidade tumoral dos gliomas, mesmo os inicialmente sensíveis ao tratamento, exibem grande capacidade de desenvolver resistência (Dhermain, 2014; McNeill, 2016).

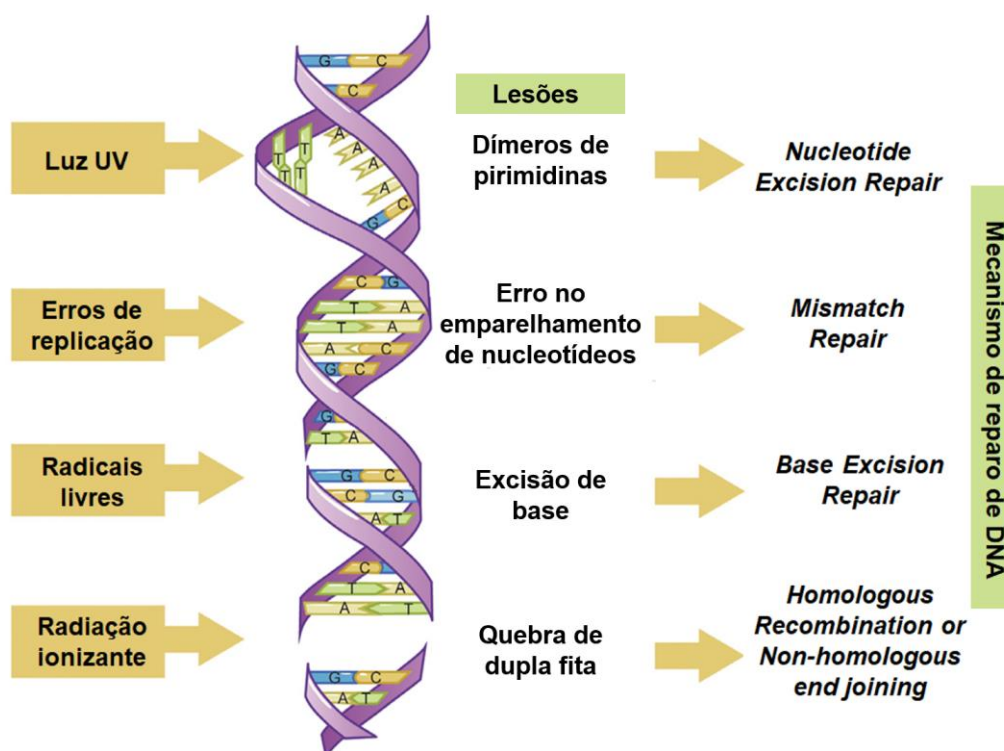
1.2. MECANISMOS DE REPARO DE DNA

A manutenção da integridade genômica e a proteção do DNA contra danos são processos importantes e necessários para o funcionamento e a sobrevivência celular. O dano ao DNA pode ser causado por diferentes fatores endógenos, como o estresse oxidativo provocado pela replicação e proliferação, assim como exposição a fatores exógenos, como luz UV, radiação ionizante ou produtos químicos mutagênicos. Devido ao acúmulo de danos ao DNA e ao impacto que causa na viabilidade celular, os organismos desenvolvem mecanismos para proteger a integridade do material genético, induzindo o reparo ou desencadeando a morte celular. O sistema de reparo do DNA é composto por proteínas que atuam de forma organizada para manter a estabilidade genômica, reparando erros de cópia, quebras espontâneas e outros tipos de alterações (Costa e Menck, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Karanam *et al.*, 2012).

Cada dano ao DNA requer um mecanismo de reparo específico. Agentes que causam distorções na dupla hélice ou dímeros de pirimidinas, geradas por

agentes exógenos, como a luz UV, são reconhecidas e removidas pelo reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide Excision Repair* - NER) (Gillet e Schärer, 2006). Erros no emparelhamento de nucleotídeos, decorrentes de falhas na replicação e recombinação de DNA, bem como de alguns tipos de modificação de bases, são reparados pelo reparo de incompatibilidade (*Mismatch Repair* - MMR) (Li, 2008). Lesões mais sutis, como as modificações de bases induzidas pelas espécies reativas de oxigênio (desaminações, alquilações ou oxidações), são removidas pelo reparo por excisão de base (*Base Excision Repair* - BER) (Kim e Wilson, 2012). As DSB são lesões altamente tóxicas à célula, causadas por radiação ionizante, radicais livres e durante a replicação do DNA, são reparadas por vias dependentes de recombinação homóloga (*Homologous Recombination* - HR) ou de junção de extremidades não-homólogas (*Non-homologous end joining* - NHEJ) (Belli *et al.*, 2002; Thompson e Schild, 2002). Ver Figura 2.

Figura 2. Danos ao DNA e mecanismos de reparo



Fonte: Adaptado de Gunes *et al.*, 2015.

O reparo defeituoso do DNA é comum na tumorigênese e desempenha um papel crítico na progressão do câncer. Defeitos nos genes de reparo e por consequência nas proteínas produzidas, podem levar a mutações gênicas, rearranjos cromossômicos e instabilidade genômica, fatores que contribuem para a carcinogênese (Phillips e McKinnon, 2007; Swaminathan *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2019). No entanto, no câncer, para a perpetuação das células cancerígenas é fundamental não haver excesso de danos, o que pode ocorrer devido ao aumento da expressão de genes e proteínas específicas de reparo de DNA. Este mecanismo explica porque proteínas envolvidas no reparo, principalmente as responsáveis pelas quebras de dupla fita, são superexpressas em tumores, tendo

como objetivo tornar as células tumorais estáveis geneticamente para se manterem vivas e proliferando (Sarasin e Kauffmann, 2008).

1.2.1. Recombinação homóloga (HR) e de junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)

Se as DSB não forem reparadas, podem resultar em perda maciça de informações genéticas, aberrações cromossômicas e, assim, contribuir para tumorigênese ou levar à morte celular (Mao *et al.*, 2008). A HR age unindo as duas fitas, utilizando o DNA de cromátides irmãs ou cromossomos homólogos como molde, tendo por consequência alta fidelidade, estando menos propensa a erros e levando a um reparo preciso (Belli *et al.*, 2002). A NHEJ age na ligação das extremidades das quebras de dupla fita, sem utilizar molde, podendo resultar em perda ou ganho de nucleotídeos, tendo por consequência maior potencial mutagênico (Thompson e Schild, 2002; Mao *et al.*, 2008). A eficiência da via de reparo é fortemente associada ao local onde houve a DSB no cromossomo e a ativação da via é determinada pela fase do ciclo celular e pela estrutura do DNA no local da quebra (Shrivastav *et al.*, 2008). A HR atua principalmente durante a fase S (sintética) e G2 (*gap 2*), enquanto a NHEJ pode ocorrer durante todo o ciclo celular (Brandsma e Gent, 2012).

Diversas proteínas estão envolvidas no reparo das DSB. Na HR, as principais são MRN (Mre11-RAD50-Nbs1), RPA (*replication protein A*), RAD51 (*DNA repair protein RAD51 homolog 1*), RAD52 (*DNA repair protein RAD52 homolog 2*), RAD54 (*DNA repair and recombination protein RAD54-like*), XRCC2 (*X-ray repair cross-complementing protein 2*) e XRCC3 (*X-ray repair cross-*

complementing protein) (Loignon *et al.*, 2007; Taleei *et al.*, 2012). Na NHEJ, Ku70 (*Ku antigen 70kDa*), Ku80 (*Ku antigen 80kDa*), DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), Artemis, *DNA ligase IV*, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) e XLF (*XRCC4-Like Factor*) (Mahaney *et al.*, 2009).

1.3. FAMÍLIA XRCC (*X-ray repair cross complementing*)

Os genes *X-ray repair cross-complementing* (XRCC) *XRCC1* a *XRCC7* desempenham um papel importante nos processos de reparação do DNA devido à sua capacidade de proteger células de danos causados por agentes endógenos e exógenos (Thacker e Zdzienicka, 2003). Quanto à atuação das proteínas da família XRCC no reparo de DNA, a XRCC1 (codificada pelo gene *XRCC1*) age na BER, a XRCC2 (codificada pelo gene *XRCC2*) e XRCC3 (codificada pelo gene *XRCC3*) na HR, a XRCC4 (codificada pelo gene *XRCC4*), a Ku70 (codificada pelo gene *XRCC6*), a Ku80 (codificada pelo gene *XRCC5*) e a DNA-PKcs (codificada pelo gene *XRCC7*) na NHEJ (Biard e Ângulo, 2007). Considerando as proteínas que agem no reparo às DSB, a XRCC2, XRCC3 e XRCC4 demonstram papel crítico na HR e NHEJ.

Diversos estudos mostram associação entre polimorfismos nos genes *XRCC2*, *XRCC3* e *XRCC4* com aumento de risco de desenvolver câncer de mama (Lee *et al.*, 2005), ovário (Auranen *et al.*, 2005), próstata (Nowacka-Zawisza *et al.*, 2015), pele (melanoma) (Han *et al.*, 2006) e tireoide (García-Quispes *et al.*, 2011). Além da associação com o câncer, desempenham papel na resistência dos

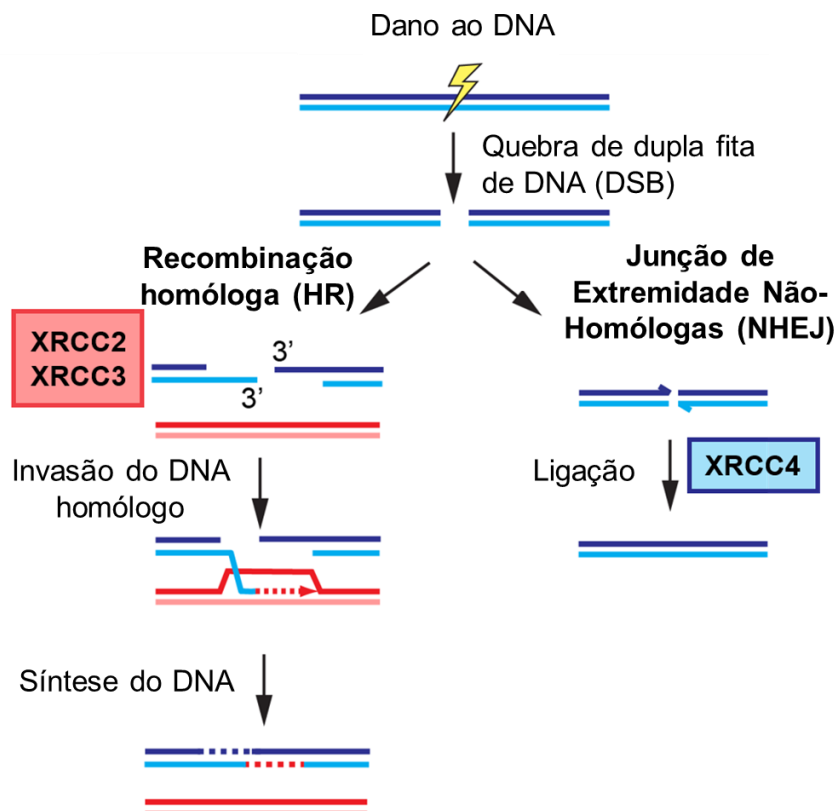
tumores aos tratamentos, demonstrando ser potenciais biomarcadores preditivos da eficácia da quimio e radioterapia (Borchiellini *et al.*, 2012).

Embora o papel dos fatores de risco ambientais na etiologia dos gliomas seja reconhecido, evidências sugerem que fatores genéticos, como alterações nos genes e proteínas envolvidos no reparo do DNA, podem desempenhar um papel importante na elucidação da origem desse tipo de tumor. A análise das proteínas XRCC2, XRCC3 e XRCC4 pode ser útil para compreender o comportamento na tumorigênese e progressão tumoral dos gliomas, assim como prever a sensibilidade do tumor ao tratamento (Zhu *et al.*, 2016; Hori *et al.*, 2017).

1.3.1. Proteína XRCC2

O gene *XRCC2* está localizado no braço longo do cromossomo 7, na região 36.1 e produz a proteína XRCC2, que é parte essencial da via de reparo HR, atua suprimindo anomalias espontâneas dos cromossomos, translocações e deleções (Cui *et al.*, 1999; Takata *et al.*, 2001; Jiao *et al.*, 2008; Curtin *et al.*, 2009). Ver figura 3.

Figura 3: Reparo de quebra de dupla fita de DNA (DSB) por recombinação homóloga (HR) ou junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)



Fonte: Adaptado de Peng *et al.*, 2011.

As células com deficiência da XRCC2 são hipersensíveis a uma variedade de agentes nocivos ao DNA que, direta ou indiretamente, produzem quebras de fita dupla no DNA, incluindo a radiação ionizante e os agentes quimioterápicos como a TMZ (Roos *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012). A presença da proteína XRCC2 mostrou-se essencial para o desenvolvimento neuronal normal e o silenciamento do gene *XRCC2* resultou no aumento da letalidade embrionária em camundongos (Deans *et al.*, 2000).

Mutações no gene *XRCC2* estão frequentemente associadas ao câncer, com envolvimento na tumorigênese através da regulação do reparo do DNA por

meio da via HR. Polimorfismos no gene estão associados ao aumento do risco de câncer de mama (Lin *et al.*, 2011; Kamali *et al.*, 2017), ovário (Zhai *et al.*, 2015; Kamali *et al.*, 2017; Smolarz *et al.*, 2019), colorretal (Wang *et al.*, 2018a) e tireoide (Sarwar *et al.*, 2016). Em câncer de mama e colorretal também mostra correlação com pior sobrevida (Lin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

Estudos que analisaram a expressão proteica da XRCC2 mostraram relação com agressividade tumoral (Lutz *et al.*, 2018), aumento da capacidade metastática e resistência ao tratamento quimio e radioterápico (Qin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017). Em cultura celular de câncer colorretal, a superexpressão da XRCC2 mostrou correlação com proliferação e inibição da apoptose (Xu *et al.*, 2014a). Estudos demonstram que a formação de tumores cerebrais é acelerada quando há perda de função da XRCC2, sugerindo que essa proteína pode agir como um supressor tumoral, impedindo a proliferação celular (Frappart *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2018).

Em gliomas, Custódio *et al.* (2012) evidenciaram que polimorfismos no genes XRCC2 podem contribuir para o aumento da suscetibilidade de desenvolver esses tumores, além de estarem associados à piora da sobrevida global dos pacientes. Zheng *et al.* (2012) descreveram superexpressão da XRCC2 em linhagens celulares e amostras tumorais de glioblastomas. O silenciamento do gene XRCC2 fez com que as células tumorais ficassem mais sensíveis à radioterapia, demonstrando que a proteína XRCC2 pode estar relacionada à resistência ao tratamento em glioblastomas.

1.3.2. Proteína XRCC3

O gene *XRCC3*, localizado no braço longo do cromossomo 14, codifica a proteína XRCC3 que é considerada um dos mais importantes componentes do sistema de reparo de DNA. A proteína atua na fase inicial da HR, interagindo com a proteína RAD51, procura por homologia na molécula não danificada e invade a cadeia para a síntese de DNA (Tebbs *et al.*, 1995; Brenneman *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2019). Ver figura 3.

Considerando o relevante papel na via HR da proteína XRCC3 e seu respectivo gene, estes são estudados por suas possíveis implicações no risco de câncer (Manuguerra *et al.*, 2006). Polimorfismos no gene são associados a aumento da suscetibilidade em câncer colorretal (Mehrzad *et al.*, 2019), pulmonar (Huang *et al.*, 2011), de células escamosas de orofaringe (Santos *et al.*, 2019a), osteossarcoma (Wang e Liu, 2018; Wang *et al.*, 2018b) e hepatocarcinoma (De Mattia *et al.*, 2017). Em carcinoma de tireoide, os polimorfismos mostraram relação com desenvolvimento e progressão (Lu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019b) e em hepatocarcinoma com agressividade tumoral (Avadanei *et al.*, 2018).

A proteína XRCC3 mostrou superexpressão no tecido tumoral quando comparada ao tecido normal adjacente e foi associada à menor sobrevida livre de doença e à resistência à quimioterapia em carcinoma de esôfago (Cheng *et al.*, 2015). Em câncer de mama, apresentou correlação com tumorigênese, progressão e invasão (Martinez-Marignac *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013).

Em gliomas, estudos demonstram que polimorfismos do gene *XRCC3* estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento desses tumores (Zhou

et al., 2009; Luo *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013a; Xu *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Roos *et al.* (2018) evidenciaram, através da técnica de *microarray* em cultura de células de gliomas, que a expressão de *XRCC3* aumenta com o grau do tumor e com a malignidade. Em glioblastomas, Roos *et al.* (2018) encontraram aumento significativo na expressão em comparação com o tecido normal. A proteína *XRCC3* demonstrou proteger as células de glioblastoma contra a morte celular induzida por TMZ, além de inibir o ciclo celular e a apoptose. Levando em conta o resultados obtidos, concluíram que a *XRCC3* é um alvo potencial para sensibilizar o tumor durante a terapia à base de TMZ.

1.3.3. Proteína *XRCC4*

O gene *XRCC4* está localizado no braço longo do cromossomo 5, na região 14.2 e produz uma proteína homônima, que forma um complexo com a *DNA ligase IV*, agindo na etapa final da junção das extremidades das fitas de DNA, desenvolvendo importante papel na NHEJ (Grawunder *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2008; Yano *et al.*, 2009). A desregulação da *XRCC4* pode reduzir a capacidade de reparar o DNA danificado, resultando em instabilidade genômica e mutações gênicas, o que pode levar à tumorigênese (Wu *et al.*, 2008). Ver figura 3.

Polimorfismos no gene *XRCC4* estão associados ao aumento de risco de tumores cerebrais pediátricos (Fahmideh *et al.*, 2016), câncer colorretal (Jin *et al.*, 2019), de mama (Singh *et al.*, 2018), de pâncreas (Ding e Li, 2015), renal (Margulis *et al.*, 2008) e gliomas (Liu *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013b; Jiao *et al.*, 2016; Xiu *et al.*, 2016). Estudos descrevem que a superexpressão da proteína *XRCC4* está envolvida na tumorigênese de câncer de esôfago (Hori *et al.*, 2017),

útero (Takada *et al.*, 2016) e mama (Wu *et al.*, 2008), além de modificar a sensibilidade das células cancerosas à quimio e radioterapia. Em glioblastomas, verificou-se que a proteína XRCC4 está associada à resistência à TMZ em cultura celular (Zeng *et al.*, 2018).

Estudos associam a proteína XRCC4 com menor sobrevida em pacientes com câncer de mama (Wen *et al.*, 2019), gástrico (Cheng *et al.*, 2017) e hepatocelular (Lu *et al.*, 2017), mostrando que pode ser considerado um fator prognóstico e uma ferramenta útil, contribuindo para o acompanhamento e manejo terapêutico dos pacientes.

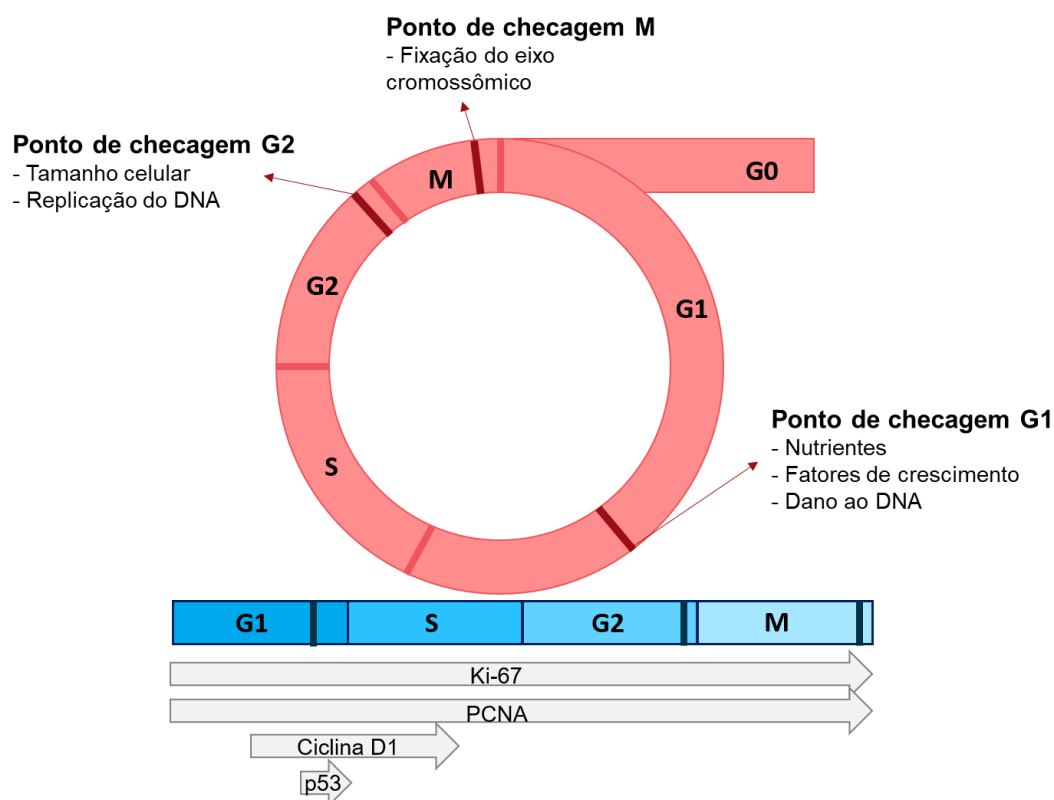
1.4. MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO

A proliferação celular é definida como o aumento do número de células resultante de um ciclo celular completo. O ciclo celular é dividido em quatro fases principais: aumento celular, produção dos componentes celulares para fase G1 (*gap 1*) e para fase S, período após a replicação do DNA (fase G2) e a fase M (mitótica) que resulta na divisão celular; células que não estão com o ciclo celular ativo, ou seja, em repouso, se encontram na fase G0 (*gap 0*), podendo permanecer nesta fase por tempo indeterminado (Malumbres *et al.*, 2009).

A proliferação é uma das características fundamentais do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011), quanto mais alta a atividade proliferativa de um tumor, maior será seu potencial de malignidade e pior será seu prognóstico (Maiti *et al.*, 2008). Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade proliferativa, entre estes podem ser citadas técnicas simples como a contagem de mitoses e

técnicas mais complexas como as de biologia molecular, citometria de fluxo e a coloração imuno-histoquímica, esta última, rotineiramente utilizada na patologia diagnóstica. A determinação imuno-histoquímica da atividade proliferativa é um complemento útil para estabelecer o diagnóstico histopatológico dos gliomas (Camplejohn, 2001; Núñez *et al.*, 2019). As proteínas Ki-67, p53, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e ciclina D1 atuam na manutenção do ciclo celular e são superexpressas em células cancerosas em comparação às células normais, tornando-se biomarcadores úteis, que auxiliam no diagnóstico de vários tipos de câncer (Hanahan e Weinberg, 2011; Juríková *et al.*, 2016). Ver Figura 4.

Figura 4. Ação de proteínas envolvidas na proliferação durante as fases do ciclo celular



Fonte: Adaptado de Bologna-Molina *et al.* 2013.

1.4.1. Proteína Ki-67

O antígeno Ki-67, cujo gene está localizado no cromossomo 10, atua no núcleo da célula e pode ser detectado nas fases ativas do ciclo celular, exceto na fase G₀, sendo sua expressão aumentada nas fases G₂ e M (Endl e Gerdes, 2000; Scholzen e Gerdes, 2000). O Ki-67 além de atuar na regulação do ciclo celular, tem papel importante na manutenção da heterocromatina e na montagem dos cromossomos mitóticos (Sun e Kaufman, 2018). É um indicador confiável da atividade de proliferação de células neoplásicas e é usado para investigação clínica de rotina (Jin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014). O índice de marcação Ki-67 (*labeling index*) é analisado a partir da porcentagem de núcleos tumorais positivos em relação a todos os núcleos e, geralmente, se correlaciona com o grau histológico do tumor (Prayson, 2005; Johannessen e Torp, 2006).

Em gliomas, a imunoexpressão da Ki-67 demonstrou correlacionar-se positivamente com o grau tumoral, com a pior sobrevida livre de doença e pior sobrevida global (Prayson, 2005; Johannessen e Torp, 2006; Chen *et al.*, 2015). A OMS não determina um ponto de corte para Ki-67 em gliomas, no entanto, uma revisão sistemática de 51 estudos, totalizando 4.307 pacientes, determinou Ki-67 <10% para GBG (graus I e II) e Ki-67 ≥10% para GAG (graus III e IV) (Chen *et al.*, 2015). Estudo que analisou glioblastomas (grau IV), demonstrou que pacientes cujos tumores apresentavam percentual de Ki-67 ≥22% tiveram pior sobrevida global (Wong *et al.*, 2019).

1.4.2. Proteína p53

A proteína p53 é codificada pelo gene *TP53* (gene codificador da proteína p53) localizado no braço curto do cromossomo 17, região 13.1, é uma fosfoproteína nuclear que atua como supressor tumoral, desempenhando papel importante na manutenção da homeostase celular, sobrevivência e integridade do genoma (Frum e Grossman, 2014; Kasthuber e Lowe, 2017). No ciclo celular, verifica a presença de erros de replicação no ponto de checagem G1, caso haja erro, a p53 bloqueia o processo de mitose, impossibilitando a divisão e ativando proteínas de reparo ou induzindo a morte celular por apoptose (Kasthuber e Lowe, 2017).

Alterações nos genes supressores tumorais geralmente causam diminuição ou até mesmo ausência na produção de suas respectivas proteínas. No entanto, as alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *TP53*, ao invés de levarem à perda de expressão, fazem com que haja ganho de função oncogênica e conseqüente acúmulo maciço de proteína p53 mutante (Frum e Grossman, 2014). A p53 mutada promove a proliferação, sobrevivência, migração e invasão das células tumorais e aumento da quimiorresistência (Yue *et al.*, 2017). Em células saudáveis, os níveis de proteína p53 são muito baixos ou até mesmo indetectáveis, sendo a superexpressão nas células cancerígenas considerada uma ferramenta útil no diagnóstico do câncer (Frum e Grossman, 2014; Rivlin *et al.*, 2011; Simabuco *et al.*, 2018).

A OMS não estabelece um ponto de corte para p53 em gliomas. Estudos propuseram um *cutoff* variando de $\geq 1\%$ a $>10\%$, porém os resultados não foram consistentes (Bouvier-Labit *et al.*, 1998; Hilton *et al.*, 1998). A mutação da proteína p53 é especialmente comum nos gliomas, estando envolvida na tumorigênese e

progressão deste tipo de tumor (Ichimura *et al.*, 2000). Em uma meta-análise que incluiu 1322 pacientes com gliomas a expressão de p53 mostrou-se significativamente associada ao grau e à sobrevida global, demonstrando que esse marcador pode ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico e prognóstico de pacientes com gliomas (Jin *et al.*, 2016).

1.4.3. Proteína PCNA

A PCNA é uma proteína, membro da família das ciclinas, tem estrutura em forma de anel que envolve a molécula de DNA, agindo como uma estrutura de ligação para a DNA polimerase e outras proteínas envolvidas nos processos de replicação e reparo do DNA (Bravo *et al.*, 1987; Naryzhny e Lee, 2007; Maiti *et al.*, 2008). Demonstra importante papel em outros processos celulares, como remodelamento da cromatina, coesão de cromátides irmãs e recrutamento de proteínas responsáveis pelo reparo de danos ao DNA (Kannouche *et al.*, 2004; De Medina-Redondo e Meraldi, 2011). No ciclo celular, a proteína PCNA é presente nas fases G1, S, G2 e M e, por causa de sua longa meia-vida (12h), pode ser detectada imuno-histoquimicamente até mesmo em células que acabaram de sair do ciclo celular (Garcia *et al.*, 1989; Allegranza *et al.*, 1991; Kannouche *et al.*, 2004; Mailand *et al.*, 2013).

Estudos sugerem que a PCNA pode ser uma ferramenta diagnóstica útil para avaliar a malignidade e o prognóstico de pacientes com gliomas (Tan *et al.*, 2003; Dai e Zhang, 2009), por estar intimamente associada à proliferação celular, a superexpressão demonstra relação com GAG e pior prognóstico (Zhu *et al.*, 2017). Lebelt *et al.* (2004) encontraram correlação positiva entre o tamanho do

tumor e a expressão imuno-histoquímica de PCNA em gliomas. Em estudo de Chalooob *et al.* 2012), a PCNA mostrou correlação com Ki-67, idade e grau em astrocitomas.

1.4.4. Proteína ciclina D1

A proteína ciclina D1 é codificada pelo gene *CCND1* (*gene encoding the cyclin D1 protein*), sendo este um dos genes mais amplificados nos cânceres sólidos (Beroukhim *et al.*, 2010). É a primeira ciclina a ser regulada por fatores de crescimento durante a fase G1, age como um mediador intracelular de sinais extracelulares que regulam a proliferação e tem um papel consistente na regulação do ciclo celular através da ativação das quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) (Sherr e Roberts, 2004). Células tumorais com alta expressão de ciclina D1 apresentam elevadas taxas de proliferação, associadas a uma menor necessidade de nutrientes (Body *et al.*, 2017).

Além da função oncogênica da ciclina D1, através do aumento da proliferação, conforme sua distribuição subcelular (nuclear, citoplasma, membrana mitocondrial externa) ela também pode regular a resposta ao dano no DNA (Li *et al.*, 2010; Jirawatnotai *et al.*, 2011), duplicação e estabilidade cromossômica (Zeng *et al.*, 2010; Casimiro *et al.*, 2012), senescência (Brown *et al.*, 2012), função mitocondrial (Sakamaki *et al.*, 2006; Tchakarska *et al.*, 2011) e migração (Neumeister *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006), ou seja, os principais processos biológicos de iniciação e manutenção do câncer (Body *et al.*, 2017).

A expressão de ciclina D1 é proporcional ao aumento da malignidade em gliomas (Zhang *et al.*, 2005), sendo significativamente mais expressa em GAG quando comparada com os GBG (Tan *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2014). A ciclina D1

apresenta correlação positiva com a PCNA em gliomas (Zhang *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2018), demonstraram que a superexpressão do gene *CCND1* em gliomas malignos induz quimiorresistência, o que sugere que a inibição deste gene, e por consequência da proteína ciclina D1, pode ser um meio eficaz de superar esta resistência.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, *et al.* Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991;419(5):417-23. DOI: 10.1007/bf01605076

Almeida JP, Chaichana KL, Rincon-Torroella J, Quinones-Hinojosa A. The value of extent of resection of glioblastomas: clinical evidence and current approach. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15(2):517-29. DOI: 10.1007/s11910-014-0517-x

Auranen A, Song H, Waterfall C, Dicioccio RA, Kuschel B, Kjaer SK, *et al.* Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk. *Int J Cancer.* 2005 Nov 20;117(4):611-8. DOI: 10.1002/ijc.21047

Avadanei ER, Giusca SE, Negura L, Caruntu ID. Single nucleotide polymorphisms of XRCC3 gene in hepatocellular carcinoma - relationship with clinicopathological features. *Pol J Pathol.* 2018;69(1):73-81. DOI: 10.5114/pjp.2018.75340

Belli M, Sabora O, Tabocchini MA. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res.* 2002 Dec;43 Suppl:S13-9. DOI: 10.1269/jrr.43.s13

Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010 Feb 18;463(7283):899-905. DOI: 10.1038/nature08822

Biard DSF, Angulo JF. Long-term RNA interference: Toward a set of isogenic human cells deficient in DNA repair genes. In: Landseer BR. *New Research on DNA Repair.* 1ª edição. New York: Nova Science Publisher; 2007. p. 191-217.

Body S, Esteve-Arenys A, Miloudi H, Recasens-Zorzo C, Tchakarska G, Moros A, *et al.* Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells. *Sci Rep.* 2017 Oct 24;7(1):13946-57. DOI: 10.1038/s41598-017-14222-1

Bohman LE, Swanson KR, Moore JL, Rockne R, Mandigo C, Hankinson T, *et al.* Magnetic resonance imaging characteristics of glioblastoma multiforme: implications for understanding glioma ontogeny. *Neurosurgery.* 2010 Nov;67(5):1319-27. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3181f556ab

Bologna-Molina R, Bedoya-Borella AM, Soria-Moreira L, Soría-Suárez S. Molecular biomarkers of cell proliferation in ameloblastomas. *World J Stomatol.* 2013 Nov 20;2(4):79-85. DOI: 10.5321/wjs.v2.i4.79

Borchiellini D, Etienne-Grimaldi MC, Thariat J, Milano G. The impact of pharmacogenetics on radiation therapy outcome in cancer patients. A focus on DNA damage response genes. *Cancer Treat Rev.* 2012 Oct;38(6):737-59. DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.02.004

Bose R, Narang KS, Bhangale D, Kedia R, Sharma V, Jha AN. Survival trends in glioma: Experience at a tertiary care center. *Neurol India*. 2017 Nov-Dec;65(6):1295-301. DOI: 10.4103/0028-3886.217968

Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella-Branger D. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998 Oct;24(5):381-8. DOI: 10.1046/j.1365-2990.1998.00137.x

Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr*. 2012 Nov 27;3(1):1-10. DOI: 10.1186/2041-9414-3-9

Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*. 1987 Apr 2-8;326(6112):515-7. DOI: 10.1038/326515a0

Brenneman MA, Wagener BM, Miller CA, Allen C, Nickoloff JA. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):387-95. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00595-6

Brown N, Carter T, Mulholland P. Adjuvant Chemotherapy is Indicated in Patients with Lower Grade Glioma. *Clin Oncol*. 2017 Mar;29(3):141-2. DOI: 10.1016/j.clon.2016.11.006

Brown NE, Jeselsohn R, Bihani T, Hu MG, Foltopoulou P, Kuperwasser C, *et al*. Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium. *Cancer Res*. 2012 Dec 15;72(24):6477-89. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4139

Cahill D, Turcan S. Origin of Gliomas. *Semin Neurol*. 2018 Feb;38(1):5-10. DOI: 10.1055/s-0037-1620238

Cai J, Yang P, Zhang C, Zhang W, Liu Y, Bao Z, *et al*. ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2551-61. DOI: 10.18632/oncotarget.1838

Camplejohn RS. Flow cytometric measurement of cell proliferation. *Methods Mol Med*. 2001;57:133-43. DOI: 10.1385/1-59259-136-1:133

Casimiro MC, Crosariol M, Loro E, Ertel A, Yu Z, Dampier W, *et al*. ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):833-43. DOI: 10.1172/JCI60256

Chaloob MK, Ali HH, Qasim BJ, Mohammed AS. Immunohistochemical Expression of Ki-67, PCNA and CD34 in Astrocytomas: A Clinicopathological Study. *Oman Med J*. 2012 Sep;27(5):368-74. DOI: 10.5001/omj.2012.93

Chan YL, Leung SF, King AD, Choi PH, Metreweli C. Late radiation injury to the temporal lobes: morphologic evaluation at MR imaging. *Radiology*. 1999 Dec;213(3):800-7. DOI: 10.1148/radiology.213.3.r99dc07800

Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(2):411-20. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.2.411

Chen Y, Li Z, Xu Z, Tang H, Guo W, Sun X, *et al*. Use of the XRCC2 promoter for in vivo cancer diagnosis and therapy. *Cell Death Dis*. 2018 Apr 1;9(4):420-31. DOI: 10.1038/s41419-018-0453-9

Cheng J, Liu W, Zeng X, Zhang B, Guo Y, Qiu M, *et al*. XRCC3 is a promising target to improve the radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2015 Dec;106(12):1678-86. DOI: 10.1111/cas.12820

Cheng L, Qiu L, Wang M, Zhang R, Sun M, Zhu X, *et al*. Functional genetic variants of XRCC4 and ERCC1 predict survival of gastric cancer patients treated with chemotherapy by regulating the gene expression. *Mol Carcinog*. 2017 Dec;56(12):2706-17. DOI: 10.1002/mc.22713

Costa RMA, Menck CFM. Genes de reparo de DNA. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 1ª edição. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 43-55.

Cui X, Brenneman M, Meyne J, Oshimura M, Goodwin EH, Chen DJ. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res*. 1999 Jun 23;434(2):75-88. DOI: 10.1016/s0921-8777(99)00010-5

Curtin K, Lin WY, George R, Katory M, Shorto J, Cannon-Al-bright LA, *et al*. Genetic Variants in XRCC2: New insights into colorectal cancer tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Sep; 18(9):2476-84. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0187

Custódio AC, Almeida LO, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JRW, Clara CA, *et al*. XRCC2 and XRRC4 Gene Polymorphism and Risk of Gliomas. *J Med Res*. 2012;1(1):6-13.

Dai R, Zhang S. Expressions and their significance of PTTG and PCNA proteins in glioma. *Chin Ger J Clin Oncol*. 2009;8(2):110-3. DOI: 10.1007/s10330-008-0159-z

Davis F, Il'yasova D, Rankin K, McCarthy B, Bigner DD. Medical diagnostic radiation exposures and risk of gliomas. *Radiat Res*. 2011 Jun;175(6):790-6. DOI: 10.1667/RR2186.1

Davis ME. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs*. 2018 Dec;34(5):420-9. DOI: 10.1016/j.soncn.2018.10.001

De Mattia E, Cecchin E, Polesel J, Bignucolo A, Roncato R, Lupo F, *et al*. Genetic biomarkers for hepatocellular cancer risk in a caucasian population. *World J Gastroenterol*. 2017 Sep 28;23(36):6674-84. DOI: 10.3748/wjg.v23.i36.6674

De Medina-Redondo M, Meraldi P. The spindle assembly checkpoint: Clock or domino? *Results Probl Cell Differ*. 2011;53:75-91. DOI: 10.1007/978-3-642-19065-0_4

Deans B, Griffin CS, Maconochie M, Thacker J. XRCC2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J*. 2000 Dec 15;19(24):6675-85. DOI: 10.1093/emboj/19.24.6675

Dhermain F. Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches. *Chin J Cancer*. 2014 Jan;33(1):16-24. DOI: 10.5732/cjc.013.10217

Ding Y, Li LN. Association between single nucleotide polymorphisms of X-ray repair cross-complementing protein 4 gene and development of pancreatic cancer. *Genet Mol Res*. 2015 Aug 14;14(3):9626-32. DOI: 10.4238/2015

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012;14 v1-v49. DOI: 10.1093/neuonc/nos218

Duffau H. Long-term outcomes after supratotal resection of diffuse low-grade gliomas: a consecutive series with 11-year follow-up. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016 Jan;158(1):51-8. DOI: 10.1007/s00701-015-2621-3

Endl E, Gerdes J. The Ki-67 Protein: Fascinating Forms and an Unknown Function. *Exp Cell Res*. 2000 Jun 15;257(2):231-7. DOI: 10.1006/excr.2000.4888

Fahmideh MA, Lavebratt C, Schüz J, Rööslı M, Tynes T, Grotzer MA, *et al*. Common genetic variations in cell cycle and DNA repair pathways associated with pediatric brain tumor susceptibility. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):63640-50. DOI: 10.18632/oncotarget.11575

Fan J, Liu W, Zhang M, Xing C. A literature review and systematic meta-analysis on XRCC3 Thr241Met polymorphism associating with susceptibility of oral cancer. *Oncol Lett*. 2019 Sep;18(3):3265-73. DOI: 10.3892/ol.2019.10609

Felini MJ, Olshan AF, Schroeder JC, Carozza SE, Miike R, Rice T, *et al*. Reproductive Factors and Hormone Use and Risk of Adult Gliomas. *Cancer Causes Control*. 2009 Feb;20(1):87-96. DOI: 10.1007/s10552-008-9220-z

Forst DA, Nahed BV, Loeffler JS, Batchelor TT. Low-Grade Gliomas. *Oncologist*. 2014 Apr;19(4):403-13. DOI: 10.1634/theoncologist.2013-0345

Frappart PO, Lee Y, Russell HR, Chalhoub N, Wang YD, Orii KE, *et al*. Recurrent genomic alterations characterize medulloblastoma arising from DNA double-strand break repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Feb;106(6):1880-5. DOI: 10.1073/pnas.0806882106

Frum RA, Grossman SR. Mechanisms of mutant p53 stabilization in cancer. *Subcell Biochem*. 2014;85:187-97. DOI: 10.1007/978-94-017-9211-0_10

Garcia R, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol.* 1989 Apr;134(4):733-9.

García-Quispes WA, Pérez-Machado G, Akdi A, Pastor S, Galofré P, Biarnés F, *et al.* Association studies of OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 polymorphisms with differentiated thyroid cancer. *Mutat Res.* 2011 May 10;709-10:67-72. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.003

Geurts M, van den Bent MJ. On high-risk, low-grade glioma: What distinguishes high from low? *Cancer.* 2019 Jan 15;125(2):174-6. DOI: 10.1002/cncr.31834

Gillet LCJ, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* 2006;106:253-76. DOI: 10.1021/cr040483f

Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012 Dec;205(12):613-21. DOI: 10.1016/j.cancergen.2012.10.009

Gousias K, Markou M, Voulgaris S, Goussia A, Voulgari P, Bai M, *et al.* Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005-2007. *Neuroepidemiology.* 2009;33(2):89-95. DOI: 10.1159/000222090

Grawunder U, Zimmer D, Kulesza P, Lieber MR. Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J Biol Chem.* 1998 Sep 18;273(38):24708-14. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24708

Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2015 Sep;31(3):309-19. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.010

Han S, Zhang HT, Wang Z, Xie Y, Tang R, Mao Y, *et al.* DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. *Eur J Hum Genet* 2006;14:1136-44. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201681

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013

Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Apr 30;(4):CD007415. DOI: 10.1002/14651858.CD007415.pub2

Hervey-Jumper SL, Berger MS. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J Neurooncol.* 2016 Nov;130(2):269-82. DOI: 10.1007/s11060-016-2110-4

Hilton DA, Love S, Barber R, Ellison D, Sandeman DR. Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumors to radiotherapy. *Neurosurgery.* 1998 Apr;42(4):724-9. DOI: 10.1097/00006123-199804000-00021

Ho VK, Reijneveld JC, Enting RH, Bienfait HP, Robe P, Baumert BG, *et al.* Changing incidence and improved survival of gliomas. *Eur J Cancer*. 2014 Sep;50(13):2309-18. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.05.019

Hori M, Someya M, Matsumoto Y, Nakata K, Kitagawa M, Hasegawa T, *et al.* Influence of XRCC4 expression in esophageal cancer cells on the response to radiotherapy. *Med Mol Morphol*. 2017 Mar;50(1):25-33. DOI: 10.1007/s00795-016-0144-5

Houshyari M, Hajalikhani F, Rakhsha A, Hajian P. A Comparative Study of Survival Rate in High Grade Glioma Tumors Being Treated by Radiotherapy Alone Versus Chemoradiation With Nitrosourea. *Glob J Health Sci*. 2015 Mar 25;7(6):33-8. DOI: 10.5539/gjhs.v7n6p33

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. *Fertil Steril*. 2008;90:1417-23. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.038

Hu J, Wang N, Wang YJ. XRCC3 and RAD51 Expression Are Associated with Clinical Factors in Breast Cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e72104. DOI: 10.1371/journal.pone.0072104

Huang JY, Yang JF, Qu Q, Qu J, Liu F, Liu FE, *et al.* DNA repair gene XRCC3 variants are associated with susceptibility to glioma in a Chinese population. *Genet Mol Res*. 2015 Sep 8;14(3):10569-75. DOI: 10.4238/2015

Huang M, Chen X, Qiu Y, Fan L, Chen J, Cai L. Relationship between XRCC3 gene polymorphisms and lung cancer. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2011 Mar;40(2):187-90.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):417-24.

Jhaveri J, Cheng E, Tian S, Buchwald Z, Chowdhary M, Liu Y, *et al.* Proton vs. Photon Radiation Therapy for Primary Gliomas: An Analysis of the National Cancer Data Base. *Front Oncol*. 2018;8:440-50. DOI: 10.3389/fonc.2018.00440

Jiao K, Qin J, Zhao Y, Zhang H. Genetic effects of XRCC4 and ligase IV genes on human glioma. *Neuroreport*. 2016 Sep 28;27(14):1024-30. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000649

Jiao L, Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, *et al.* XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*. 2008 Feb;103(2):360-7. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01615.x

Jin D, Zhang M, Hua H. Impact of polymorphisms in DNA repair genes XPD, hOGG1 and XRCC4 on colorectal cancer risk in a Chinese Han Population. *Biosci Rep*. 2019;39(1):1-9. DOI: 10.1042/BSR20181074

Jin Q, Zhang W, Qiu XG, Yan W, You G, Liu YW, *et al.* Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Sep;124(17):2584-8.

Jin Y, Xiao W, Song T, Feng G, Dai Z. Expression and Prognostic Significance of p53 in Glioma Patients: A Meta-analysis. *Neurochem Res*. 2016 Jul;41(7):1723-31. DOI: 10.1007/s11064-016-1888-y

Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F, *et al.* A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature*. 2011 Jun 8;474(7350):230-4. doi: 10.1038/nature10155

Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(3):143-7. DOI: 10.1007/bf02893360

Juríková M, Danihel L, Polák Š, Varga I. Ki-67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*. 2016 Jun;118(5):544-52. DOI: 10.1016/j.acthis.2016.05.002

Kabat GC, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Rohan TE. Reproductive Factors and Exogenous Hormone Use and Risk of Adult Glioma in Women in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Cancer*. 2011 Feb 15;128(4):944-50. DOI: 10.1002/ijc.25413

Kamali M, Hamadani S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Shehneh MZ, Gilani MM, *et al.* Association of XRCC2 rs3218536 Polymorphism with Susceptibility of Breast and Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(7):1743-9. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.7.1743

Kang Z, Yang Q, Li Y. DNA Repair in Cancer. *J Oncol*. 2019 Jul 24;2019:8676947. DOI: 10.1155/2019/8676947

Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell*. 2004 May 21;14(4):491-500. DOI: 10.1016/s1097-2765(04)00259-x

Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell*. 2012 Jul 27;47(2):320-9. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.052

Kastenhuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1062-78. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.028

Khan MN, Sharma AM, Pitz M, Loewen SK, Quon H, Poulin A, *et al.* High-grade glioma management and response assessment-recent advances and current challenges. *Curr Oncol*. 2016 Aug;23(4):e383-91. DOI: 10.3747/co.23.3082

Kim YJ, Wilson DM. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*. 2012 Jan;5(1):3-13. DOI: 10.2174/1874467211205010003

Kovacs GG. Cellular reactions of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:13-23. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00003-1

Kumthekar P, Patel V, Bridge C, Rademaker A, Helenowski I, Mrugala MM, *et al*. Prognosis of older patients with low-grade glioma: A retrospective study. *Integr Cancer Sci Ther*. 2017;4(5):1-5. DOI: 10.15761/ICST.1000255

Lara-Velazquez M, Al-Kharboosh R, Jeanneret S, Vazquez-Ramos C, Mahato D, Tavanaiepour D, *et al*. Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults. *Brain Sci*. 2017 Dec 20;7(12):1-16. DOI: 10.3390/brainsci7120166

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, Auvinen A. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*. 2007 Jul; 9(3):319-25. DOI: 10.1215/15228517-2007-016

Lawrence YR, Shi W, Dicker AP. From survival to survivorship: late side effects become an issue in high-grade glioma. *Expert Rev Neurother*. 2010 Oct;10(10):1493-5. DOI: 10.1586/ern.10.123

Lebelt A, Szkudlarek M, Guzińska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Dzieciol J. Proliferative activity of chosen central nervous system (CNS) neoplasms. *Rocz Akad Med Białymst*. 2004;49(1):242-3.

Lee KM, Choi JY, Kang C, Kang CP, Park SK, Cho H, *et al*. Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2005;11:4620-6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2534

Li G. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18:85-98. DOI: 10.1038/cr.2007.115

Li Z, Jiao X, Wang C, Ju X, Lu Y, Yuan L, *et al*. Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27KIP1. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9986-94. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1596

Li Z, Jiao X, Wang C, Shirley LA, Elsaleh H, Dahl O, *et al*. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8802-11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0312

Lim DA, Cha S, Mayo MC, Chen MH, Keles E, VandenBerg S, *et al*. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro Oncol* 2007;9(4):424-9. DOI: 10.1215/15228517-2007-023

Lin WY, Camp NJ, Cannon-Albright LA, Allen-Brady K, Balasubramanian S, Reed MW, *et al*. A role for XRCC2 gene polymorphisms in breast cancer risk and survival. *J Med Genet*. 2011 Jul;48(7):477-84. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100018

Lin ZH, Chen JC, Wang YS, Huang TJ, Wang J, Long XD. DNA repair gene XRCC4 codon 247 polymorphism modified diffusely infiltrating astrocytoma risk and prognosis. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 27;15(1):250-60. DOI: 10.3390/ijms15010250

Liu Y, Tang K, Yan W, Wang Y, You G, Kang C, *et al*. Identifying Ki-67 specific miRNA-mRNA interactions in malignant astrocytomas. *Neurosci Lett*. 2013 Jun 24;546:36-41. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.04.030

Liu Y, Zhou K, Zhang H, Shugart YY, Chen L, Xu Z, *et al*. Polymorphisms of LIG4 and XRCC4 involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma. *Hum Mutat*. 2008 Mar;29(3):381-9. DOI: 10.1002/humu.20645

Loignon M, Amrein L, Dunn M, Aloyz R. XRCC3 depletion induces spontaneous DNA breaks and p53-dependent cell death. *Cell Cycle*. 2007 Mar 1;6(5):606-11. DOI: 10.4161/cc.6.5.3923

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al*. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, *et al*. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1

Lu J, Wang XZ, Zhang TQ, Huang XY, Yao JG, Wang C, *et al*. Prognostic significance of XRCC4 expression in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Oct 20;8(50):87955-70. DOI: 10.18632/oncotarget.21360

Lu W, Wu G, Zhang B. Association Between X-Ray Cross-complementing Group 3 (XRCC3) Thr241Met Polymorphism and Risk of Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2015 Dec 21;21:3978-85. DOI: 10.12659/msm.895165

Luo KQ, Mu SQ, Wu ZX, Shi YN, Peng JC. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of glioma and meningioma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):449-52. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.1.449

Lutz BS, Leguisamo NM, Cabral NK, Gloria HC, Reiter KC, Agnes G, *et al*. Imbalance in DNA repair machinery is associated with BRAFV600E mutation and tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Sep 5;472:140-8. DOI: 10.1016/j.mce.2017.12.004

MacDonald SM, Ahmad S, Kachris S, Vogds BJ, DeRouen M, Gittleman AE, *et al*. Intensity modulated radiation therapy versus three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of high grade glioma: a dosimetric comparison. *J Appl Clin Med Phys*. 2007 Spring;8(2):47-60. DOI: 10.1120/jacmp.v8i2.2423

Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*. 2009 Feb 1;417(3):639-650. DOI: 10.1042/BJ20080413

Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 May;14(5):269-82. DOI: 10.1038/nrm3562

Maiti AK, Ghosh K, Chatterjee U, Chakrobari S, Chatterjee S, Basu S. Epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in astrocytomas. *Neurol India*. 2008 Oct-Dec;56(4):456-62. DOI: 10.4103/0028-3886.44827

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66. DOI: 10.1038/nrc2602

Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, *et al*. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006 Aug 15;164(4):297-302. DOI: 10.1093/aje/kwj189

Mao Z, Bozella M, Selaunov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Oct 1;7(10):1765-71. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018

Maquilan G, Grover S, Alonso-Basanta M, Lustig RA. Acute toxicity profile of patients with low-grade gliomas and meningiomas receiving proton therapy. *Am J Clin Oncol*. 2014 Oct;37(5):438-43. DOI: 10.1097/COC.0b013e31827de86b

Margulis V, Lin J, Yang H, Wang W, Wood CG, Wu X. Genetic susceptibility to renal cell carcinoma: the role of DNA double-strand break repair pathway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Sep;17(9):2366-73. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0259

Martinez-Marignac VL, Rodrigue A, Davidson D, Couillard M, Al-Moustafa AE, Abramovitz M, *et al*. The effect of a DNA repair gene on cellular invasiveness: XRCC3 over-expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2011 Jan 24;6(1):e16394. DOI: 10.1371/journal.pone.0016394

McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2016 Nov;34(4):981-98. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.014

Mehrzad J, Dayyani M, Khorasani ME. Polymorphisms of XRCC3 and XRCC7 and Colorectal Cancer Risk in Khorasan Razavi Province, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Jul 1;20(7):2153-8. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2153

Michalski JP, Kothary R. Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front Cell Neurosci*. 2015 Sep 1;9:1-11. DOI: 10.3389/fncel.2015.00340

Minniti G, Scaringi C, De Sanctis V, Lanzetta G, Falco T, Di Stefano D, *et al*. Hypofractionated stereotactic radiotherapy and continuous low-dose temozolomide in patients with recurrent or progressive malignant gliomas. *J Neurooncol*. 2013 Jan;111(2):187-94. DOI: 10.1007/s11060-012-0999-9

Naryzhny SN, Lee H. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: there is no cancer-associated form of PCNA. *FEBS Lett*. 2007 Oct 16;581(25):4917-20. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.09.022

Nayak L, Reardon DA. High-grade gliomas. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017 Dec;23(6, Neuro-oncology):1548-63. DOI: 10.1212/CON.0000000000000554

Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, *et al*. Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol Biol Cell*. 2003 May;14(5):2005-15. DOI: 10.1091/mbc.02-07-0102

Noiphithak R, Veerasarn K. Clinical predictors for survival and treatment outcome of high-grade glioma in Prasat Neurological Institute. *Asian J Neurosurg*. 2017 Jan-Mar;12(1):28-33. DOI: 10.4103/1793-5482.148791

Nowacka-Zawisza M, Wiśnik E, Wasilewski A, Skowrońska M, Forma E, Bryś M, *et al*. Polymorphisms of homologous recombination RAD51, RAD51B, XRCC2, and XRCC3 genes and the risk of prostate cancer. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2015;2015:828646. DOI: 10.1155/2015/828646

Núñez FJ, Mendez FM, Garcia-Fabiani MB, Pardo J, Edwards M, Lowenstein PR, *et al*. Evaluation of Biomarkers in Glioma by Immunohistochemistry on Paraffin-Embedded 3D Glioma Neurosphere Cultures. *J Vis Exp*. 2019 Jan 9;143:1-13. DOI: 10.3791/58931

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005;109:93-108. DOI: 10.1007/s00401-005-0991-y

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, *et al*. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*. 2014;16:896-913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087

Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, *et al*. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol*. 2019 Nov 1;21(5):v1-v100. DOI: 10.1093/neuonc/noz150

Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. 2018 Oct 1;20(4):iv1-iv86. DOI: 10.1093/neuonc/noy131

Peng G, Lin SY. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;2(2):73-9. DOI: 10.5306/wjco.v2.i2.73

Phillips ER, McKinnon PJ. DNA double-strand break repair and development. *Oncogene*. 2007 Dec 10;26(56):7799-808. DOI: 10.1038/sj.onc.1210877

Pouratian N, Asthagiri A, Jagannathan J, Shaffrey ME, Schiff D. Surgery Insight: the role of surgery in the management of low-grade gliomas. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007 Nov;3(11):628-39. DOI: 10.1038/ncpneuro0634

Prayson RA. The utility of MIB-1/Ki-67 immunostaining in the evaluation of central nervous system neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 2005 May;12(3):144-8. DOI: 10.1097/01.pap.0000163957.21409.52

Qin CJ, Song XM, Chen ZH, Ren XQ, Xu KW, Jing H, *et al.* XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):32193-204. DOI: 10.18632/oncotarget.4975

Qu DW, Xu HS, Han XJ, Wang YL, Ouyang CJ. Expression of cyclin D1 and Ki-67 proteins in gliomas and its clinical significance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(4):516-9.

Rasmussen BK, Hansen S, Laursen RJ, Kosteljanetz M, Schultz H, Nørgård BM, *et al.* Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol*. 2017 Dec;135(3):571-9. DOI: 10.1007/s11060-017-2607-5

Redmond KJ, Mehta M. Stereotactic Radiosurgery for Glioblastoma. *Cureus*. 2015 Dec;7(12):e413. DOI: 10.7759/cureus.413

Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011;2:466-74. DOI: 10.1177/1947601911408889

Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, *et al.* Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J*. 2006 Jan 11;25(1): 222-31. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600914

Roos WP, Frohnapfel L, Quiros S, Ringel F, Kaina B. XRCC3 contributes to temozolomide resistance of glioblastoma cells by promoting DNA double-strand break repair. *Cancer Lett*. 2018 Jun 28;424:119-26. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.03.025

Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Naumann SC, Kiedron O, Zdzienicka MZ, *et al.* Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Jan 1;8(1):72-86. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.09.003

Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I. Long-term followup for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res*. 2005 Apr;163(4):424-32. DOI: 10.1667/rr3329

Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, *et al.* Cyclin D1 determines mitochondrial function *in vivo*. *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(14):5449-69. DOI: 10.1128/MCB.02074-05

Sanai N, Berger MS. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb;15(2):112-25. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.171

Santacroce A, Kamp MA, Budach W, Hänggi D. Radiobiology of Radiosurgery for the Central Nervous System. *Biomed Res Int*. 2013;2013:362761. DOI: 10.1155/2013/362761

Santivasi WL, Xia F. The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors. *Cell Biosci.* 2013 Feb 6;3(1):10-5. DOI: 10.1186/2045-3701-3-10

Santos EM, Santos HBP, de Matos FR, Machado RA, Coletta RD, Galvão H, *et al.* Clinicopathological significance of SNPs in RAD51 and XRCC3 in oral and oropharyngeal carcinomas. *Oral Dis.* 2019a Jan;25(1):54-63. DOI: 10.1111/odi.12943

Santos LS, Gomes BC, Bastos HN, Gil OM, Azevedo AP, Ferreira TC, *et al.* Thyroid Cancer: The Quest for Genetic Susceptibility Involving DNA Repair Genes. *Genes (Basel).* 2019b Aug 1;10(8):1-31. DOI: 10.3390/genes10080586

Sarasin A, Kauffmann A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):49-55. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.12.002

Sarwar R, Bashir K. Association of Promoter Polymorphisms in XRCC2 Gene Involved in DNA Double Strand Break Repair and Increased Susceptibility to Thyroid Cancer Risk in Pakistani Population. *J Carcinog Mutagen.* 2016;7:1-9. DOI: 10.4172/2157-2518.1000265

Sarwar R, Mahjabeen I, Bashir K, Saeed S, Kayani MA. Haplotype Based Analysis of XRCC3 Gene Polymorphisms in Thyroid Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(1):22-33. DOI: 10.1159/000477109

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9

Schomas DA, Laack NN, Rao RD, Meyer FB, Shaw EG, O'Neill BP, *et al.* Intracranial low-grade gliomas in adults: 30-year experience with long-term follow-up at Mayo Clinic. *Neuro Oncol.* 2009;11:437-45. DOI: 10.1215/15228517-2008-102

Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004;18:2699-711. DOI: 10.1101/gad.1256504

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):134-47. DOI: 10.1038/cr.2007.111

Simabuco FM, Morale MG, Pavan ICB, Morelli AP, Silva FR, Tamura RE. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget.* 2018 May 4; 9(34): 23780-823. DOI: 10.18632/oncotarget.25267

Singh PK, Mistry KN, Chiramana H, Rank DN, Joshi CG. Exploring the deleterious SNPs in XRCC4 gene using computational approach and studying their association with breast cancer in the population of West India. *Gene.* 2018; 655:13-19. DOI: 10.1016/j.gene.2018.02.040

Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol.* 2019;10:1-10. DOI: 10.3389/fphar.2019.01114

Smolarz B, Michalska MM, Samulak D, Romanowicz H, Wójcik L. Polymorphism of DNA Repair Genes via Homologous Recombination (HR) in Ovarian Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(4):1607-14. DOI: 10.1007/s12253-019-00604-5

Sourati A, Ameri A, Malekzadeh M. Hair Loss. In: Sourati A, Ameri A, Malekzadeh M. *Acute Side Effects of Radiation Therapy*. 1ª edição. Cham: Springer Nature; 2017. p.21-5.

Sousa JF, Di Cristofaro LF, Serafim RB, Netto RP, Souza FO, Soares CP, *et al.* A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2015;36(2):213-8.

Steed TC, Treiber JM, Patel K, Ramakrishnan V, Merk A, Smith AR, *et al.* Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget* 2016;7(18):24899-907. DOI: 10.18632/oncotarget.8551

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459-66. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. DOI: 10.1056/NEJMoa043330

Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018 Jun;127(2):175-86. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8

Swaminathan U, Joshua E, Rao UK, Ranganathan K. Expression of p53 and cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: an immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012 May-Aug;16(2):172-7. DOI: 10.4103/0973-029X.98451

Sze CI, Su WP, Chiang MF, Lu CY, Chen YA, Chang NS. Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. *Front Oncol.* 2013 Mar;(3):1-6. DOI: 10.3389/fonc.2013.00059

Taal W, Bromberg JEC, van den Bent MJ. Chemotherapy in glioma. *CNS Oncol.* 2015 May; 4(3): 179-92. DOI: 10.2217/cns.15.2

Takada Y, Someya M, Matsumoto Y, Satoh M, Nakata K, Hori M, *et al.* Influence of Ku86 and XRCC4 expression in uterine cervical cancer on the response to preoperative radiotherapy. *Med Mol Morphol.* 2016 Dec;49(4):210-16. DOI: 10.1007/s00795-016-0136-5

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, *et al.* Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2858-66. DOI: 10.1128/MCB.21.8.2858-2866.2001

Taleei R, Weinfeld M, Nikjoo H. Single strand annealing mathematical model for double strand break repair. *J Mol Eng Syst Biol.* 2012;1:1-10. DOI:10.7243/2050-1412-1-1

Tan PG, Li ZQ, Cai WQ, Lu JP, Xie FS, Weng Y. Expression of nm23 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in human brain gliomas and their significance. *Ai Zheng.* 2003 Oct;22(10):1077-80.

Tan PG, Xing Z, Li ZQ. Expression of cyclin D1 in brain gliomas and its significance. *Ai Zheng.* 2004;23(1):63-5.

Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B Cells. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1690-9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2564

Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, *et al.* Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Jul;92(14):6354-8. DOI: 10.1073/pnas.92.14.6354

Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst).* 2003 Jun 11;2(6):655-72. DOI: 10.1016/s1568-7864(03)00062-4

Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res.* 2002 Nov 30;509(1-2):49-78. DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00224-5

Van den Bent MJ. Practice changing mature results of RTOG study 9802: another positive PCV trial makes adjuvant chemotherapy part of standard of care in low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2014;16(12):1570-4. DOI: 10.1093/neuonc/nou297

Wang J, Hu G, Quan X. Analysis of the Factors Affecting the Prognosis of Glioma Patients. *Open Med (Wars).* 2019;14:331-5. DOI: 10.1515/med-2019-0031

Wang L, Ma J, Yang B, Jing F, Hu Y. XRCC2 Polymorphisms and Environmental Factors Predict High Risk of Colorectal Cancer. *Med Sci Monit.* 2018a;24:2858-63. DOI: 10.12659/MSM.904935

Wang R, Li M, Gao WW, Gu Y, Guo Y, Wang G, *et al.* Quantitative assessment of the association between XRCC3 C18607T polymorphism and glioma risk. *Tumour Biol.* 2014 Feb;35(2):1101-5. DOI: 10.1007/s13277-013-1147-7

Wang X, Liu Z. Systematic meta-analysis of genetic variants associated with osteosarcoma susceptibility. *Medicine (Baltimore).* 2018b Sep;97(38):e12525. DOI: 10.1097/MD.00000000000012525

Wang Y, Wang G, Dong Z. Association of X-ray cross-complementing group 3 Thr241Met gene polymorphism with osteosarcoma risk and its development and prognosis. *J Cancer Res Ther.* 2018 Dec;14(Supplement):S1178-S1182. DOI: 10.4103/0973-1482.199435

Wen Y, Dai G, Wang L, Fu K, Zuo S. Silencing of XRCC4 increases radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Biosci Rep.* 2019 Mar 29; 39(3):BSR20180893. DOI: 10.1042/BSR20180893

Wong E, Nahar N, Hau E, Varikatt W, Gebiski V, Ng T, *et al.* Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2019 Feb;15(1):5-9. DOI: 10.1111/ajco.12826

Wu CN, Liang SY, Tsai CW, Bau DT. The role of XRCC4 in carcinogenesis and anticancer drug discovery. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2008;3:209-19. DOI: 10.2174/157489208786242304

Xiu C, He Q, Zou P, Zhang H. XRCC4 rs1805377 polymorphism increases glioma risk in Asian populations. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(6):10211-9.

Xu G, Wang M, Xie W, Bai X. DNA repair gene XRCC3 Thr241Met polymorphism and susceptibility to glioma: A case-control study. *Oncol Lett.* 2014b Aug;8(2):864-8. DOI: 10.3892/ol.2014.2192

Xu K, Song X, Chen Z, Qin C, He Y, Zhan W. XRCC2 promotes colorectal cancer cell growth, regulates cell cycle progression, and apoptosis. *Medicine (Baltimore).* 2014a Dec;93(28):e294. DOI: 10.1097/MD.0000000000000294

Yan L, Li Q, Li X, Ji H, Zhang L. Association Studies Between XRCC1, XRCC2, XRCC3 Polymorphisms and Differentiated Thyroid Carcinoma. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(3):1075-84. DOI: 10.1159/000443058

Yano K, Morotomi-Yano K, Adachi N, Akiyama H. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. *J Radiat Res.* 2009 Mar;50(2):97-108. DOI: 10.1269/jrr.08119

Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J Mol Biol.* 2017 Jun 2;429(11):1595-606. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.030

Zeng A, Wei Z, Yan W, Yin J, Huang X, Zhou X, *et al.* Exosomal Transfer of miR-151a Enhances Chemosensitivity to Temozolomide in Drug-resistant Glioblastoma. *Cancer Lett.* 2018 Nov 1;436:10-21. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.08.004

Zeng X, Shaikh FY, Harrison MK, Adon AM, Trimboli AJ, Carroll KA, *et al.* The Ras oncogene signals centrosome amplification in mammary epithelial cells through cyclin D1/Cdk4 and Nek2. *Oncogene.* 2010 Sep 9;29(36):5103-12. DOI: 10.1038/onc.2010.253

Zhai M, Wang Y, Jiang MF. Arg188His polymorphism in the XRCC2 gene and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015 Sep 9;14(3):10808-15. DOI: 10.4238/2015.September.9.19

Zhang D, Dai D, Zhou M, Li Z, Wang C, Lu Y, *et al*. Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2496-508. DOI: 10.1159/000495920

Zhang X, Zhao M, Huang AY, Fei Z, Zhang W, Wang XL. The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J Clin Neurosci*. 2005 Feb;12(2):166-8. DOI: 10.1016/j.jocn.2004.03.036

Zhang YZ, An JH, Liu YX, Wu XC, Han SS, Ren XQ, *et al*. XRCC2-deficient cells are highly sensitive to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(3):1207-19. DOI: 10.1159/000481762

Zhao B, Ye J, Li B, Ma Q, Su G, Han R. DNA repair gene XRCC3 Thr241Met polymorphism and glioma risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2013a;6(6):438-43.

Zhao P, Zou P, Zhao L, Yan W, Kang C, Jiang T, *et al*. Genetic polymorphisms of DNA double-strand break repair pathway genes and glioma susceptibility. *BMC Cancer*. 2013b May 10;13:234-41. DOI: 10.1186/1471-2407-13-234

Zheng Z, Ng WL, Zhang X, Olson JJ, Hao C, Curran WJ, *et al*. RNAi-mediated targeting of noncoding and coding sequences in DNA repair gene messages efficiently radiosensitizes human tumor cells. *Cancer Res*. 2012 Mar 1;72(5):1221-8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2785

Zhou K, Liu Y, Zhang H, Liu H, Fan W, Zhong Y, *et al*. XRCC3 haplotypes and risk of gliomas in a Chinese population: a hospital-based case-control study. *Int J Canc*. 2009;124(12):2948-53. DOI: 10.1002/ijc.24307

Zhu B, Cheng D, Li S, Zhou S, Yang Q. High Expression of XRCC6 Promotes Human Osteosarcoma Cell Proliferation through the β -Catenin/Wnt Signaling Pathway and Is Associated with Poor Prognosis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul;17(7):1-12. DOI: 10.3390/ijms17071188

Zhu Z, Xiu Q, Han L, Li Z, Tian Y. The effect of astragalus polysaccharide on the expression of PCNA and GFAP protein in C6 glioma rat model. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(12):16057-63.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o padrão de expressão imuno-histoquímica de XRCC2, XRCC3 e XRCC4, Ki-67, p53, PCNA e ciclina D1 em gliomas e associar com variáveis clínicas e patológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

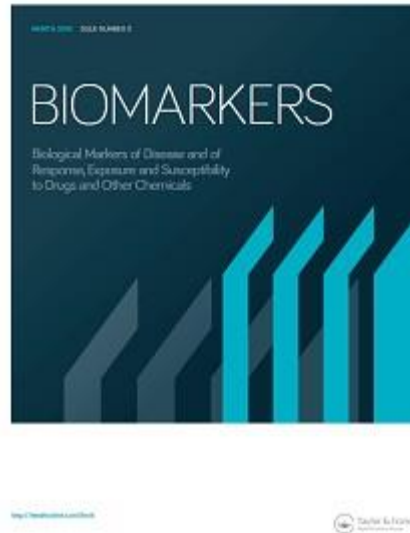
- 1) Avaliar as variáveis: sexo, idade, grau histológico, sintomas, localização, tamanho do tumor, taxa de sobrevida livre de doença e taxa de sobrevida global e correlaciona-las entre si.
- 2) Avaliar a expressão das proteínas envolvidas no reparo de DNA: XRCC2, XRCC3 e XRCC4 através da técnica de imuno-histoquímica.
- 3) Avaliar a expressão das proteínas envolvidas na proliferação celular: Ki-67, p53, PCNA e ciclina D1 através da técnica de imuno-histoquímica
- 4) Relacionar a expressão imuno-histoquímica das proteínas envolvidas no reparo de DNA com as proteínas envolvidas na proliferação celular.
- 5) Associar os resultados obtidos com as variáveis: sexo, idade, grau histológico, sintomas, localização, tamanho do tumor, taxa de sobrevida livre de doença e taxa de sobrevida global.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

**“Immunohistochemical expression of DNA repair markers in gliomas:
correlation with clinical data and proliferation markers”**

Bárbara Roberta Ongaratti, Camila Batista de Oliveira Silva, Geraldine Trott,
Anita Machado Maciel, Carolina Garcia Soares Leães Rech, Lígia Maria
Barbosa Coutinho, Nelson Pires Ferreira, Miriam da Costa Oliveira, Júlia
Fernanda Semmelmann Pereira-Lima

Enviado para publicação na Revista “Biomarkers”



Immunohistochemical expression of DNA repair markers in gliomas: correlation with clinical data and proliferation markers

Journal:	<i>Biomarkers</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Ongaratti, Bárbara; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Silva, Camila; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Trott, Geraldine; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Maciel, Anita; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia</p> <p>Rech, Carolina; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Coutinho, Lígia; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia</p> <p>Ferreira, Nelson; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Oliveira, Miriam ; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p> <p>Pereira-Lima, Júlia; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Patologia; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre</p>
Keywords:	gliomas, DNA repair, proliferation, immunohistochemistry

Immunohistochemical expression of DNA repair markers in gliomas: correlation with clinical data and proliferation markers

Bárbara Roberta Ongaratti^{a,b*}, Camila Batista de Oliveira Silva^{a,b}, Geraldine Trott^{a,b}, Anita Machado Maciel^b, Carolina Garcia Soares Leães Rech^a, Lígia Maria Barbosa Coutinho^b, Nelson Pires Ferreira^a, Miriam da Costa Oliveira^{a,b}, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima^{a,b}

^a *Neuroendocrinology Center, Santa Casa of Porto Alegre-ISCMPA/UFCSPA, Rua Professor Annes Dias, 295, CEP: 90020-090 Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.*

***Corresponding Author:**

Bárbara R. Ongaratti

Graduate Program in Pathology

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245

CEP 90050-170

Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55-51-994144809

b.ongaratti@gmail.com

Word count: 3788 (main text)

Abstract word count: 199

Number of figures: 4

Number of tables: 2

Abstract

Gliomas correspond to 80% of malignant tumors of the central nervous system. Despite progress in characterizing the pathogenesis, these tumors remain incurable and, in most cases, resistant to treatments. Studies suggest that the DNA damage repair system is correlated with tumorigenesis and progression in gliomas. We evaluated the immunohistochemical expression of the markers involved in DNA repair XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and the cell proliferation markers Ki-67, p53, PCNA, and cyclin D1 and their relationship with clinical variables in gliomas. Thirty-nine patients were included, with a mean age of 52 ± 12.8 years, 59% men, and 82% of the cases were high-grade gliomas (HGG). DNA repair proteins XRCC2 and XRCC3 were expressed in all cases and XRCC4 in 97.4% of cases. Strong XRCC4 expression was correlated with lower overall survival ($p=0.009$). PCNA expression showed a positive correlation with that of XRCC3 ($p=0.019$). The predominance of expression of XRCC2, XRCC3, and XRCC4, demonstrates that the repair pathways by homologous recombination and non-homologous end-joining are activated in gliomas regardless of grade. The correlation between PCNA expression and XRCC3 demonstrates that these proteins act in consonance in the HR pathway in gliomas. XRCC4 is a potential predictor of overall survival in patients with gliomas.

Keywords: gliomas, DNA repair, proliferation, immunohistochemistry

1 Introduction

Gliomas are tumors that occur in the central nervous system (CNS), corresponding to approximately 26% of primary brain tumors and 80% of malignant ones in adults (Ostrom *et al.* 2018). Surgical resection is the main choice for the treatment of gliomas of any grade, which may be followed by radiotherapy (RTX) and chemotherapy with temozolomide (TMZ). Despite the advances, the prognosis remains unfavorable and the rate of recurrence-regrowth is high, being approximately 70% for patients with low-grade gliomas (grades I and II) (LGG) and 90% for high-grade gliomas (grades III and IV) (HGG) (McNeill 2016), in which the average survival is 14 months. Age is considered the most significant risk factor for predicting the prognosis in patients with gliomas (Ohgaki and Kleihues 2005).

The DNA repair system plays an important role in maintaining genomic stability, besides having a critical role in tumor genesis and progression (Sousa *et al.* 2019). DNA double-strand breaks (DSB) are highly damaging to the cell and are repaired through homologous recombination (HR) or by non-homologous end joining (NHEJ) (Santivasi and Xia 2013). Several studies associate polymorphisms in the genes involved in HR (X-ray repair cross-complementing 2 (XRCC2), X-ray repair cross-complementing 3 (XRCC3)) and NHEJ (X-ray repair cross-complementing 4 (XRCC4)) with greater susceptibility to develop gliomas (Custódio *et al.* 2012, Luo *et al.* 2013, Lin *et al.* 2014). Characterizing the behavior of proteins, products of these genes, in gliomas, may represent a new option for the development of predictive biomarkers of tumorigenesis and tumor recurrence-regrowth.

Proliferation is one of the fundamental characteristics of tumors (Hanahan and Weinberg 2011). Tumor proliferative activity can be identified through altered expression of cell cycle-related proteins such as Ki-67, p53, proliferating cell nuclear

antigen (PCNA) and cyclin D1. Overexpression of these proteins in tumor cells makes them useful biomarkers in the diagnosis and planning of therapy to be followed (Juríková *et al.* 2016).

This study aimed to evaluate the expression of proteins involved in DNA repair XRCC2, XRCC3 and XRCC4 and proteins involved in cell proliferation Ki-67, p53, PCNA and cyclin D1, through the IHC technique, and the possible relationships between them with clinical and histological data in a series of gliomas.

2 Materials and methods

In this cross-sectional study, 39 patients, older than 18 years, without previous treatments, underwent surgical resection by the same neurosurgeon. The informed consent form was obtained from all patients, and the study was approved by the Research Ethics Committee of ISCMPA (Nº. 1.442.321) and UFCSPA (Nº.1.500.599), guaranteeing anonymity and conducting the research per the Helsinki Declaration.

The samples were included for convenience between the years 2016 and 2019. The diagnosis of glioma was confirmed after analysis of the anatomopathological examination, with all cases being reviewed by an experienced neuropathologist. The hematoxylin and eosin technique was applied to determine the appropriate fragment for IHC analysis.

Clinical data (age, sex, symptoms, tumor location, size, recurrence-regrowth, and death) were obtained by reviewing medical records. Gliomas were classified according to grade (I to IV) according to the World Health Organization (WHO) (Louis *et al.* 2016). The tumor location was obtained from radiological images (computed tomography or magnetic resonance) and classified according to Larjavaara *et al.* (2007) in lobes

(frontal, temporal, parietal and occipital) and other anatomical sites (ventricles, cerebellum, brainstem, nuclei of the base and thalamus). The size was determined from the largest axis (one-dimensional method) (Therasse *et al.* 2000). The extent of the resection was characterized by the surgical description and the postoperative image and classified as partial resection when there was tumor residue, and in total resection, in the absence of tumor residue (Pino *et al.* 2018). Recurrence was considered tumor appearance after total resection and regrowth as an increase in the residual tumor after partial resection. Follow-up time was calculated from the date of surgery. The disease-free survival rate was defined as the time between surgery and recurrence-regrowth or the last follow-up and overall survival as the time relapsed between surgery and death or the last follow-up.

2.1 Immunohistochemistry (IHC)

Tumor samples (n= 39) were fixed in 10% formalin for 24 hours and embedded in paraffin. The blocks were sectioned at 4 μ m and placed on slides treated with organosilane. Antigenic recovery was performed with tris-EDTA (pH= 9) for all markers at 98°C for 40 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked using 5% hydrogen peroxide in methanol. Blocking of non-specific proteins was performed with BSA (Bovine Serum Albumin) at 1%. For the negative control, the primary antibody was replaced by a saline solution.

To detect protein expression of DNA repair markers, the sections were incubated with Invitrogen® antibodies for anti-XRCC2 (PA5-32643; 1:100), anti-XRCC3 (MA116545, clone 10F1/6; 1:8) and anti-XRCC4 (PA5-22044; 1:30). Thyroid cancer, breast cancer, and testis were used as positive controls, respectively.

For the proliferation markers, the antibodies Dako® Ki-67 (M7240, clone MIB-1; 1:150), p53 (M7001, clone DO-7; 1:150) and cyclin D1 (M3635, clone SP4; 1:100) and Chemicon® PCNA antibody (MAB424, clone PC10; 1:1000) were used. As a positive control, lung cancer was used for p53 and tonsil for the others.

The incubation with the primary antibody was performed overnight at 4°C and that of the secondary antibody (K4061, Dako® EnVision + Dual Link System + HRP) was performed at room temperature for 40 minutes. The antigen-antibody complex was visualized through the chromogen DAB (3,3-diaminobenzidine) (K3468, Dako®, Liquid DAB+Substrate Chromogen System). Counterstaining was performed using Harris' hematoxylin. The slides were finished and assembled with Entellan®.

For the analysis of the IHC marking, vascular components, inflammatory and necrotic areas were excluded. All slides were evaluated by two independent observers, blinded to clinical and histopathological data. In cases where disagreement occurred, a joint analysis was established between the two observers to obtain consensus in the evaluation.

The cytoplasmic marking of XRCC2 and XRCC3 was analyzed through the complete scan of each slide and the product was considered as the result of the percentage of marked cells (0= ≤10%; 1= 11-25%; 2= 26-50%; 3= 51-75%; 4=>75%) and the intensity of staining (0= negative staining; 1= weak staining; 2= moderate staining; 3= strong staining), the score ranging from 0 to 12 (Hu *et al.* 2013a). XRCC4 expression was evaluated as the product between the percentage of positive nuclei (0= negative; 1= ≤10%, 2= 11-50%, 3= 51-80%, 4=>80%) and the intensity of the staining (0= negative staining, 1= weak staining, 2= moderate staining, 3= strong staining), the score ranging from 0 to 12 (Shao *et al.* 2014). For XRCC2, XRCC3, and XRCC4 we considered the score of 1-3 to be weak, 4-8 to moderate, and 9-12 to strong.

For the proliferation markers Ki-67, p53, PCNA and cyclin D1, the marking index was used, in which positivity was defined by counting tumor cells with immunostained nuclei in relation to the totality of cells. Due to tumor characteristics such as necrosis areas and vascular proliferation, we standardized the selection of five hot spots for each case, these were photographed at 100X magnification, and at least 500 cells were counted, with the help of the ImageJ® software.

2.2 Statistical analysis

Quantitative variables were described as mean and standard deviation or median and interquartile range (p25-p75), according to their distribution, according to the Kolmogorov-Smirnov normality test. Qualitative variables were expressed through frequency and percentage. The correlations between the quantitative variables were verified by Spearman's correlation test and between the qualitative variables the Chi-square test or Fisher's exact test were used. Comparisons between quantitative and qualitative variables were assessed by Student's t-test or Mann-Whitney U test, depending on the distribution. The disease-free survival time estimate and survival graphs were generated using the Kaplan-Meier curves. Associations between clinical and pathological characteristics with disease-free time were assessed using Cox regression analysis with the respective Hazard Ratios (HR), with a 95% confidence interval. The level of significance adopted was $p < 0.05$. The analyzes were performed with SPSS version 25.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA).

3 Results

Thirty-nine patients were included in the study, with a mean age of 52 ± 12.8 years (range 18-70), with a higher frequency in males (59%). Regarding the grade, four

patients had grade I glioma (10.2%), three grade II (7.7%), six grade III (15.4%), and 26 grade IV (66.7%). The cases were dichotomized into low-grade gliomas (LGG) (grades I and II) and high-grade gliomas (HGG) (grades III and IV) for statistical analysis. The most frequent subtypes were glioblastoma (66.7%), anaplastic oligodendroglioma (12.8%), and pilocytic astrocytoma (7.7%). Regarding cell origin, the LGG were 5 astrocytic and 2 ependymal and the HGG were 27 astrocytic and 5 oligodendroglial.

The main symptoms presented at diagnosis were headache (48.7%), seizure (20.5%), and limb paralysis (17.9%). Regarding location, 81.6% of the tumors were located in the cerebral lobes (frontal 39.5%, parietal 21.1%, temporal 18.4% and occipital 2.6%), while 18.4% in other anatomical regions (ventricles 8%, cerebellum 2.6%, brainstem 2.6%, nuclei of the base 2.6% and thalamus 2.6%). The mean tumor size was 4.4 ± 1.6 cm, ranging from 0.8 to 7 cm, 23 tumors (59%) were < 5 cm.

Regarding surgical resection, 31 patients (79.5%) underwent partial resection, 17 (54.8%) presented lesion regrowth with a median of 6.8 months (4.2-14), ranging from 2 to 22.4 months. Eight patients (20.5%) underwent total resection, three (37.5%) presented recurrence with a mean of 11.3 ± 3 months. After surgery, 23 patients remained under observation, eight underwent radiation therapy, seven underwent radiation and chemotherapy, and one patient received only chemotherapy.

Twenty-three patients (58.9%) died, 13 patients (56.5%) due to post-surgical complications of the first surgery, with a median of 1.5 months (0.6-2.4), varying from 3 days to 3.1 months. The other ten patients (43.5%) presented lesion recurrence-regrowth with a median of 6 months (4-7.5), ranging from 2.8 to 14 months and death with a median of 9 months (7-14.5), ranging from 4.7 to 18.7 months. Table 1.

The median follow-up of the sample was 7.1 months (1.5-14.5), the median recurrence-regrowth free survival was 9.8 months (95% CI 3-16.5) and the overall survival 7.4 months (95% CI 2.6-12). According to the Kaplan-Meier curve, disease-free survival was 70% in 6 months, 45.8% in 12 months, and 20.4% in 18 months. See Figure 1.

There was a higher frequency of partial resection in patients with HGG (90.3% vs 50%; $p = 0.022$). HGG patients were, on average, 13 years older (54.3 ± 11 vs 41.6 ± 16 ; $p = 0.015$). Women had more HGG than men (93.8% vs 73.9%), but without a statistical difference ($p = 0.206$). The tumors located in the lobes were HGG in 90.3% and other anatomical regions 42.9%, with statistically significant difference ($p = 0.013$).

Disease-free survival was related to age. The probability of recurrence-regrowth at any time is approximately five times higher in the group >50 years (HR: 4.9; 95% CI: 1.3-17.8; $p = 0.017$). See Figure 2. There was no statistical significance between disease-free survival and other clinical and histological data.

Considering the results of IHC, 100% of the cases were positive for XRCC2, 6 (15.4%) with weak staining, 13 (33.3%) moderate and 20 (51.3%) strong; 100% for XRCC3, 6 (15.4%) with weak staining, 23 (59%) moderate and 10 (25.6%) strong; and 97.4% for XRCC4, with 12 (31,6%) weak staining, 21 (55,3%) moderate and 5 (13,1%) strong. We found no statistical significance between DNA repair markers when correlated with each other. The distribution of DNA repair proteins marking concerning grades is shown in Table 2.

There was no significant association between the expression of DNA repair proteins and age, sex, grade, size, and location. There was a significant correlation between lower overall survival and strong XRCC4 marking ($p = 0.009$). See Figure 3 and Table 3.

There was no correlation between overall survival and the other clinical, histological variables, XRCC2, and XRCC3.

All cases were positive for Ki-67 with a median of 20% (5%-40%), ranging from 1 to 60%. For p53, 82% of the cases showed positive marking, with a median of 16% (9.7%-33.4%), ranging from 5 to 90%. There was a significant positive correlation between p53 and Ki-67 ($p= 0.026$), showing that the expression of both is directly proportional. Ki-67 and p53 marking showed no significant association with age, sex, size, location and survival, other proliferation markers, and DNA repair markers.

PCNA was positive in 97.4% of the cases, with a median of 36.9% (24.3%-50.6%), varying from 8 to 70%. Cyclin D1 was positive in 56.4% of the cases, with a median of 23.5% (16.5%-41.3%), ranging from 8 to 82. Patients' age showed a significant positive correlation with PCNA ($p = 0.045$) and cyclin D1 ($p= 0.016$). There was a correlation between the expression of PCNA and that of XRCC3 ($p= 0.019$). No statistically significant association was found between the expression of PCNA and cyclin D1 and the other clinical, histological, Ki-67, p53, XRCC2, and XRCC4 variables. The distribution of the labeling of proteins involved in proliferation according to the tumor grade is shown in Table 4.

4 Discussion

We evaluated a series of 39 gliomas, which were presented concerning the age of the patients, a predominance of the male gender, and distribution of histological grades in agreement with the literature (Ostrom *et al.* 2018, Mahzouni and Taheri 2019).

In our sample, 81.6% of the tumors were located in the lobes, a result similar to that found by Larjavaara *et al.* (2007), in which 85.7% of the gliomas were in the same

location. The anatomical distribution may suggest the tumor subtype, in addition to influencing the choice of the surgical approach and the patient's prognosis (Larjavaara *et al.* 2007).

The tumor size varied from 0.8 to 7 cm, with an average of 4.4 ± 1.6 cm, similar to that of Rasmussen *et al.* (2017), who found an average of 4.5 cm in a series of 1930 gliomas. In our sample, 59% of the patients had tumors considered small (<5 cm), a result according to that found by Rasmussen *et al.* (2017). Size is a factor to be considered for the surgical approach, along with tumor location. However, the relationship between size and tumor grade and survival was not significant in our sample, a result also found by Wang *et al.* (2019).

We found a significant association between location and tumor grade, tumors located in the lobes being HGG in 90.3% of the cases and other anatomical regions 42.9%. Studies that evaluated HGG and LGG showed that the most frequent location of HGG is in the brain lobes, while LGG is in areas such as the brainstem and cerebellum (Forst *et al.* 2014, Altieri *et al.* 2017).

In our study, age showed a significant difference concerning grade, patients with HGG were, on average, 13 years older than patients with LGG. This data was also observed by Deng *et al.* (2018), with an average of 15 years of difference between patients with HGG and LGG. Changes related to the cell of origin, the brain microenvironment, the accumulation of mutations and the reduction of immune surveillance are factors that increase the incidence of gliomas, especially in patients >50 years (Cahill and Turcan 2018).

The median follow-up time in our study was 7.1 months, a data similar to that found by Ochirjav *et al.* (2019) (8 months) and Law *et al.* (2008) (11 months) whose studies

analyzed LGG and HGG. Twenty patients (51.3%) presented tumor recurrence-regrowth, according to the findings by Andrade *et al.* (2015) and Fathallah-Shaykh *et al.* (2019), which found rates of 41.4% and 60.7% in patients with gliomas. In our sample, the occurrence of recurrence-regrowth was approximately 5 times higher in the group >50 years, a result similar to that described in the studies by Ho *et al.* (2014) and Bose *et al.* (2017). We found rates of 70% (6 months), 45.8% (12 months) and 20.4% (18 months), higher in the first year, but similar at 18 months to those found by Bose *et al.* (2017) 28.5% (6 months), 28% (12 months) and 19.5% (18 months) that analyzed 471 cases of gliomas.

The overall survival was 7.4 months (2.6-12), a result similar to that found by Stetson *et al.* (2016) (9.4 months) and Bose *et al.* (2017) (11.5 months). During the follow-up period, 23 patients (58.9%) died, according to what was found in the literature, which shows 45.2% to 80.5% (Bose *et al.* 2017, Wang *et al.* 2019).

Genomic instability is present in tumorigenesis, but for the perpetuation of cancer cells there should be no excessive damage, and, for this not to happen, there may be an increase in the expression of specific DNA repair proteins and genes. This mechanism explains why the proteins involved in the repair, especially those responsible for DSB, are overexpressed in tumors, to make tumor cells genetically stable to remain alive and proliferate (Sarasin and Kauffmann 2008).

All cases were positive for XRCC2, with 84.6% with moderate and strong marking. In colorectal and thyroid cancer, marking occurs in 62% and 100% of cases (Zhang *et al.* 2017, Lutz *et al.* 2018). In our sample, we found no correlation between XRCC2 and clinical variables, data also described by Lutz *et al.* (2018) and Zhang *et al.* (2017). Overexpression of XRCC2 promotes proliferation and inhibits apoptosis in cell culture

(Xu *et al.* 2014) and, in colorectal cancer, it increases metastatic capacity and correlates with lower overall and disease-free survival (Zhang *et al.* 2017).

The XRCC3 marking was positive in all cases, with 84.6% with moderate and strong marking. Studies have found 100% positivity in gastric and breast cancer, with 65% and 32% of strong marking (Hu *et al.* 2013a, Cheng *et al.* 2015). In our study, no correlation was found between XRCC3 expression and clinical variables, the same findings described by Hu *et al.* (2013a) in breast cancer. In gastric cancer, there was a correlation with lower disease-free survival, which was not evidenced in our study (Cheng *et al.* 2015).

For XRCC4, 97.4% of the cases showed expression, 6.6% with moderate and strong marking, which is compatible data with those found in glioblastomas and hepatocarcinomas with expression in 100% of the cases, with the latter showing strong marking in 57% (Sakata *et al.* 2001, Lu *et al.* 2017). The cases with strong XRCC4 marking showed a significant correlation with lower overall survival, a median of 30 days, being 7.4 months the median of the sample. The lowest overall survival related to the IHC expression of XRCC4 has already been described in gastric, hepatocellular, and breast cancer (Cheng *et al.* 2017, Lu *et al.* 2017, Wen *et al.* 2019). The association between XRCC4 and lower overall survival in gliomas was also described by Lin *et al.* (2014) when analyzing polymorphisms of this gene. XRCC4 expression was not associated with any other variable, data also described in a study that evaluated patients with prostate cancer (Shao *et al.* 2018).

In normal cells, proliferation and apoptosis are controlled by proteins that act on cell cycle control. Changes in these proteins can lead to uncontrolled proliferation, an important characteristic of tumor cells (Nguyen *et al.* 2000). In gliomas, proliferation

can provide useful information about tumor progression and patient prognosis (Hu *et al.* 2013b).

In our study, Ki-67 was positive in all cases, 49% with marking $\geq 30\%$, similar to that of Skjulsvik *et al.* (2014). There was a statistically significant difference between the grades, the HGG with a median of 30 % and LGG of 2%, data very similar to those found in other studies with gliomas, 19% vs 3% (Belghali *et al.* 2017) and 26% vs 1% (Sharma *et al.* 2018). We found no correlation between Ki-67 expression and other clinical variables, a result similar to the study by Chaloob *et al.* (2012) in which there was no correlation with the sex of the patients and location of the tumors, but was significantly associated with age. A meta-analysis concluded that Ki-67 overexpression is correlated with worse disease-free survival and overall survival in patients with gliomas (Chen *et al.* 2015), data not evidenced in our study.

The p53 protein was positive in 82% of the cases, 35% with $\geq 30\%$ labeling, in agreement with the results described by Liang *et al.* (2020) and Takami *et al.* (2015), who found 75.6% and 100 % positivity in gliomas. We found a positive correlation between p53 and tumor grade, HGG with a median of 14% and the LGG of 0%. This difference was also found by Belghali *et al.* (2017) (15% vs 3%) and Sharma *et al.* (2018) (48% vs 0.5%). Sharma *et al.* (2018) found an association between p53 expression and worse overall survival, data not evidenced in our study. There was a significant positive correlation between the expression of Ki-67 and p53. This result corroborates that found by Belghali *et al.* (2017) and Sharma *et al.* (2018) in gliomas.

PCNA was positive in 97.4% of cases, 59% with $\geq 30\%$ marking, according to the findings in gliomas by Chaloob *et al.* (2012) and Chen *et al.* (2013), in which all cases were positive for PCNA. Our work showed a positive correlation between PCNA expression and patient's age, a result also found by Chaloob *et al.* (2012). We found no

correlation between the expression of PCNA and the grade, a result evidenced by Chen *et al.* (2013) in gliomas.

The cyclin D1 was expressed in 56.4% of cases, 23% with $\geq 30\%$ marking, similar to Mahzouni and Taheri (2019) which found 60% positivity. We found a positive correlation between cyclin D1 and the age of the patients, also evidenced by Andrade *et al.* (2015) in a series of gliomas. The expression of cyclin D1 was correlated with the grade of gliomas (Andrade *et al.* 2015, Mahzouni and Taheri 2019), but this result was not found in our study.

Our work is the first to show a correlation between PCNA and XRCC3 DNA repair protein in gliomas through IHC. XRCC3 acts in the initial phase of HR, looking for homology in the undamaged strand and promoting DNA synthesis, requiring the presence of the PCNA protein, which acts as a hook for the DNA polymerase to bind and produce the strand (Brenneman *et al.* 2002, Santivasi and Xia 2013, Juríková *et al.* 2016). The correlation between PCNA expression and XRCC3 demonstrates that these proteins act in concert on the HR pathway in gliomas.

In conclusion, the expression of XRCC2, XRCC3, and XRCC4 in almost all cases, with a predominance of moderate and strong marking, demonstrates that the repair pathways by HR and NHEJ are activated in gliomas regardless of grade. The correlation between PCNA and XRCC3 expression indicates that these proteins act in consonance on the HR pathway in gliomas. Considering that the overexpression of XRCC4 showed a significant correlation with lower overall survival, the IHC analysis of this marker may contribute to the follow-up and therapeutic management of patients with gliomas. As a limitation of the study, the authors point out the difficulty of obtaining a numerically more significant sample, which prevented multivariate statistical analysis.

Declaration of interest:

The authors report no declaration of interest.

Funding

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

References

- Altieri, R., *et al.* 2017. Tumor location and patient age predict biological signatures of high-grade gliomas. *Neurosurg Rev*, 41 (2), 599-604. <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0899-8>
- Andrade, F., *et al.* 2015. Immunohistochemical expression of cyclin D1 is higher in supratentorial ependymomas and predicts relapses in gross total resection cases, *Neuropathology*. 35 (4), 312-323. <https://doi.org/10.1111/neup.12195>
- Belghali, M.Y., *et al.* 2017. Glial fibrillary acidic protein, CD34, Ki-67, and p53 immunohistochemistry expression study to estimate the concordance between the morphology and the awarded grades of the brain gliomas. *Clin Cancer Investig J*, 6 (1), 44-50. https://doi.org/10.4103/ccij.cci_148_16
- Bose, R., *et al.* 2017. Survival trends in glioma: Experience at a tertiary care center. *Neurol India*. 65 (6), 1295-1301. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.217968>.
- Brenneman M.A., *et al.* 2002. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*, 10 (2), 387-395. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00595-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00595-6)
- Cahill, D. and Turcan, S. 2018. Origin of Gliomas. *Semin Neurol*. 38 (1), 5-10. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1620238>
- Chaloob, M.K., *et al.* 2012. Immunohistochemical Expression of Ki-67, PCNA and CD34 in Astrocytomas: A Clinicopathological Study. *Oman Med J*, 27 (5), 368-374. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.93>

- Chen, W.J., *et al.* 2015. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis, *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (2), 411-420. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.2.411>
- Chen, Z., *et al.* 2013. Deregulated expression of the clock genes in gliomas. *Technol Cancer Res Treat*, 12 (1), 91-97. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500250>
- Cheng, L., *et al.* 2017. Functional genetic variants of XRCC4 and ERCC1 predict survival of gastric cancer patients treated with chemotherapy by regulating the gene expression. *Mol Carcinog*, 56 (12), 2706-2717. <https://doi.org/10.1002/mc.22713>
- Cheng, S., *et al.* 2015. Association of XRCC3 gene rs861539 polymorphism with gastric cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (2), 1911-1919.
- Custódio, A.C., *et al.* XRCC2 and XRRC4 Gene Polymorphism and Risk of Gliomas. *J Med Res*, 1 (1), 6-13.
- Deng, L., *et al.* 2018. Association between IDH1/2 mutations and brain glioma grade, *Oncol Lett*, 16 (4), 5405-5409. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9317>
- Fathallah-Shaykh, H.M., *et al.* 2019. Diagnosing growth in low-grade gliomas with and without longitudinal volume measurements: A retrospective observational study, *PLoS Med*, 16 (5), e1002810. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002810>
- Forst, D.A., *et al.* 2014. Low-Grade Gliomas. *Oncologist*, 19 (4), 403-413. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0345>
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Ho, V.K., *et al.* 2014. Changing incidence and improved survival of gliomas. *Eur J Cancer*, 50 (13), 2309-2318. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.05.019>
- Hu, J., Wang, N., Wang, Y.J. 2013. XRCC3 and RAD51 Expression Are Associated with Clinical Factors in Breast Cancer. *PLoS One*, 8 (8), e72104. <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0072104>

Hu, X., *et al.* 2013. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncol Lett*, 6 (1), 130-134. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1317>.

Juríková, M., *et al.* 2016. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 118 (5), 544-552. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>

Larjavaara, S., *et al.* 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*, 9 (3), 319-325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>

Law, M., *et al.* 2008. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *Radiology*, 247 (2), 490-498. <https://doi.org/10.1148/radiol.2472070898>

Liang, J., *et al.* 2020. Prognostic factors of patients with Gliomas - an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer*. 20 (1), 35-41. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6511-6>

Lin, Z.H., *et al.* 2014. DNA Repair Gene XRCC4 Codon 247 Polymorphism Modified Diffusely Infiltrating Astrocytoma Risk and Prognosis. *Int J Mol Sci*, 15 (1), 250-260. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms15010250>

Louis, D.N., *et al.* 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 131 (6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Lu, J., *et al.* 2017. Prognostic significance of XRCC4 expression in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 8 (50), 87955-87970. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21360>

Luo, K.Q., *et al.* 2013. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of glioma and meningioma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (1), 449-452. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.1.449>

Lutz, B.S., *et al.* 2018. Imbalance in DNA repair machinery is associated with BRAFV600E mutation and tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*, 472, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.12.004>

- Mahzouni, P. and Taheri, F. 2019. An Immunohistochemical Study of Cyclin D1 Expression in Astrocytic Tumors and its Correlation with Tumor Grade. *Iran J Pathol*, 14 (3), 252-257. <https://doi.org/10.30699/ijp.2019.82024.1771>
- McNeill, K.A. 2016. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*. 34 (4), 981-998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
- Nguyen, V.N. *et al.* 2000. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem*, 102 (3), 323-338. [https://doi.org/10.1078/s0065-1281\(04\)70039-2](https://doi.org/10.1078/s0065-1281(04)70039-2)
- Ochirjav, E., *et al.* 2019. Reclassification of Mongolian Diffuse Gliomas According to the Revised 2016 World Health Organization Central Nervous System Tumor Classification. *J Pathol Transl Med*, 53 (5), 298-307. <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.07.15>
- Ohgaki, H. and Kleihues, P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109 (1), 93-108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Ostrom, Q.T., *et al.* 2018. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol*, 20 (4), iv1-iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
- Pino, M.A., *et al.* 2018. New Hope in Brain Glioma Surgery: The Role of Intraoperative Ultrasound. A Review. *Brain Sci*, 8 (11), 202-217. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fbrainsci8110202>
- Rasmussen, B.K., *et al.* 2017. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol*, 135 (3), 571-579. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2607-5>
- Sakata, K., *et al.* 2001. Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in normal and tumor tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49 (1), 161-167. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)01352-3](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01352-3)

- Santivasi, W.L. and Xia, F. 2013. The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors. *Cell Biosci*, 3, 10-15. <https://dx.doi.org/10.1186%2F2045-3701-3-10>
- Sarasin, A. and Kauffmann, A. 2008. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat Res*, 659 (1-2), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.12.002>
- Shao, N., *et al.* 2014. Role of the functional variant (2652T>G) in the XRCC4 promoter in prostate cancer. *Mol Biol Rep*, 41 (11), 7463-7470. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3636-1>
- Sharma, V., *et al.* 2018. P53 and Ki-67 Expression in Primary Pediatric Brain Tumors: Does it Correlate with Presentation, Histological Grade, and Outcome? *Asian J Neurosurg*. 13 (4), 1026-1032. https://dx.doi.org/10.4103%2Fajns.AJNS_69_17
- Skjulsvik, A.J., *et al.* 2014. Ki-67/MIB-1 immunostaining in a cohort of human gliomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 7 (12), 8905-8910.
- Sousa, J.F., *et al.* 2019. DNA repair genes in astrocytoma tumorigenesis, progression, and therapy resistance. *Genet Mol Biol*, 43 (1), e20190066. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0066>
- Stetson L.C., Dazard, J.E., Barnholtz-Sloan, J.S. 2016. Protein Markers Predict Survival in Glioma Patients. *Mol Cell Proteomics*, 15 (7), 2356-2365. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060657>
- Takami, H., *et al.* 2015. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry - A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 25 (3), 256-265. <https://doi.org/10.1111/bpa.12173>
- Therasse, P., *et al.* 2000. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*, 92 (3), 205-216. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.3.205>
- Wang, J., Hu, G., Quan, X. 2019. Analysis of the Factors Affecting the Prognosis of Glioma Patients. *Open Med*, 14, 331-335. <https://dx.doi.org/10.1515%2Fmed-2019-0031>

Wen, Y., *et al.* 2019. Silencing of XRCC4 increases radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Biosci Rep.* 39 (3), BSR20180893. <https://dx.doi.org/10.1042%2FBSR20180893>

Xu, K., *et al.* 2014. XRCC2 Promotes Colorectal Cancer Cell Growth, Regulates Cell Cycle Progression, and Apoptosis. *Medicine*, 93 (28), e294. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000294>.

Zhang, Y.Z., *et al.* 2017. XRCC2-Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 43 (3), 1207-1219. <https://doi.org/10.1159/000481762>.

Table 1. Clinical characteristics of the patients (n=39)

Age (years)	52±12.8
Males	23 (59%)
Grades	
I	4 (10.2%)
II	3 (7.7%)
III	6 (15.4%)
IV	26 (66.7%)
Location*	
Lobes	31 (81.6%)
Other anatomical locations	7 (18.4%)
Tumor size (cm)	4.4 ±1.6
Resection	
Partial	31 (79.5%)
Total	8 (20.5%)
Death	23 (58.9%)

Values are expressed as mean±SD and n (%). * We had no information about the tumor location of one patient.

Table 2. Distribution of DNA repair protein marking according to tumor grade

	HGG (n=32)	LGG (n=7)	p-value
XRCC2 Staining			
Weak	4 (12.5%)	2 (28.6%)	0.377
Moderate	12 (37.5%)	1 (14.3%)	
Strong	16 (50%)	4 (57.1%)	
XRCC3 Staining			
Weak	5 (15.6%)	1 (14.3%)	0.719
Moderate	18 (56.3%)	5 (71.4%)	
Strong	9 (28.1%)	1(14.3%)	
XRCC4 Staining			
Negative	0	1(14.3%)	0.079
Weak	11 (34.4%)	1(14.3%)	
Moderate	16 (50%)	5 (71.4%)	
Strong	5 (15.6%)	0	

HGG: high-grade glioma; LGG: low-grade glioma; XRCC2: *X-ray repair cross complementing 2*; XRCC3: *X-ray repair cross complementing 3*; XRCC4: *X-ray repair cross complementing 4*; Chi-Square test.

Table 3. Clinical and histological characteristics of patients with gliomas who had strong XRCC4 staining

Patient	Sex	Age	Grade	Size (cm)	Location	Ki-67	p53	PCNA	cyclin D1
1	F	45	3	6.3	Frontal	4%	0%	20%	0%
2	F	57	4	0.8	Thalamus	40%	90%	56%	12%
3	F	51	3	3.3	Frontal	3%	0%	18%	0%
4	F	50	4	4.6	Temporal	40%	9%	26%	2%
5	M	65	4	3.7	Frontal	50%	25%	28%	3%

F: female; M: male Ki-67: protein Ki-67; p53: protein 53; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; cyclin D1: protein cyclin D1.

Table 4. Distribution of labeling of proteins involved in proliferation according to tumor grade

	HGG (n=32)	LGG (n=7)	p-value
Ki-67	30% (15%-40%)	2% (1%-4%)	<0.0001*
p53	14% (8%-33.8%)	0% (0%-18%)	0.011*
PCNA	37% (24%-51%)	33% (24%-50%)	0.816
ciclina D1	13% (0%-31.8%)	0% (0%-22%)	0.554

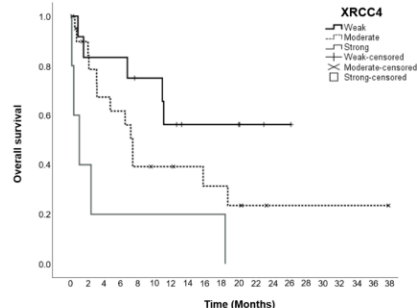
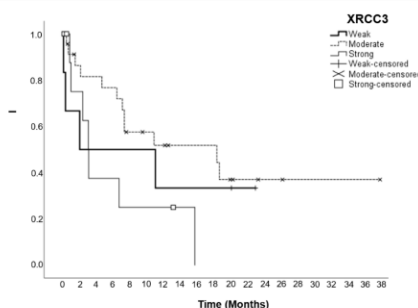
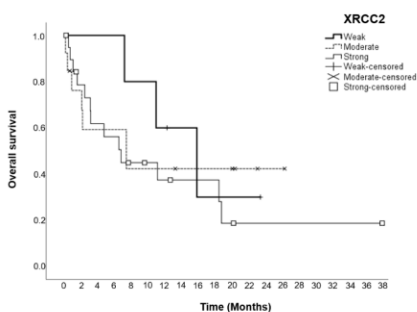
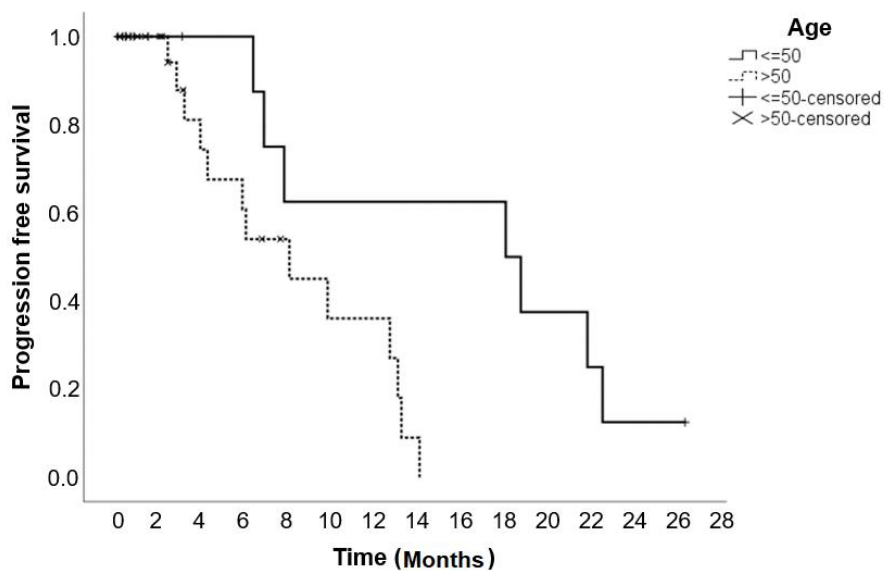
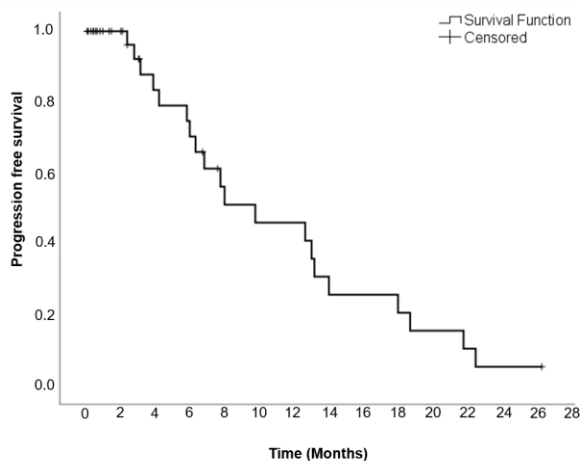
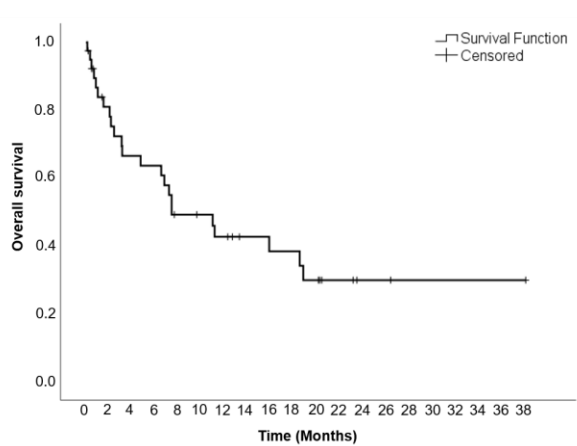
Values are expressed as median (interquartile range 25% -75%); HGG: high-grade glioma; LGG: low-grade glioma; Ki-67: protein Ki-67; p53: protein 53; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; cyclin D1: protein cyclin D1. *: $p < 0.05$; Chi-Square test.

Figure captions

Figure 1. Kaplan-Meier curves showing overall survival and progression free survival in patients with gliomas.

Figure 2. Kaplan-Meier curve showing progression free survival according to age.

Figure 3. Kaplan-Meier curve showing overall survival according to XRCC2, XRCC, and XRCC4 protein expression.



5. CONCLUSÕES

Este estudo é proveniente do projeto intitulado “Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 1.500.599) e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) (Parecer N° 1.442.321).

Em nossa série, a idade mostrou-se um fator de risco significativo no prognóstico, pacientes com >50 anos apresentavam risco cinco vezes maior de recrescimento/recidiva em qualquer tempo. Os pacientes com GAG apresentaram-se 13 anos mais velhos ao diagnóstico e foram submetidos mais frequentemente à ressecção parcial. Em relação à localização, 90,3% dos tumores localizados nos lobos eram GAG.

As proteínas de proliferação Ki-67 e p53 mostraram correlação positiva com o grau tumoral e entre si. A PCNA e ciclina D1 mostraram correlação positiva com a idade dos pacientes.

Nosso estudo é o primeiro a caracterizar a expressão dos marcadores de reparo de DNA XRCC2, XRCC3 e XRCC4 em gliomas através da técnica de IHQ. A grande maioria dos casos foram positivos, com predominância da marcação moderada e forte, demonstrando que as vias de reparo por HR e por NHEJ estão ativadas em gliomas e isso independe do grau tumoral.

Encontramos correlação positiva significativa entre a expressão de PCNA e XRCC3, demonstrando que essas proteínas agem em consonância na via HR em gliomas.

Considerando que a superexpressão de XRCC4 apresentou correlação significativa com a menor sobrevida global, a análise IHQ desse marcador pode contribuir para o acompanhamento e manejo terapêutico dos pacientes com gliomas.

6. APÊNDICES

6.1 JUSTIFICATIVA PARA TAMANHO DA AMOSTRA

O projeto de estudo proposto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 1.500.599) e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) (Parecer N° 1.442.321) abordava, além da análise IHQ dos marcadores, a identificação de polimorfismos em pacientes com gliomas e em pacientes controle normais. Calculou-se uma amostra aproximada de 100 pacientes devido à necessidade de um 'n' mínimo para a comparação fidedigna em relação aos polimorfismos. Devido a questões orçamentárias, não foi possível realizamos o estudo dos polimorfismos. Outrossim, realizamos a análise IHQ dos marcadores. Deste modo adotamos a amostragem por conveniência, resultando em 39 gliomas operados no período 2016 a 2019, pelo mesmo neurocirurgião no Hospital São José da ISCOMPA.

6.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para o estudo imuno-histoquímico, o material obtido da ressecção cirúrgica foi fixado com formalina tamponada a 10% e incluído em parafina. Secções com espessura de 4 µm foram colocadas em lâminas de vidro previamente preparadas com organosilano. Os cortes foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas Ki-67, p53, PCNA, ciclina D1, XRCC2, XRCC3 E XRCC4.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica

Anticorpo	Marca	Referência	Diluição	Controle positivo
Anti-XRCC2	Invitrogen antibodies®	PA5-32643	1:100	Câncer de tireoide
Anti-XRCC3	Invitrogen antibodies®	MA116545, clone 10F1/6	1:8	Câncer de mama
Anti-XRCC4	Invitrogen antibodies®	PA5-22044	1:30	Testículo
Anti-Ki-67	Dako antibodies®	M7240, clone MIB-1	1:150	Tonsila
Anti-p53	Dako antibodies®	M7001, clone DO-7	1:150	Câncer de pulmão
Anti-PCNA	Chemicon antibodies®	MAB424, clone PC10	1:1000	Tonsila
Anti-ciclina D1	Dako antibodies®	M3635, clone SP4	1:100	Tonsila

Protocolo para execução da técnica de IH

- Desparafinização

1. Desparafinar as lâminas na estufa a 70°C por 30 minutos.
2. Submergir as lâminas em xilol 1x por 10 minutos e 1x por 5 minutos.
3. Hidratação com concentrações decrescentes de etanol em 4 banhos deixando 5 minutos no último banho.
4. Lavar em água destilada.

- Recuperação antigênica

1. Colocar as lâminas em solução de tris-EDTA com pH=9,0 aquecido em banho-maria a 95°C por 40 minutos.
2. Resfriamento das lâminas na solução de tris-EDTA em temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Lavagem 1x em água destilada.
4. Lavagem 1x em PBS Triton 0,05%.

- Inativação da peroxidase endógena

1. Incubar com H₂O₂ 30 volumes 5% em metanol (três lavagens de 10 minutos cada em temperatura ambiente protegido da luz).
2. Lavar em água destilada.
3. Lavar 3x em PBS Triton 0,05% por 5 min com agitação.

- Bloqueio das ligações inespecíficas

1. Incubar com solução de BSA 1% diluída em PBS por 1 hora em temperatura ambiente.

- Aplicação dos anticorpos

1. Secar a lâmina em volta do tecido e delimitá-lo com caneta hidrofóbica PapPen®.
1. Aplicar quantidade de anticorpo primário diluído necessária para cobrir o corte histológico.
2. Deixar 40 min a 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, colocar a 4°C (na geladeira) *overnight*.
3. No dia seguinte, lavar em PBS 3x com agitação por 5 min.
4. Incubar com anticorpo secundário por 40min à temperatura ambiente.
5. Lavar em PBS 3x com agitação por 5 min.

6. Secar a lâmina em volta do tecido e delimitá-lo com canela hidrofóbica PapPen®.
7. Aplicar cromógeno DAB e deixar atuar por 5 minutos.
8. Lavar 2x em água destilada.
9. Contra-corar em hematoxilina de Harris por 10 segundos e colocar em água corrente por 5 min. até clarificar a água.
10. Passar nos álcoois em concentrações crescentes para desidratar. Deixar 5 min no último álcool.
11. Passar em xilol 2x por 5 min.
12. Montar lâmina com Entellan®.

Análise dos resultados

Todas as lâminas foram avaliadas por dois observadores independentes, cegados para os dados clínicos e histopatológicos. Nos casos em que ocorreu discordância, foi estabelecida uma análise conjunta entre os dois observadores para obtenção de consenso na avaliação. Para a análise da marcação imunohistoquímica, componentes vasculares, áreas inflamatórias, necróticas, degeneradas foram excluídas.

A marcação citoplasmática de XRCC2 e XRCC3 foi analisada através da varredura completa de cada lâmina e foi considerado como resultado o produto entre a porcentagem de células marcadas (sendo 0= $\leq 10\%$; 1= 11-25%; 2= 26-50%; 3= 51-75%; 4= $>75\%$) e a intensidade da coloração (0=sem marcação; 1=marcação fraca; 2=marcação moderada; 3=marcação forte), o escore variando de 0 a 12 (Hu et al., 2013). A expressão de XRCC4 foi avaliada como o produto entre a porcentagem de núcleos positivos (sendo 0= negativo; 1=

≤10%, 2= 11-50%, 3= 51-80%, 4=>80%) e a intensidade da coloração (0=sem marcação, 1=marcação fraca, 2=marcação moderada, 3=marcação forte), o escore variando de 0 a 12 (Shao e cols., 2014). Para XRCC2, XRCC3 e XRCC4 consideramos o escore de 1-3 como marcação fraca, de 4-8 marcação moderada e de 9-12 marcação forte.

Para os marcadores de proliferação Ki-67, p53, PCNA e ciclina D1 utilizamos o *labeling index*, em que a positividade foi definida pela contagem das células tumorais com núcleos imunomarcados em relação ao total de células. Foram selecionados e fotografados 5 *hot spots* de cada caso para cada marcador, em aumento de 100X e contadas pelo menos 500 células, com o auxílio do software ImageJ®.

Referências:

Hu J, Wang N, Wang YJ. XRCC3 and RAD51 Expression Are Associated with Clinical Factors in Breast Cancer. PLoS One. 2013;8(8):e72104. DOI: 10.1371/journal.pone.0072104

Shao N, Li J, Xu B, Wang Y, Lu X, Feng N. Role of the functional variant (2652T>G) in the XRCC4 promoter in prostate cancer. Mol Biol Rep. 2014;41:7463-70. DOI: 10.1007/s11033-014-3636-1

6.3 MARCAÇÕES IHQ

Figura 5. Marcação imuno-histoquímica dos marcadores de proliferação em gliomas: a) Ki-67; b) p53; c) PCNA; d) ciclina D1. Aumento 40X.

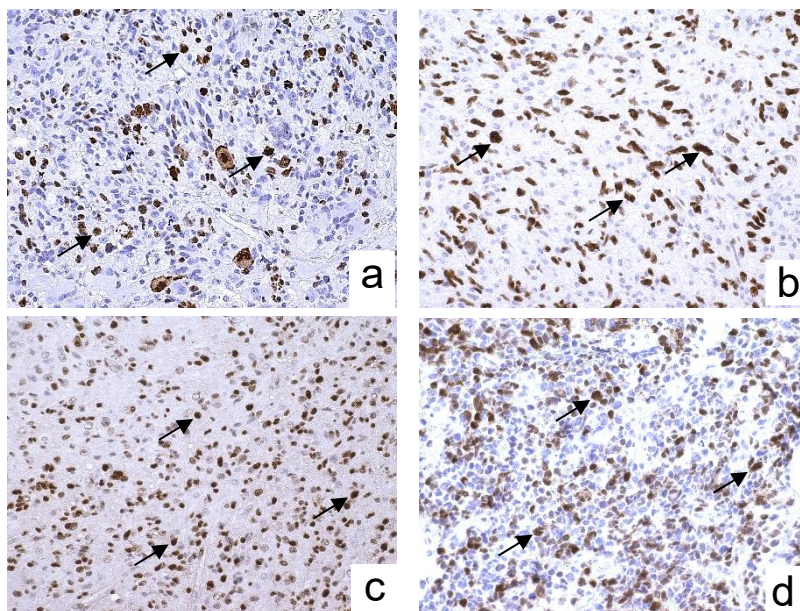


Figura 6. Marcação imuno-histoquímica de XRCC2 em gliomas: a) marcação fraca; b) marcação moderada; c) marcação forte. Aumento 40X.

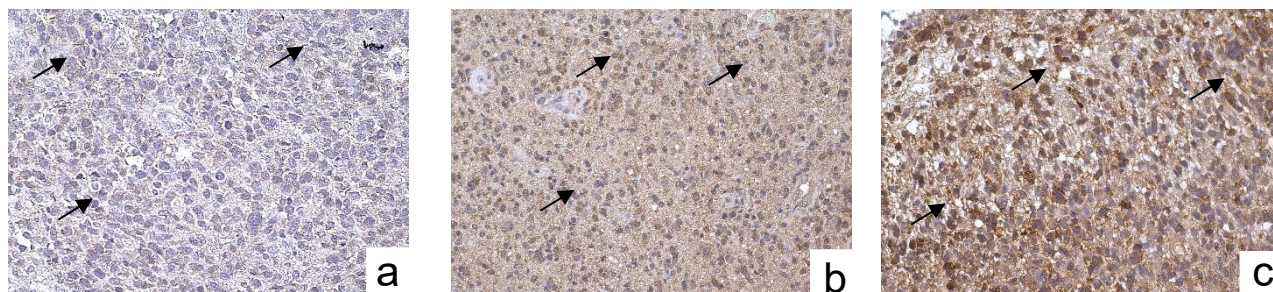


Figura 7. Marcação imuno-histoquímica de XRCC3 em gliomas: a) marcação fraca; b) marcação moderada; c) marcação forte. Aumento 40X.

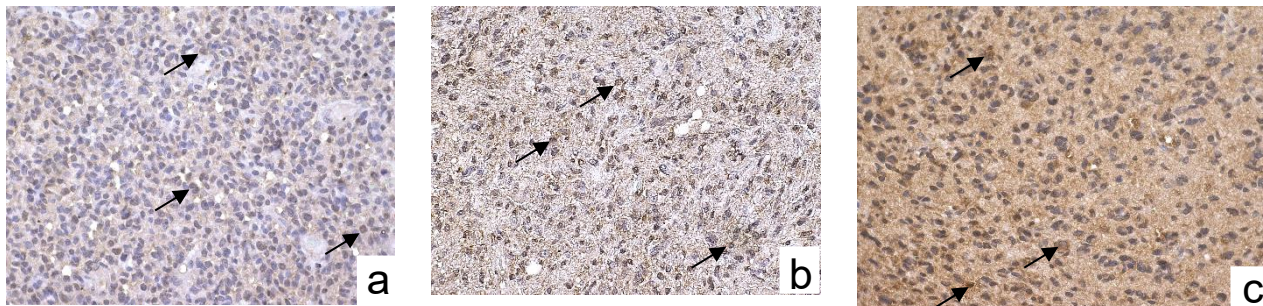
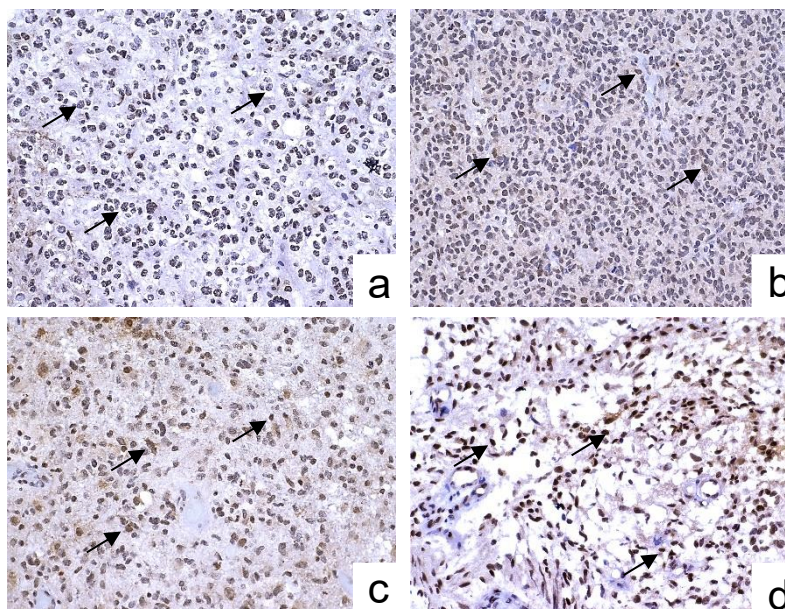


Figura 8. Marcação imuno-histoquímica de XRCC4 em gliomas: a) marcação negativa; b) marcação fraca; c) marcação moderada; d) marcação forte. Aumento 40X.



6.4 TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO (2016-2020).

Projeto:

- Relação entre o padrão de granulação tecidual nos adenomas hipofisários, gigantes ou não, com características clínicas, hormonais, tumorais e biomarcadores. (Aprovado pelo CEP ISCMPA 3.209.682)

Artigos:

- **Ongaratti BR**, Haag T, D'Ávila MF, Trott G, Ferreira NP, Rech CGSL, Pereira-Lima JFS, da Costa Oliveira M. Gene and protein expression of E-cadherin and NCAM markers in non-functioning pituitary adenomas. *Ann Diagn Pathol.* 2019 Feb;38:59-61. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.10.003

[Ann Diagn Pathol.](#) 2019 Feb;38:59-61. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2018.10.003. Epub 2018 Oct 9.

Gene and protein expression of E-cadherin and NCAM markers in non-functioning pituitary adenomas.

[Ongaratti BR](#)¹, [Haag T](#)², [D'Ávila MF](#)², [Trott G](#)², [Ferreira NP](#)³, [Rech CGSL](#)³, [Pereira-Lima JFS](#)⁴, [da Costa Oliveira M](#)⁴.

⊕ Author information

Abstract

Non-functioning pituitary adenomas (NFPA) are classified as benign tumors of slow growth, but 40% of them present local invasion, a characteristic of behavior still unpredictable with the use of current tumor markers. This work aims to evaluate the tissue markers E-cadherin and NCAM, which act on cell adhesion, in tumor tissue samples of NFPA and its relationship with the degree of local invasiveness. Gene expression of E-cadherin (CDH1) and NCAM (NCAM1) was assessed by real-time PCR and tissue expression by immunohistochemistry. Fifty-three patients with macroadenomas were submitted to transsphenoidal surgery, presented grade II invasive adenomas in 16 cases (30.2%), grade III in 7 (13.2%) and grade IV in 30 (56.6%). In the immunohistochemistry, one case was negative for E-cadherin, 7 showed weak immunostaining, 17 moderate and 28 strong, whereas for NCAM, 5 showed negative, 28 weakly, 14 moderate and 6 strong. Regarding gene expression, 43.3% showed expression for CDH1 (mean of 2.12) and 50% for NCAM1 (mean of 1.86). There was no significant correlation between the immunohistochemical expression of the markers, as well as the gene expression, the degree of invasiveness and clinical data. The results suggest that E-cadherin and NCAM markers are not directly related to the invasiveness in NFPA.

Copyright © 2018. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: E-cadherin; NCAM; Non-functioning pituitary adenomas

PMID: 30419428 DOI: [10.1016/j.anndiagpath.2018.10.003](#)

- Zeni D, Rissetti G, **Ongaratti B**, Pereira-Lima JF, Rech CGSL, Oliveira MDC. Evaluation of treatment of central hypothyroidism versus primary hypothyroidism in relation to levothyroxine replacement dose. *Endocr Pract.* 2019 Jul;25(7):663-668. DOI: 10.4158/EP-2018-0533

Endocr Pract. 2019 Jul;25(7):663-668. doi: 10.4158/EP-2018-0533. Epub 2019 Mar 13.

EVALUATION OF TREATMENT OF CENTRAL HYPOTHYROIDISM VERSUS PRIMARY HYPOTHYROIDISM IN RELATION TO LEVOTHYROXINE REPLACEMENT DOSE.

Zeni D, Rissetti G, Ongaratti B, Pereira-Lima JF, Rech CGSL, Oliveira MDC.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate levothyroxine (LT4) replacement daily doses in patients with central hypothyroidism (CeH) and compare them with those adequate for patients with primary hypothyroidism (P-HYPO). **Methods:** We included 53 patients with CeH and 57 with P-HYPO, matched by sex, age, weight, and body mass index, in the period of 1 year. At the time of inclusion, all presented a stable and adequate dose of LT4 for at least 3 months, considering as adequate the dose associated with normal thyroid-stimulating hormone (TSH) levels and free thyroxine (T4) in P-HYPO patients, and free T4 levels in CeH patients. **Results:** The absolute daily dose of LT4 differed significantly between the two groups, $103.0 \pm 27.1 \mu\text{g}$ (CeH) and $89.3 \pm 32.0 \mu\text{g}$ (P-HYPO) ($P = .017$), even after adjustment for age, gender, and free T4 ($P = .04$). The LT4 dose adjusted to weight was also higher after adjustment for age, gender and free T4 ($P = .04$), with an average of $1.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (CeH) and $1.2 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (P-HYPO). Sheehan syndrome patients had a lower absolute daily dose of LT4 ($P = .001$), and patients who underwent pituitary radiotherapy required higher doses ($P = .008$). There was no difference in the daily dose of LT4 according to other pituitary hormone deficiencies. **Conclusion:** The results reinforce the relevance of a careful individualization of LT4 replacement in CeH management and the need for new markers for proper LT4 replacement therapy in such cases. **Abbreviations:** BMI = body mass index; CeH = central hypothyroidism; GH = growth hormone; LT4 = levothyroxine; P-HYPO = primary hypothyroidism; T3 = triiodothyronine; T4 = thyroxine; TSH = thyroid-stimulating hormone.

PMID: 30865544 DOI: 10.4158/EP-2018-0533

KEYWORDS: E

- Trott G, **Ongaratti BR**, de Oliveira Silva CB, Abech GD, Haag T, Rech CGSL, Ferreira NP, da Costa Oliveira M, Pereira-Lima JFS. PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: Correlation with invasiveness, female gender and younger age. *Ann Diagn Pathol*. 2019 Aug;41:83-89. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2019.04.016

[Ann Diagn Pathol](#). 2019 Aug;41:83-89. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2019.04.016. Epub 2019 May 2.

PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: Correlation with invasiveness, female gender and younger age.

[Trott G](#)¹, [Ongaratti BR](#)², [de Oliveira Silva CB](#)², [Abech GD](#)³, [Haag T](#)³, [Rech CGSL](#)³, [Ferreira NP](#)³, [da Costa Oliveira M](#)², [Pereira-Lima JFS](#)².

⊕ **Author information**

Abstract

BACKGROUND: Non-functioning pituitary adenomas (NFPA) are prevalent pituitary neoplasms. Because they do not present with hormonal hypersecretion, there is no marker that indicates regrowth or recurrence, as in other adenomas.

OBJECTIVES: Evaluate the immunohistochemical expression of PTTG, CD105 and Ki-67 and their relationships with age, gender, invasiveness, hormonal expression and regrowth or recurrence in the follow-up of NFPA operated and not submitted to radiotherapy.

METHODS: Included 56 patients submitted to transsphenoidal surgery. Clinical data were obtained from medical records. The invasion degree was obtained by Hardy's classification.

RESULTS: Mean age 55 ± 13.6 years, 62.5% men and 68% invasive. Lesion persistence was present in 62.2% and regrowth in 35.7%. The recurrence-free survival rate was 94.5%, 75.4% and 69.1% (1, 2 and 3 years). No patient presented recurrence. The PTTG was positive in 55.3%, with statistically significant relationship with invasiveness, age and female gender, without relation to regrowth. The microvascular density showed statistically significant relationship with male gender, negative correlation with PTTG ($r = -0.434$, $p = 0.001$), and no relation with invasiveness and regrowth. The Ki-67 showed statistically significant relationship with age, tendency towards regrowth ($p = 0.054$) and, with no relation to invasiveness.

CONCLUSIONS: It is suggested that PTTG can be used as a prognostic marker in NFPA.

Copyright © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: CD105 antigen; Immunohistochemistry; Ki-67 antigen; Microvascular density; Non-functioning pituitary adenomas; PTTG protein

PMID: 31154064 DOI: [10.1016/j.anndiagpath.2019.04.016](#)

- de Azevedo Oliveira B, Araujo B, Dos Santos TM, **Ongaratti BR**, Rech CGSL, Ferreira NP, Pereira-Lima JFS, da Costa Oliveira M. The acromegalic spine: fractures, deformities and spinopelvic balance. *Pituitary*. 2019 Dec;22(6):601-606. DOI: 10.1007/s11102-019-00991-7.

Pituitary. 2019 Dec;22(6):601-606. doi: 10.1007/s11102-019-00991-7.

The acromegalic spine: fractures, deformities and spinopelvic balance.

de Azevedo Oliveira B¹, Araujo B², Dos Santos TM², Ongaratti BR¹, Rech CGSL², Ferreira NP², Pereira-Lima JFS^{1,2}, da Costa Oliveira M^{3,4}.

Author information

Abstract

INTRODUCTION: Axial skeleton arthropathy and osteoporotic vertebral fractures are common findings in acromegalic patients and can result in severe spinal deformity.

OBJECTIVE: To investigate the presence of spinal fractures and deformities, sagittal imbalances, and spinopelvic compensatory mechanisms in acromegalics.

PATIENTS AND METHODS: 58 patients with acromegaly from a referral neuroendocrinology center were prospectively evaluated by panoramic spine radiographs to detect the presence of fractures and scoliosis, to measure thoracic kyphosis, lumbar lordosis (LL), pelvic incidence (PI), pelvic tilt (PT) and sagittal vertical axis (SVA). Sagittal imbalance criteria were considered: thoracic kyphosis > 50°, PI-LL > 10°, PT > 20° and SVA > 5 cm. Their medical records were analyzed for clinical and laboratorial data.

RESULTS: The prevalence of fractures was 13.8%, predominantly in the thoracic spine, with mild and anterior wedge compressions. Scoliosis was present in 34.5% of the cases, all with degenerative lumbar curve apex. Thoracic kyphosis > 50° occurred in 36.8% of patients, PI-LL > 10° in 48.3%, PT > 20° in 41.4% and SVA > 5 cm in 12.1%.

CONCLUSION: Increased number of vertebral fractures and high prevalence of spinal deformities related to sagittal imbalance were detected, indicating the importance of monitoring bone comorbidities in acromegaly, with radiological evaluation of the spine as part of the follow up.

KEYWORDS: Acromegaly; Osteoporotic fractures; Sagittal balance kyphosis; Spinal column

PMID: 31556014 DOI: [10.1007/s11102-019-00991-7](https://doi.org/10.1007/s11102-019-00991-7)

- Oliveira MC, Barea LM, Horn APK, **Ongaratti BR**, Soares JOD, Araujo B, Santos TM, Rech CL, Pereira-Lima JFS. Resolution of headache after reduction of prolactin levels in hyperprolactinemic patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 2020 jan;1:1-6. DOI: 10.1590/0004-282X20190143

<https://doi.org/10.1590/0004-282X20190143>

ARTICLE

Resolution of headache after reduction of prolactin levels in hyperprolactinemic patients

Resolução de cefaleia após redução dos níveis de prolactina em pacientes com hiperprolactinemia

Miriam da Costa OLIVEIRA^{1,2}, Liselotte Menke BAREA³, Andreia Peres Klein HORN², Bárbara Roberta ONGARATTI¹, José Otávio Dworzeki SOARES³, Bruna ARAUJO², Tainá Mafalda dos SANTOS², Carolina Leães RECH², Júlia Fernanda Semmelmann PEREIRA-LIMA^{1,2}

ABSTRACT

Prolactin (PRL) secreting adenomas are associated with high incidence of headache. The role of hyperprolactinemia in the headache context is not clear, nor is the effect of its treatment on headache. **Methods:** The present longitudinal study evaluated hyperprolactinemic patients (69), in terms of presence and characteristics of headache before and after hyperprolactinemia treatment. **Results:** Headache was reported by 45 (65.2%) patients, independent of the etiology of hyperprolactinemia. The migraine phenotype was the most prevalent (66.6%). Medications used in the treatment of headache not changed during the study. The first line of treatment of hyperprolactinemia was dopaminergic agonists. In the last reevaluation, PRL level under treatment was within the reference range in 54.7% of the cases, and it was observed complete or partial resolution of the headache in 75% of the cases. The median PRL at this time in patients with complete headache resolution was 17 ng/mL, in those who reported partial recovery was 21 ng/mL, and in those in whom the headache did not change was 66 ng/mL, with a significant difference between the group with complete headache resolution vs. the group with unchanged headache ($p=0.022$). In the cases with complete headache resolution, the median fall on PRL levels was 89% and in those cases with partial headache resolution 86%, both significantly different ($p<0.001$) from the fall in the cases with an unchanged headache. **Conclusion:** Data allow us to conclude that, in this series, in the majority of cases the reduction in the level of PRL was followed by cessation or relief of the pain.

Keywords: headache; pituitary adenomas; prolactin; hyperprolactinemia; dopaminergic agonist.

Resumos e pôsteres publicados em congressos

- Leães CGS, **Ongaratti BR**, Haag T, Abech GD, Trott G, Davila MF, Ferreira NP, Pereira-Lima JFS, Oliveira MC. Gene and protein expression of E-cadherin and Ncam and its relationship to tumor invasiveness in Non-functioning pituitary adenomas. In: 100th Annual Meeting of the Endocrine Society - ENDO 2018, 2018, Chicago. Endocrine Reviews, 2018. v. 39.

ENDO 2018

Certificate of Poster Presentation

The Endocrine Society certifies that

Carolina Garcia Soares Leães, PhD, Bárbara R Ongaratti, MD, Taiana Haag, PhD, Gabriel D Abech, MD, Geraldine Trott, MD, Marícia F D'ávila, PhD, Nelson P Ferreira, PhD, Julia F S Pereira Lima, PhD, Miriam C Oliveira, PhD

presented a poster at the 100th Annual Meeting of the Endocrine Society – ENDO 2018,
at McCormick Place West, Chicago, Illinois
March 17–20, 2018.

Titled:

Gene And Protein Expression Of E-cadherin And Ncam And Its Relationship To Tumor Invasiveness In Non-functioning Pituitary Adenomas



Wanda Johnson, CMP, CAE
Chief Program Officer, Education, Science
and Professional Development
Endocrine Society

- Rech CGSL, **Ongaratti BR**, Trott G, Silva CBO, Santos TM, Ferreira NP, Pereira-Lima JFS, Oliveira MC. Adenomas de hipófise clinicamente não funcionantes: expressão gênica e proteica de marcadores de invasividade. In: 19^o SINE - Simpósio Internacional de Neuroendocrinologia, 2018, São Paulo. Archives of Endocrinology and Metabolism, 2018. v. 62. p. S19-S19.

049 ADENOMAS DE HIPÓFISE CLINICAMENTE NÃO FUNCIONANTES: EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE MARCADORES DE INVASIVIDADE

Leães Rech CGS¹, Ongaratti B¹, Trott G¹, Silva CBO¹, Santos TM¹, Ferreira NP¹, Pereira-Lima JFS¹, Oliveira MC¹

¹ Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa de Porto Alegre da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA); Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA

Fundamentos: Os adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (AHNF) representam 30% a 35% dos adenomas hipofisários. Embora sejam classificados como tumores benignos de crescimento lento, 40% apresentam características de invasão local. Há necessidade de estudos em espécimes cirúrgicos para ajudar a esclarecer o comportamento desses tipos de tumores. **Objetivos:** Este trabalho tem como objetivo avaliar os marcadores teciduais E-caderina e NCAM em AHNF e sua relação com o grau de invasividade local. **Pacientes e métodos:** Trata-se de um estudo transversal prospectivo realizado com pacientes submetidos à cirurgia transfenoidal no período de 2007 a 2014 por um mesmo cirurgião (NPF). Após a cirurgia, as amostras tumorais foram acondicionadas em nitrogênio líquido e estocadas em *biofreezer* a -80 °C para avaliação da expressão gênica da E-caderina (CDH-1) e do NCAM (NCAM1) por meio da técnica de PCR em tempo real. Foi realizada a revisão dos prontuários para a coleta dos dados clínicos. A amostra tumoral foi fixada em formalina e incluída em parafina para avaliação imunohistoquímica da E-caderina e NCAM. **Resultados:** Foram avaliados 53 pacientes, 33 homens (62,3%), com média de idade de 55,8 ± 13,3 anos, variando de 24 a 79 anos. Em relação ao grau de invasividade, 16 casos eram de grau II (30,2%), 7 de grau III (13,2%) e 30 de grau IV (56,6%), sendo todos macroadenomas. Em relação à imunohistoquímica, somente 1 (1,9%) caso foi negativo para E-caderina e 52 (98,1%) foram positivos, sendo 7 marcação fraca, 17 moderada e 28 forte. Para NCAM, 5 (9,4%) mostraram marcação negativa e 48 (90,6%), positiva, sendo 28 fraca, 14 moderada e 6 forte. Não houve correlação significativa entre a expressão imunohistoquímica dos marcadores, o grau de invasividade e os dados clínicos. Em relação à expressão gênica para CDH1, 30 amostras foram testadas; 43,3% mostraram expressão média de 2,12 (variando de 1,0 a 84,2). Para o NCAM1, 32 amostras foram testadas; 50% mostraram expressão gênica, com média de 1,86 (variando de 1,2 a 10,7). Não houve correlação entre a expressão gênica, o grau de invasividade e os dados clínicos. **Conclusão:** A ausência de correlação entre o grau de invasividade, os dados clínicos e os marcadores E-caderina e NCAM, tanto com a expressão proteica quanto com a gênica, sugerem que esses marcadores não estão associados diretamente com a invasividade em AHNF.

- Araujo B, Silva CBO, **Ongaratti BR**, Trott G, Rech CGSL, Ferreira NP, Oliveira MC, Pereira-Lima JFS. Análise Da Expressão De Proteínas De Marcadores Envolvidos Na Proliferação Celular E Reparação De Dna Em Meningiomas. In: Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019, Porto Alegre. Anais do Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019.

Verifique o código de autenticidade 846558.516992.061027.0.562242063387607897 em <https://www.even3.com.br/documentos>



- Maciel AM, **Ongaratti BR**, Silva CBO, Trott G, Rech CGSL, Ferreira NP, Oliveira MC, Pereira-Lima JFS. Expressão imuno-histoquímica de marcadores de reparo de DNA e marcadores de proliferação em gliomas. In: Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019, Porto Alegre. Anais do Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019.

Verifique o código de autenticidade 846558.516992.061646.0.562242063387606567 em <https://www.even3.com.br/documentos>



- Oliveira MC, Santos TM, Araujo B, **Ongaratti B**, Oliveira BA, Carolina S. L. Rech CSL, Julia F. S. Pereira-Lima JFS. Differentiated thyroid cancer in acromegaly: evolution in 4 cases. In: 16th International Pituitary Congress, 2019, New Orleans. 16th International Pituitary Congress, 2019.

P22

Differentiated Thyroid Cancer in Acromegaly: Evolution in 4 Cases

Miriam C. Oliveira^{1,2}, Tainá M. Santos³, Bruna Araujo³, Bárbara R. Ongaratti², Bruno A. Oliveira², Carolina S.L. Rech¹, Lima JFS Pereira^{1,2}

¹Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil; ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil

Introduction: Despite controlled studies, national registries and meta-analyses, the relationship between acromegaly and cancer, which is continually revisited, remains controversial. In recent review, the standardized incidence ratio (SIR) ranged from 0.75 to 3.4 (Boguszewski and Ayuk, 2016). **Objective:** To report 4 cases of thyroid cancer diagnosed in acromegalic patients. **Methods:** The medical records of 79 acromegalic patients followed in a university-affiliated Center of Neuroendocrinology of southern Brazil, between 2013 and 2018, were reviewed. Of these, 13 cases were excluded because they had a follow-up of less than 1 year after the diagnosis of acromegaly. Four patients with thyroid cancer were diagnosed in this series, and consented to the publication of their data. **Case Reports:** **Case 1:** Female, diagnosis of acromegaly at age 60, with follicular variant of papillary microcarcinoma in 3 thyroid nodules, in two of them invading the capsule without overcoming it. **Case 2:** Female, diagnosis at age 49, papillary carcinoma with involvement of lymph nodes and pulmonary metastases. **Case 3:** Female, diagnosis at age 53, papillary carcinoma with invasion of perithyroid tissue. **Case 4:** Male, diagnosis at age 47, papillary carcinoma with lymph node metastases. In the last evaluation, the cervical lesion persisted only in the male patient, with no signs of disease in the other cases. **Conclusion:** In this report, the number of cases of thyroid cancer in relation to the total sample (4/66, 6%) is similar to that of other published series, and limited to differentiated carcinomas, with thyroid disease progression following the usual pattern. However, the findings reinforce the indication of continuous attention to the examination of the cervical region in acromegalic patients and ultrasound complementation according to the findings. This recommendation is especially valid in young patients with a family history of cancer, which are independent risk factors.

The authors have no relevant relationships to report.

- Oliveira MC, Araujo B, Santos TM, **Ongaratti B**, Rech CSL, Ferreira NP, Pereira-Lima JFS. Giant prolactinomas: characteristics in presentation and evolution. In: 16th International Pituitary Congress, 2019, New Orleans. 16th International Pituitary Congress, 2019.

P62

Giant Prolactinomas: Characteristics in Presentation and Evolution

Miriam C. Oliveira^{1,2}, Bruna Araujo³, Tainá M. Santos³, Bárbara Ongaratti², Carolina S.L. Rech¹, Nelson P. Ferreira¹, Julia F.S. Pereira Lima^{1,2}

¹Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil; ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil

Introduction: Among prolactinomas, 16% are characterized as giants, defined as those with ≥ 4 cm on the largest axis, in association with a Prolactin (PRL) value greater than 1000 ng/mL. **Objective:** To report the presentation/evolution of individuals with giant prolactinoma. **Patients and Methods:** This retrospective study was performed at a university-affiliated Center of Neuroendocrinology of southern Brazil. Between 2001 and 2018, eleven patients with giant prolactinoma were identified. **Results:** The study population consisted of 6 males and 5 females with age between 18 and 68 years. The pituitary lesion was an incidental finding in 2 cases. The most prevalent manifestations were visual complaints (7 cases), headache (6) and obesity (7/10 cases). The main hormonal deficits were gonadal (10) and thyroid (6). The largest axis of the adenoma ranged from 4 to 8.5 cm and the PRL level from 1500 to 17,716 ng/mL. In 9 cases the tumor was invasive. Hemianopsia or extinct field were observed in 9 cases. All the patients used bromocriptine (3 cases) or cabergoline (8), 4 patients underwent surgery and one patient underwent radiotherapy. Follow-up ranged from 7 months to 17 years. In the last evaluation, the PRL was normal in 5 cases and elevated in the others (3 of them in values lower than 100ng/mL). In the last image (8 patients), there was empty sella in one case, absence of lesion in one and a noninvasive lesion in 3. **Conclusions:** In this sample of patients with giant prolactinomas, contrary to that reported in the literature, we observed equivalence between the number of men and women, and high prevalence of central hypogonadism, hypothyroidism and obesity. On the other hand, despite excess tumor size and hormonal hypersecretion, the disease progressed with normal or minimally elevated PRL values in 72% of cases and regression of invasive characteristics in 67%.

The authors have no relevant relationships to report.

7. ANEXOS

7.1 PARECERES DOS COMITÊS DE ÉTICA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51849815.5.0000.5335

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.442.321

Apresentação do Projeto:

Estudo a ser realizado com 100 pacientes maiores de 18 anos que foram internados com diagnóstico de Tumor Primário do Sistema Nervoso Central (SNC) submetido à neurocirurgia no Hospital São José da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e confirmado anátomo-patológico com diagnóstico confirmatório de Glioma (e 100 pacientes controle). Serão realizadas análises moleculares em amostra de sangue e análise imuno histoquímica em amostras provenientes das amostras em bloco que estão no Laboratório de Patologia da ISCMPA e com revisão de prontuários, com o objetivo de relacionar os polimorfismos em genes de reparo de DNA, citados abaixo, com a tumorigênese em Gliomas.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar os polimorfismos e a expressão imuno-histoquímica de XRCC1(Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met)e XRCC4 (G1394T) em gliomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador declara sobre:

Riscos: Casos- Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos. Controles - A coleta, normalmente, não acarreta maiores

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

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.442.321

riscos para a saúde do voluntário. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tontura

durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, você será orientado a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar.

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador declara sobre:

Critério de Inclusão: Serão incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos internados com diagnóstico pré-operatório de tumor primário do SNC submetidos à neurocirurgia

no Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e com diagnóstico anátomo-patológico confirmatório de glioma, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os indivíduos controles serão convidado a participar da pesquisa através de meios virtuais e cartazes afixados nos murais informativos da UFCSPA (anexo 2). Serão selecionados indivíduos, para o grupo controle, maiores de 18 anos, sem histórico familiar de tumor cerebral em parentes de primeiro grau,

mediante assinatura do TCLE (anexo 3) e preenchimento da ficha de coleta de dados (anexo 4).

Critério de Exclusão: Serão excluídos do trabalho pacientes com idade inferior a 18 anos, aqueles que não tenham assinado o TCLE, bem como pacientes com diagnóstico anátomo-patológico que não contemplem os gliomas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexou os seguintes documentos e os mesmos estão adequados: Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo seres humanos, Formulário de Inscrição de Projetos de Pesquisa – CEP da ISCMPA, Orçamento, Cronograma, Termo de compromisso para utilização de dados de prontuários, Declaração de Confidencialidade do sujeito no estudo, Declaração de autorização da Chefia responsável, Declaração de uso e publicação de dados, Declaração de uso de dados e materiais, Declaração de isenção de ônus à Instituição, TCLE.

Recomendações:

Retirar dos documentos em que há necessidade da identificação do paciente o espaço para registrar nome completo, utilizar somente as iniciais dos pacientes.

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

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.442.321

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não aplicável.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634296.pdf	09/12/2015 09:42:20		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:38:43	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL.pdf	07/12/2015 11:00:07	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	FORMULARIO_DE_INCRICAO_DE_PROJETOS_DE_PESQUISA.pdf	07/12/2015 10:59:38	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	FICHA_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:22:16	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	CARTAZ.pdf	27/11/2015 13:21:54	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_COM_ESTRELA_DE_RELATORIO.pdf	27/11/2015 13:21:38	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_PROF_VANESSA_UFCSPA.pdf	27/11/2015 13:21:12	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito

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

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.442.321

Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_PROF_MARILDA_UFCSPA.pdf	27/11/2015 13:20:25	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_ISENCAO_DE_ONUS_A_INSTITUICAO.pdf	27/11/2015 13:18:59	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_USO_E_PUBLICACAO_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:17:40	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_USO_DE_DADOS_E_MATERIAIS.pdf	27/11/2015 13:17:06	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_E_PRONTUARIOS.pdf	27/11/2015 13:16:24	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_CONFIDENCIALIDADE_DO_SUJEITO_NO_ESTUDO.pdf	27/11/2015 13:15:41	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE.pdf	27/11/2015 13:11:10	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/11/2015 13:11:01	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ANALISE_DE_POLIMORFISMOS_E_EXPRESSAO_DE_MARCADORES_ASOCIADOS_AO_REPARO_DE_DNA_EM_GLIOMAS.pdf	27/11/2015 13:09:37	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	27/11/2015 13:09:02	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	27/11/2015 13:08:49	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Março de 2016

Assinado por:
Carlos Henrique Munhoz Olea
(Coordenador)

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51849815.5.3001.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.500.599

Apresentação do Projeto:

Os gliomas incluem vários tipos de tumores com perfis moleculares e histológicos distintos, o que sugere diferentes etiologias. Os gliomas correspondem a 80% dos tumores malignos de sistema nervoso central. Apesar do progresso na caracterização da patogênese dos gliomas, estes tumores permanecem incuráveis e, na maioria dos casos, refratários ao tratamento devido à sua heterogeneidade. Os polimorfismos de base única (single nucleotide polymorphisms - SNPs) são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente estudados. Os SNPs podem levar à produção defeituosa das proteínas, acarretando seu mau funcionamento e desempenho. Este trabalho tem como objetivos avaliar frequência dos polimorfismos e a expressão imuno-histoquímica do XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) em gliomas. O estudo será realizado com pacientes do Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), instituição conveniada à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.500.599

Identificar os polimorfismos e a expressão imuno-histoquímica de XRCC1(Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met)e XRCC4 (G1394T) em gliomas.

Objetivo Secundário:

1) Identificar a presença dos polimorfismos XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) em amostras de pacientes com gliomas e controles através da técnica de PCR em tempo real. 2) Avaliar a expressão das proteínas XRCC1, XRCC2, XRCC3 e XRCC4 através da técnica de imuno-histoquímica. 3) Verificar a associação entre os polimorfismos e a expressão imunohistoquímica. 4) Associar os resultados obtidos com as variáveis: sexo, idade, tipo histológico, sintomas, localização, tamanho do tumor e taxa de sobrevida livre de doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Casos- Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos. Controles - A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do voluntário. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tontura durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, você será orientado a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar.

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

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



Continuação do Parecer: 1.500.599

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634296.pdf	09/12/2015 09:42:20		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:38:43	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL.pdf	07/12/2015 11:00:07	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	FORMULARIO_DE_INCRICAO_DE_PROJETOS_DE_PESQUISA.pdf	07/12/2015 10:59:38	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	FICHA_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:22:16	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	CARTAZ.pdf	27/11/2015 13:21:54	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_COM_ESTREGA_DE_RELATORIO.pdf	27/11/2015 13:21:38	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_PROF_VANESSA_UFCSPA.pdf	27/11/2015 13:21:12	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_PROF_MARILDA_UFCSPA.pdf	27/11/2015 13:20:25	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_ISENCAO_DE_ONUS_A_INSTITUICAO.pdf	27/11/2015 13:18:59	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_USO_E_PUBLICACAO_DE_DADOS.pdf	27/11/2015 13:17:40	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_USO_DE_DADOS_E_MATERIAIS.pdf	27/11/2015 13:17:06	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_E_PRONTUARIOS.pdf	27/11/2015 13:16:24	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_CONFIDENCIALIDADE_DO_SUJEITO_NO_ESTUDO.pdf	27/11/2015 13:15:41	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE.pdf	27/11/2015 13:11:10	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/11/2015 13:11:01	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Projeto Detalhado	PROJETO_ANALISE_DE_POLIMORFIS	27/11/2015	Bárbara Roberta	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.500.599

/ Brochura Investigador	OS_E_EXPRESSAO_DE_MARCADOR ES_ASSOCIADOS_AO_REPARO_DE_D NA_EM_GLIOMAS.pdf	13:09:37	Ongaratti	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	27/11/2015 13:09:02	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	27/11/2015 13:08:49	Bárbara Roberta Ongaratti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 14 de Abril de 2016

Assinado por:
Airton Tetelbom Stein
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br