



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VIVIAN CASTRO ANTUNES DE VASCONCELOS

IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *VEGFA* E *KDR* NO RISCO
E AGRESSIVIDADE DE GLIOMAS DE ALTO GRAU

CAMPINAS
2019

VIVIAN CASTRO ANTUNES DE VASCONCELOS

IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *VEGFA* E *KDR* NO RISCO E
AGRESSIVIDADE DE GLIOMAS DE ALTO GRAU

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para
obtenção de título de Mestra em Ciências na Área de Concentração
em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO VIVIAN CASTRO
ANTUNES DE VASCONCELOS, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA.

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de
Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências
Médicas Maristella Soares dos Santos -
CRB 8/8402

Vasconcelos, Vivian Castro Antunes, 1984-
V441i Impacto de polimorfismos nos genes VEGFA e KDR no risco e
agressividade de gliomas de alto grau / Vivian Castro Antunes de
Vasconcelos.
– Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Carmen Silvia Passos Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glioma. 2. Polimorfismo genético. I. Lima, Carmen Silvia Passos, 1957-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Associations of *VEGFA* and *KDR* single nucleotide polymorphisms and increased risk and aggressiveness of high grade gliomas

Palavras-chave em inglês:

Glioma

Polymorphism, genetic

Área de concentração: Clínica Médica Titulação: Mestra em Ciências Médicas.

Banca examinadora:

Carmen Silvia Passos Lima [Orientador]

José Augusto Rinck Junior

Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa

Data de defesa: 07-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6393-0585>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5717563377260067>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
VIVIAN CASTRO ANTUNES DE VASCONCELOS

ORIENTADOR: CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

2. PROF. DR. JOSÉ AUGUSTO RINCK JUNIOR

3. PROF. DR. ALEXANDRE ANDRÉ BALIEIRO ANASTÁCIO DA COSTA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 07/08/2019

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, por ter conseguido me transmitir todo seu entusiasmo pela ciência, e sobretudo por ter se dedicado, e jamais desistido de me ensinar a produzir com qualidade e honestidade.

Aos pacientes, por acreditarem e confiarem no nosso trabalho, sempre de forma tão humilde, generosa e esperançosa.

À Universidade Estadual de Campinas, que me acolheu em 2012 como residente de oncologia clínica, que acreditou em mim primeiro como aluna, depois como pesquisadora desse projeto, e que hoje confia seus pacientes aos meus cuidados como médica assistente.

A todos os colegas do Laboratório de Genética do Câncer, sobretudo ao Gustavo, não só pelo seu trabalho impecável do qual me tornei admiradora, mas também pela paciência e gentileza que sempre teve comigo, ainda inexperiente nessa aventura da ciência.

Às melhores amigas que eu poderia ter, Thais, Valéria, Nathália, Stephanie, Fernanda, Laura e Ana Cláudia, por sempre entenderem e respeitarem minhas escolhas, e estarem presentes nos meus melhores e piores momentos como um fundamental ponto de apoio e alegria.

Aos meus sobrinhos, Samuel, Theo e Luis, que sempre recrutam o melhor de mim e me trouxeram momentos de leveza tão importantes nessa trajetória.

Aos meus amados irmãos Nátili e Adam que desde sempre torcem e acreditam em mim. A força que vem do amor de vocês e por vocês me trouxe até aqui e sempre me levará mais longe.

Aos meus pais Valmir e Solange, que souberam me transmitir todo seu amor pela vida, pelo “novo” e pelo próximo. Por serem os verdadeiros responsáveis pela minha formação educacional e humana, e por serem meu apoio sempre incondicional.

Ao meu amado marido Victor, que comigo começou uma linda história de amor junto com esse projeto. Que não só foi o meu maior incentivador, mas que participou ativamente de diversas etapas dessa pesquisa, que se entremeou com a nossa própria história. O nosso amor é a verdadeira pedra angular desse projeto e da minha vida.

À minha amada filha Olivia, que está do dentro do meu ventre já enviando forças inigualáveis para que eu complete essa jornada.

A conclusão desse projeto me alegra grandemente de uma maneira que jamais pude imaginar, e todos vocês foram essenciais para a concretização dessa história de sucesso.

Epígrafe

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

A angiogênese, induzida principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) ligado ao receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (KDR), foi descrita como um ponto crucial no desenvolvimento de gliomas de alto grau (GAG). A finalidade deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos gênicos (SNPs) *VEGFA* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C, -460C/T e *KDR* -604T/C, -271G/A, + 1192G /A e + 1719A /T no risco e aspectos clínicos de GAG. Esse estudo caso-controle incluiu 205 pacientes com GAG e 205 controles. Indivíduos com os genótipos *VEGFA* -2578 CC ou CA, *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -634 GC ou CC, e *VEGFA* -460 CT ou TT estiveram sob riscos 2,56, 1,53, 1,54, e 1,84 vezes maiores de GAG do que os pacientes com os demais genótipos, respectivamente. Riscos de 1,61, 2,66, 2,52, 2,53 e 2,02 vezes maiores de GAG foram documentados com as combinações dos SNPs *VEGFA* -2578 CC e *VEGFA* -1154GG, *VEGFA* -2578CC ou CA e *VEGFA* -634 GC ou CC, *VEGFA* -2578 CC ou CA e *VEGFA* -460 CT ou TT, *VEGFA* -1154 GG ou GA e *VEGFA* -634 GC ou CC, e *VEGFA* 634 GC ou CC e *VEGFA* -460 CT ou TT, respectivamente. O haplótipo “CAGT” dos SNPs do gene *KDR* foi mais comum em pacientes com tumores de grau IV do que naqueles com tumores de grau III e em pacientes com tumores de grau IV do que em controles. Indivíduos com esse haplótipo estiveram sob risco 1,76 vezes maior de desenvolver tumores de grau IV do que os indivíduos com os demais haplótipos. Apresentamos pela primeira vez, evidência preliminar de que os SNPs *VEGFA* -2578C/A e *VEGFA* -1154 G/A aumentam o risco de GAG, e que o haplotipo “CAGT” do gene *KDR* altera a agressividade e o risco de GAG de grau IV no Brasil.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Glioma.

ABSTRACT

Angiogenesis, induced by the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) through its ligation to the vascular endothelial growth receptor 2 (KDR), has been described as a crucial point in high-grade gliomas (HGG) development. The aim of this study was to evaluate the influence of *VEGF* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C, -460C/T SNPs, and *KDR* -604T/C, -271G/A, +1192G/A and +1719A/T SNPs on risk and clinicopathological aspects of HGG. This case-control study enrolled 205 HGG patients and 205 controls. Individuals with *VEGFA* -2578 CC or CA, *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -634 GC or CC, and *VEGFA* -460 CT or TT genotypes were under 2.56, 1.53, 1.54, and 1.84-fold increased risks of HGG, compared to others, respectively. A 1.61, 2.66, 2.52, 2.53, and 2.02-fold increased risks of HGG were seen in individuals with *VEGFA* -2578 CC plus *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -2578 CC or CA plus *VEGFA* -634 GC or CC, *VEGFA* -2578 CC or CA plus *VEGFA* -460 CT or TT, *VEGFA* -1154 GG or GA plus *VEGFA* -634 GC or CC, and *VEGFA* 634 GC or CC plus *VEGFA* -460 CT or TT combined genotypes, respectively, when compared to others. The “CAGT” haplotype of the *KDR* SNPs was more common in patients with grade IV than in those with grade III tumors, and individuals carrying this haplotype were at 1.76-fold increased risk to develop grade IV tumors than others. We present, for the first time, preliminary evidence that *VEGF*-2578C/A and *VEGF* -1154 G/A SNPs increases HGG risk, and “CAGT” haplotype of the *KDR* gene alter HGG aggressiveness and risk of grade IV tumors in Brazil.

Keywords: Polymorphism, genetic. Glioma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Mecanismo da angiogênese (AG) tumoral.....	22
Figura 2. Representação gráfica da distribuição dos genótipos.....	34
Figura 3. Representação do desequilíbrio de ligação dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i>	74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Polimorfismos de base única dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> , frequências genotípicas e papel dos alelos selvagem e variante	26
Tabela 2. Principais estudos relacionados aos SNPs dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em risco de gliomas.....	28
Tabela 3. Características clínicas dos pacientes com glioma de alto grau e controles.....	37
Tabela 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos loci dos polimorfismos do gene <i>VEGFA</i> de pacientes com glioma de alto grau.....	38
Tabela 5. Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos loci dos polimorfismos do gene <i>KDR</i> de pacientes com glioma de alto grau.....	38
Tabela 6. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por genótipos e alelos dos polimorfismos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i>	39
Tabela 7. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações de genótipos dos polimorfismos do gene <i>VEGFA</i>	43
Tabela 8. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações de genótipos dos polimorfismos do gene <i>KDR</i>	46
Tabela 9. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações dos genótipos dos polimorfismos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i>	47
Tabela 10. Frequências dos genótipos dos polimorfismos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em pacientes com glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.....	53
Tabela 11. Frequências das combinações dos genótipos dos polimorfismos no gene <i>VEGFA</i> em pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.....	58

Tabela 12.	Frequências das combinações dos genótipos dos polimorfismos no gene <i>KDR</i> em pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.....	62
Tabela 13.	Frequências das combinações dos genótipos dos polimorfismos nos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.....	65
Tabela 14.	Haplótipos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em pacientes com glioma de alto grau e controles.....	75
Tabela 15.	Frequência dos haplótipos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em pacientes com glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Base nitrogenada adenina
AA	Astrocitoma anaplásico
AG	Angiogênese
AGIII	Astrocitoma grau III
ANGPT	Angiopietina
Bfgf	Basic fibroblast growth factor
C	Base nitrogenada citosina
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide
DP	Desvio padrão
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Base nitrogenada guanina
GAG	Glioma de alto grau
GBM	Glioblastoma multiforme
GI	Glioma grau I
GII	Glioma grau II
GIII	Glioma grau III
GIV	Glioma grau IV
H&E	Hematoxilina e eosina
HIF	<i>Hypoxia inducible fator</i>
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confiança
IDH-1	Isocitrate dehydrogenase 1 mutation
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
LAGECA	Laboratório de Genética do Câncer
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
NO	Nitric Oxide
OA	Oligoastrocitoma

OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
P	Valor de p
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécie reativa de oxigênio
R _s	Número de referência do polimorfismo gênico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
T	Base nitrogenada tiamina
TAF	<i>Tumor angiogenesis fator</i>
TCLE	Termos de consentimento livre e esclarecido
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade Estadual de São Paulo
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth fator A</i>
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	17
1. Considerações iniciais e dados epidemiológicos	17
2. Aspectos clínicos.....	18
3. Angiogênese.....	20
4. A angiogênese no glioma de alto grau.....	23
5. VEGFA e KDR.....	25
OBJETIVOS	30
PACIENTES E MÉTODOS	31
1. Aspectos clínicos e do tumor.....	31
2. Análise dos genótipos dos polimorfismos gênicos.....	32
3. Aspectos éticos.....	34
4. Análise estatística.....	35
RESULTADOS	37
1. Características clínicas dos pacientes e controles	37
2. Polimorfismos nos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e risco de GAG.....	38
3. Combinações de polimorfismos nos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e risco de GAG	42
4. Polimorfismos nos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e aspectos clinicopatológicos de GAG.....	52
5. Combinações de polimorfismos nos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e aspectos clinicopatológicos de GAG.....	57
6. Haplótipos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e risco de GAG.....	73
7. Haplótipos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> e aspectos clínico-patológicos de GAG.....	76
DISCUSSÃO	80

CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	94

INTRODUÇÃO

1. Considerações iniciais e dados epidemiológicos

Os gliomas são neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC) que se originam de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais). Representam o maior grupo de tumores cerebrais primários malignos, com cerca de 30% de incidência entre todos os tumores cerebrais. (1)

Os dados epidemiológicos de gliomas de alto grau (GAG) não são totalmente conhecidos no Brasil, onde estimam-se 5.810 casos novos de câncer do SNC em homens, e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores indicam um risco estimado de 5,6 casos novos a cada 100 mil habitantes, e correspondem à décima e nona posição em incidência para homens e mulheres, respectivamente. (2)

Apesar da incidência relativamente baixa dos GAG, a mortalidade é bastante alta com apenas 5 a 10% de pacientes vivos em cinco anos. (3)

Uma classificação histológica dos tumores primários do SNC foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um meio de prever o comportamento biológico e clínico dessas neoplasias. (4) Até o ano de 2016 essa classificação era norteada exclusivamente por características histológicas, mas em sua última edição houve a marcada e inédita incorporação de parâmetros moleculares na classificação, como a incorporação da avaliação de IDH-1 e presença de deleção 1p 19q, representando um avanço conceitual e prático sobre o modelo antecessor de 2007. (5)

A classificação da OMS inclui uma categorização em graus, que funcionam como uma "escala de agressividade", que vai de grau I à IV, sendo que os tumores astrocíticos difusamente infiltrativos que demonstram anaplasia e atividade mitótica são

classificados como grau III, e tumores que além dessas características exibam proliferação microvascular endotelial e/ou necrose como grau IV. (4,5)

O astrocitoma anaplásico (AA) e o glioblastoma multiforme (GBM) são classificados como astrocitoma de grau III (AGIII) e grau IV da OMS, respectivamente, e também são conhecidos como GAG. (4,5)

Os GAG podem ser diagnosticados como tumores primários ou secundários, quando se originam a partir da evolução de um glioma de baixo grau, o que confere melhor prognóstico. (6)

O GBM representa 54% de todos os gliomas, sendo 1,5 vezes mais frequente em homens do que em mulheres e duas vezes mais frequente em brancos do que negros, com pico de incidência na sexta década de vida. (1)

2. Aspectos clínicos

Os sintomas mais comuns na apresentação clínica de pacientes com GAG são cefaléia, convulsões e déficits neurológicos na parte motora, fala ou memória. A cefaléia é relatada como sintoma inicial em 50 a 60% dos casos, as convulsões são notificadas em 20 a 40% e déficits motores em 10 a 40%. (7)

No cenário clínico, o grau do tumor é um fator fundamental que influencia a escolha das terapias, particularmente a determinação do uso de radioterapia e quimioterapia adjuvante. Porém, apesar dos aparentes avanços no tratamento do GAG, o prognóstico de pacientes com AA e GBM continua desfavorável, com sobrevida global em cinco anos de cerca de 40% para AA e sobrevida global mediana de 5% para os pacientes com GBM. (3)

Os fatores de risco para o desenvolvimento de GAG ainda não são bem compreendidos, sendo que a grande maioria dos pacientes com GAG não tem história familiar de tumores cerebrais ou qualquer fator de risco identificável. (8)

Apenas 1 a 5% dos casos são atribuídos à síndromes genéticas hereditárias. (9)

As síndromes genéticas que conferem um risco aumentado de desenvolvimento de gliomas incluem a neurofibromatose tipo 1, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Turcot, síndrome de Lynch e Von-Hippel Lindau. (10,11,12)

Alguns polimorfismos gênicos de base única, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), também foram relacionados a maior risco de desenvolvimento de gliomas. SNP é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base nitrogenada na sequência do genoma entre indivíduos de uma espécie ou entre pares de cromossomos de um indivíduo. Por exemplo, indivíduos com variantes em genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos, reparo de DNA, inflamação e resposta imune podem ter maior risco de gliomas. (13)

Embora individualmente essas variantes genéticas possam não fornecer associações fortes o suficiente para identificar grupos de alto risco de GAG para rastreamento específico, podem fornecer novos conhecimentos sobre as vias envolvidas na carcinogênese dos tumores, e juntas podem potencialmente fomentar uma ferramenta de rastreamento dirigido. (14)

Além dos fatores genéticos, o único fator de risco ambiental bem estabelecido para o desenvolvimento de GAG é a exposição à radiação ionizante, como ocorre na radioterapia terapêutica para tumores na infância. A latência entre a irradiação e o desenvolvimento de um glioma varia de cinco anos a várias décadas. (15...)

Dados sobre outras exposições ambientais, incluindo radiação eletromagnética, radiação de radiofrequência de telefones celulares e traumatismo craniano não foram conclusivos em demonstrar uma relação de causa-efeito na origem do tumor. (16,17)

3. Angiogênese

A angiogênese (AG) é um processo complexo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais maduras de um leito vascular já existente. (18)

A AG ocorre rotineiramente durante condições fisiológicas, como processo inicial de cicatrização de uma ferida, ou em condições patológicas, como na inflamação crônica, em reações imunes e neoplasias. (19,20)

A AG é um processo crucial na sobrevivência e desenvolvimento de tumores. Embora já seja conhecido que anormalidades genéticas promovem o crescimento tumoral, a sobrevivência das células neoplásicas não seria possível a partir do tamanho de 1mm^3 , se não fosse a AG. Essa medida representa a distância máxima pela qual o oxigênio e nutrientes podem ser oferecidos a tecidos por difusão simples, dispensando a irrigação por vasos sanguíneos próprios. (21)

A hipóxia tumoral é o principal estímulo para a formação de novos vasos. A hipóxia tumoral induz a formação de fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs) e a liberação de óxido nítrico (NO), que ativam genes de transcrição do *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e de outros fatores pró-angiogênicos, como o *platelet-derived growth factor* (PDGF) e o *basic fibroblast growth factor* (bFGF). (22)

A ativação dos receptores tirosina-quinase dos vasos é iniciada pela ligação da molécula ativadora (por exemplo, fator de crescimento) no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz a dimerização dos receptores, resultando na autofosforilação dos resíduos tirosina dentro do domínio citoplasmático, no qual o primeiro substrato deste domínio é o próprio receptor. (23)

A ligação do VEGF, produzido por células tumorais, aos seus diferentes receptores em vasos, os *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR), inicia

diferentes vias de sinalização intracelular. A mobilização de Ca^{2+} e a ativação de proteína quinase C (PKC) dão estímulo à atividade endotelial da síntese do NO, sendo a chave da sinalização da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF, com papel determinante na permeabilidade vascular. (22) Assim, em seu conjunto, os fatores indutores da AG produzidos por células tumorais determinam a proliferação de brotos vasculares a partir de vasos do estroma, que se dirigem ao tumor para nutrição e oxigenação. (23)

O processo da AG tumoral está apresentado de forma esquemática na **Figura 1**.

A primeira descrição da AG em neoplasias ocorreu na década de 70, quando foi descoberto e isolado um fator em tumores humanos, o *tumor angiogenesis factor* (TAF), com atividade mitogênica em células endoteliais e que levava à formação de novos capilares a partir de vasos preexistentes. O pesquisador responsável pela sua descrição propôs que o TAF seria produzido pelas próprias células tumorais. Assim, a AG foi considerada um pré-requisito para o crescimento neoplásico. Mais tarde, o TAF seria renomeado como VEGF. (24)

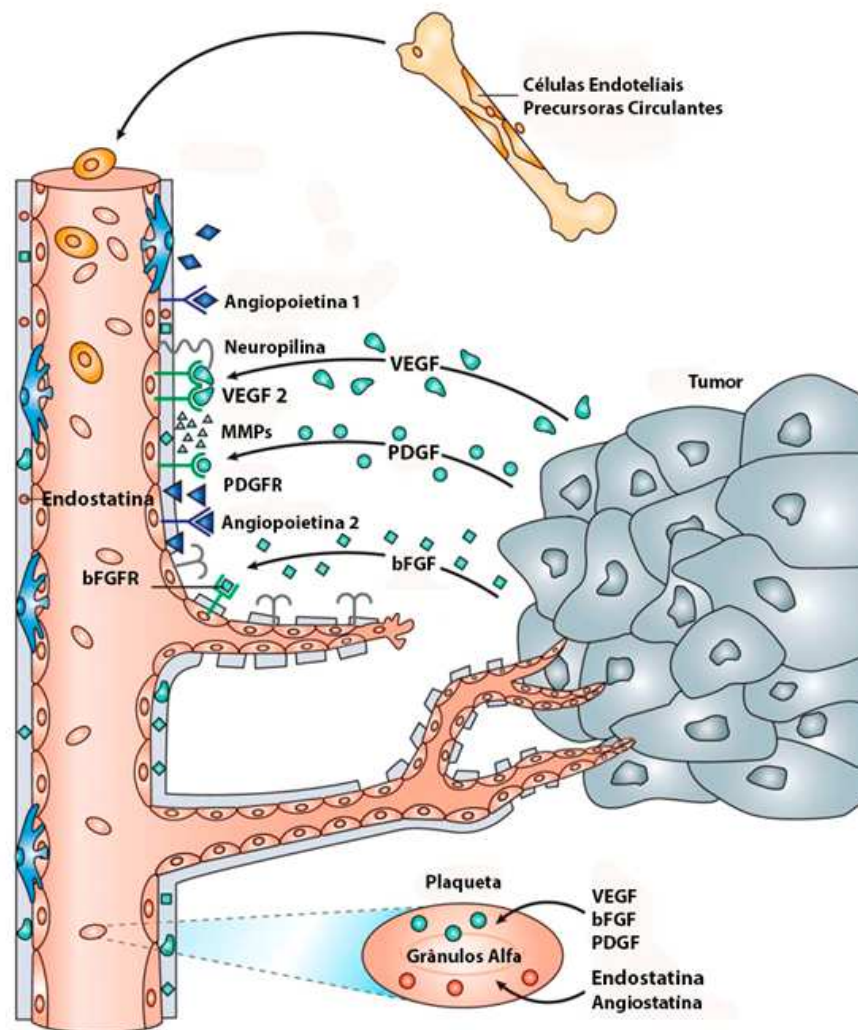


Figura 1. Mecanismo da angiogênese (AG) tumoral. A angiopoietina 1 (ANGPT1), expressa por muitas células, liga-se ao receptor endotelial TIE2 e ajuda a manter um estado normalizado nos vasos sanguíneos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é secretado por células tumorais e liga-se ao seu receptor (KDR) e à neuropilina nas células endoteliais de vasos. As metaloproteinases de matriz (MMPs), lançadas pelas células tumorais e pelas células endoteliais estimuladas com VEGF e agem no estroma em um processo de destruição de matriz celular. As células tumorais também secretam angiopoietina 2 (ANGPT2), que compete com ANGPT1 para ligação ao receptor endotelial TIE2. ANGPT2 aumenta a degradação da membrana basal vascular e migração do endotélio células, facilitando assim a formação do broto e posterior AG tumoral. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína pró-AG secretada por tumores, pode aumentar o seu próprio receptor (PDGFR) em células endoteliais; o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) é também pró-AG e secretado por tumores. Nesse contexto de proteínas pró (VEGF ou bFGF) e anti-AG (endostatina) está o papel das plaquetas, ao liberar via grânulos alfa de armazenamento tais fatores ao endotélio local, de forma não direta como as células tumorais o fazem. (Adaptado de Zhao et al., 2015) (24)

4. A angiogênese no glioma de alto grau

Os GAG são tumores altamente vascularizados e a presença de proliferação microvascular é um fator que indica que o tumor é de alto grau. (4) Algumas moléculas envolvidas na AG foram encontradas em GAG, principalmente no GBM. O fator mais claramente envolvido nesse processo é o fator de crescimento endotelial vascular do tipo A (VEGFA), que é mais frequentemente expresso adjacente às áreas de necrose dos GAG, mas não em gliomas de grau I ou II, (25,26) o que sugere que a progressão maligna do astrocitoma de baixo grau para o GBM inclua a proliferação de vasos.

Os receptores de VEGFA são expressos pelas células endoteliais do tumor, estabelecendo uma alça parácrina na qual as células tumorais estimulam a proliferação vascular. O microambiente é, portanto, importante na carcinogênese do GAG, particularmente para o GBM, com regiões de neovascularização frequentemente circundando zonas de necrose. (27)

Acredita-se que um dos principais desencadeantes da AG relacionada ao GAG seja a resposta fisiológica à hipóxia, que induz o aumento da transcrição do gene *VEGFA* pela família dos fatores de transcrição do fator indutível por hipóxia (HIF). (28)

Uma hipótese intrigante sugere que a trombose de pequenos vasos sangüíneos, talvez mediada pelo fator tecidual, induza a micronecrose, sendo que esses eventos podem ser responsáveis por iniciar as cascatas de hipóxia e AG. (29)

O trabalho de quatro grupos independentes revelou que as células-tronco de gliomas podem contribuir para a formação de vasos sangüíneos em tumores, diferenciando-se em células endoteliais, um fenômeno que talvez seja melhor denominado de “mimetismo vascular”. (30) Esse achado é importante porque indica que a progênie das células-tronco de gliomas não estão limitadas, exclusivamente, a uma linhagem celular neuroepitelial. (30)

Usando espécimes cirúrgicos humanos, Wang et al. e Ricci-Vitiani et al. encontraram um conjunto de células endoteliais revestindo vasos tumorais que carregavam as mesmas anormalidades genéticas (por exemplo, amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico ou mutação do *TP53*), que marcavam as células tumorais malignas adjacentes. Utilizando células tumorais agudamente dissociadas, esses dois grupos de pesquisa também revelaram a presença de uma população de células progenitoras endoteliais neoplásicas *in vivo*, e mostraram que uma subpopulação de células-tronco de glioma deu origem às células endoteliais *in vitro*. Essas células, quando transplantadas intracranianamente em camundongos imunocomprometidos, deram origem a tumores nos quais uma proporção das células endoteliais que contribuem para os vasos sanguíneos se originou das células de glioma humano transplantadas, e não dos camundongos. (31,32)

Utilizando um modelo murino de GBM, Soda et al. observaram uma subpopulação de células endoteliais dentro desses tumores que expressavam tanto antígenos específicos de células endoteliais quanto específicos de tumor. Os três grupos observaram que as células endoteliais derivadas de tumor são mais comuns na região central do GBM, sendo menos frequentemente encontradas na periferia do tumor. (33)

A observação e relato de Cheng et al. também fornece evidências de que as células-tronco de gliomas podem gerar células que envolvem os vasos sanguíneos no GBM. Os pesquisadores observaram que as células-tronco de glioma são capazes de formar células da linhagem pericítica vascular *in vitro*, podendo dar origem a pericitos em um modelo de xenoenxerto de camundongo *in vivo*. Além disso, os pesquisadores descreveram que a maioria dos pericitos do tumor carregam as mesmas alterações genéticas encontradas no GBM. Surpreendentemente, os pericitos neoplásicos também foram encontrados no cérebro normal peritumoral. (34)

Esses achados têm importantes implicações para o tratamento do GAG, e nos forneceram uma compreensão mais abrangente de como os vasos sanguíneos se formam no GBM. Assim, nestes tumores, os próprios vasos sanguíneos podem fazer parte do processo neoplásico. (30)

5. VEGFA e KDR

O VEGFA é o mais importante fator estimulador da AG, e pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas, que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que exerce seu efeito no endotélio de vasos, sendo o mais bem estudado e compreendido. (35)

O VEGFA é codificado pelo gene VEGFA, localizado no braço curto do cromossomo 6p21.3.(36)

Dentre os SNPs descritos no gene *VEGFA*, o 2578C/A (37), 2489C/T (38), 1154G/A (37), e 460C/T (39) estão localizados na região promotora do *VEGFA*, e o SNP 634G/C (39) está localizado na região 5' não traduzida do gene, e são alvos do presente estudo (39)

O KDR é o principal receptor do VEGFA, e a ligação KDR-VEGFA induz a AG ao ativar esse receptor pertencente à família de receptores tirosina quinase. (40) O gene *KDR* está localizado no cromossomo 4q11-q12 (41). Dentre os SNPs descritos no gene *KDR*, os SNPs 271G/A (42) e o 604T/C (43) estão localizados na região promotora e os SNPs 1192G/A e 1719T/A estão localizados na região codificadora do gene, e são objetos dessa pesquisa. (43,44)

As frequências dos genótipos dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* em indivíduos de diversas etnias, bem como os papéis dos alelos distintos de cada SNP na quantidade ou função das proteínas estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Polimorfismos de base única dos genes *VEGF* e *KDR*, frequências genotípicas e papel dos alelos selvagem e variante

Gene e SNP	Nº de referência do SNP	Frequências genotípicas (%)			Papel dos alelos dos SNPs (referências)
<i>VEGF</i> 2578C/A	rs699947	CC (19,9 - 52,2)	CA (40,1 - 55,7)	AA (7,4 - 26,3)	Alelo ancestral C e níveis aumentados de <i>VEGFA</i> (45) (46) (47) (48) Alelos C e A e níveis similares de <i>VEGFA</i> (49)
<i>VEGF</i> 2489C/T	rs1005230	CC (22 - 51,8)	CT (40,7 - 50,0)	TT (7,4 - 28,0)	Alelo variante T e maior transcrição do <i>VEGFA</i> (38)
<i>VEGF</i> 1154G/A	rs1570360	GG (36,0 - 47,0)	GA (41,1 - 50,0)	AA (10,9 - 14,0)	Alelo ancestral G e níveis aumentados de <i>VEGFA</i> (45)(48)
<i>VEGF</i> 460C/T	rs833061	CC (3,4 - 31,9)	CT (39,2 - 60,5)	TT (8,3 - 54,4)	Alelo ancestral C e maior expressão do <i>VEGFA</i> (50) Alelo variante T e níveis aumentados de <i>VEGFA</i> (47) Alelos C e T e expressões similares de <i>VEGFA</i> (39)
<i>VEGF</i> 634G/C	rs2010963	GG (25,7 - 52,3)	GC (39,0 - 54,0)	CC (8,7 - 20,3)	Alelo ancestral G e maior expressão do <i>VEGFA</i> (50) Alelo ancestral G e níveis aumentados de <i>VEGFA</i> (39) (48) (51) Alelo ancestral G e níveis reduzidos de <i>VEGFA</i> (46) (47)
<i>KDR</i> 271G/A	rs7667298	GG (13,0 - 48,8)	GA (46,3 - 63,5)	AA (4,7 - 40,7)	Alelo variante A e maior expressão do <i>KDR</i> (42)
<i>KDR</i> 604T/C	rs2071559	TT (12,2 - 49,0)	TC (45,3 - 60,0)	CC (4,1 - 40,9)	Alelo ancestral T e maior expressão do <i>KDR</i> (44)
<i>KDR</i> 1192G/A	rs2305948	GG (53,3 - 94,0)	GA (6,0 - 36,3)	AA (0,6 - 11,7)	Alelo ancestral G e maior ligação ao <i>VEGFA</i> (44)
<i>KDR</i> 1719A/T	rs1870377	AA (1,7 - 31,1)	AT (20,0 - 46,7)	TT (24,4 - 78,3)	Alelo variante T e maior ligação ao <i>VEGFA</i> (44)

SNP: polimorfismo gênico de base única, rs: número de referência, VEGFA: fator de crescimento vascular endotelial, KDR: receptor do fator de crescimento vascular endotelial

Em resumo, o alelo “C” do *VEGFA* -2578C/A (45,46,47,48) e o alelo “G” of *VEGFA* -1154G/A (45,48) foram associados a maior produção do VEGFA comparados aos alelos “A”, enquanto que o alelo “T” of *VEGFA* -2489C/T foi associado a miaior transcrição do VEGFA.(38) Entretanto, o impacto funcional do *VEGFA* -634G/C (46,50) e -460C/T (39,50) permanecem incertos. Considernado os SNPs do *KDR*, os alelos “T” e “G” do -604T/C e +1192G/A foram associados com maior expressão e maior eficiência de ligação para o VEGFA (44), e o alelo “A” do -271G/A e “T” do +1719A/T foram associados a maior expressão do KDR (42) e maior eficiência de ligação do KDR ao VEGFA, respectivamente. (44)

Existem poucos estudos com foco na associação de SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* no risco e aspectos clinicopatológicos de GAG. Nenhum desses estudos foi realizado exclusivamente em GAG, pois incluem também gliomas de baixo grau, e exceto pelo estudo de Linhares et al. (52), que avaliou europeus caucasianos, todos os outros estudos foram conduzidos exclusivamente em chineses.

A sùmula dos estudos mais consistentes sobre AG e risco ou aspectos clinicopatológicos de pacientes com diagnóstico de glioma e seus principais resultados e conclusões estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Principais estudos relacionados aos SNPs dos genes *VEGFA* e *KDR* e risco de gliomas.

Estudos	Principais resultados e conclusões
Li <i>et al.</i>, 2011 SNPs no <i>VEGFA</i> em Chineses N total= 766 GI e GII= 525 GIII e GIV= 241	<i>VEGFA</i> -634 “C” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus)
Chen <i>et al.</i>, 2012 SNPs no <i>KDR</i> em Chineses N total= 766 GI – GIII= 312 GIV= 360	<i>KDR</i> -604 “C” e maior risco de de glioma (incluindo todos os graus)/ sem significância para GIV <i>KDR</i> +1192 “A” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus)/
Jiang <i>et al.</i>, 2013 SNPs no <i>VEGFA</i> em Chineses N total= 469 GIII= 165 GIV= 304	<i>VEGFA</i> -634 “C” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus), sendo o risco mais pronunciado em GIV para genótipo “CC”
Zhang <i>et al.</i>, 2016 SNPs no <i>VEGFA</i> e <i>KDR</i> em Chineses N total= 477 GII-GIII= 357 GIV= 289	<i>KDR</i> -604 “C” e maior risco de de glioma (incluindo todos os graus) <i>KDR</i> +1192 “A” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus) <i>KDR</i> +1719 “T” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus)
Gao <i>et al.</i>, 2016 SNPs no <i>KDR</i> em Chineses N total= 157 GIII= 38 GIV= 17	<i>KDR</i> -604 “C” e maior risco de de glioma (incluindo todos os graus)
Zhao <i>et al.</i>, 2017 Metanálise de 4 estudos que avaliaram risco de SNPs no <i>VEGFA</i> e glioma em Chineses	<i>VEGFA</i> -634 “C” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus)
Linhares <i>et al.</i>, 2018 SNPs no <i>VEGFA</i> em Portugueses N total= 126 GIV= 86	<i>VEGFA</i> -460 “T” e maior risco de glioma (incluindo todos os graus)

N: número; GI: glioma grau I da OMS; GII: glioma grau II da OMS; GIII: glioma grau III da OMS; GIV: glioma grau IV da OMS; SNP: polimorfismo gênico de base única, *VEGFA*: gene do fator de crescimento vascular endotelial, *KDR*: gene do receptor do fator de crescimento vascular endotelial.

Não encontramos na literatura estudos que avaliem o papel do SNP *VEGFA* -1154 GG no risco ou aspectos clínicos de GAG.

Considerando a escassez de informações sobre esse tema, e que o impacto dos SNPs depende da origem étnica da população, traçamos o presente estudo com os objetivos de determinar se os SNPs *VEGFA* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C, -460C/T, e *KDR* -604T/C, -271G/A, + 1192G/A, + 1719A/T afetam o risco e os aspectos clinicopatológicos de GAG em uma população etnicamente diferente e miscigenada do Brasil.

OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- Verificar se os SNPs 2578C/A, 2489C/T, 1154G/A, 460C/T, 634G/C no gene *VEGFA* e 271G/A, 604T/C, 1192G/A e 1719A/T no gene *KDR* estão associados com risco de GAG, e
- Verificar se os SNPs 2578C/A, 2489C/T, 1154G/A, 460C/T, 634G/C no gene *VEGFA* e 271G/A, 604T/C, 1192G/A e 1719A/T no gene *KDR* estão associados com aspectos clínicos de GAG.

PACIENTES E MÉTODOS

1. Aspectos clínicos e do tumor

Este estudo incluiu pacientes adultos, maiores de 18 anos, com diagnóstico de GAG da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e da Universidade de São Paulo (USP), diagnosticados entre os anos 2000 e 2015. O grupo controle foi constituído por doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP atendidos no mesmo período de tempo.

Foram excluídos os pacientes que não aceitaram participar do estudo, os pacientes que não tiveram amostras de DNA adequadas para as genotipagens e os pacientes com diagnóstico presuntivo de GAG sem diagnóstico histológico, exceto por um paciente com diagnóstico presuntivo de GAG em tronco cerebral.

Os dados relativos à identificação, idade, gênero e grau histológico do tumor, foram obtidos do prontuário médico de cada paciente pela pesquisadora responsável pelo estudo. Os dados relativos à identificação, idade e gênero dos controles foram obtidos das fichas de triagem obtidas para a doação de sangue. Os controles foram pareados aos pacientes, sempre que possível, por idade e gênero.

O diagnóstico de GAG foi realizado por exame histológico de fragmentos do tumor obtidos durante a ressecção cirúrgica ou a partir de biópsia cerebral quando a cirurgia de ressecção não foi indicada, de acordo com as normas da OMS. (4) Os exames foram realizados em laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e da USP. Os casos diagnosticados em serviços externos à estas Instituições foram revisados por patologistas especialistas em Neuropatologia da UNICAMP e USP.

O tamanho amostral do estudo teve como base as frequências dos genótipos de cada SNP em indivíduos de outras populações e foi calculado conforme descrição prévia para garantir que os três possíveis genótipos (homozigoto ancestral, heterozigoto e homozigoto variante) estivessem adequadamente representados. Identificamos o montante de 135 pacientes como o tamanho amostral desejado para o estudo.

2. Análise dos genótipos dos polimorfismos gênicos

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico dos pacientes com GAG por meio da técnica de extração com cloreto de lítio e proteinase K. (53) As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização para os exames.

Os genótipos dos referidos SNPs foram obtidos por meio da amplificação das regiões de interesse dos genes pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), usando TaqMan® SNP Genotyping Assays, (Applied Biosystems®, CA, EUA), com as referências dos SNPs do *VEGF* (número do rs do SNP e número do ensaio: rs699947, C_8311602_10; rs1005230, C_8311612_10; rs1570360, C_1647379_10; rs2010963, C_8311614_10; rs833061, C_1647381_10) e do *KDR* (número do rs do SNP e número do ensaio: rs2305948, C_22271999_20; rs1870377, C_11895315_20; rs7667298, C_28992770_10 e rs2071559, C_15869271_10).

A PCR foi realizada com 1 µl de DNA de cada paciente, na concentração de 50 µg/µl, de acordo com o método recomendado pelo fabricante das sondas TaqMan®. De forma sucinta, foram adicionados 0,5 µl de SNP Genotyping Assay Mix 1X (com dois pares de sondas e dois fluorocromos detectores, FAM® e VIC®), 5 µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix 1x, que contém a AmpliTaqGold® DNA

polimerase, desoxiribonucleotídeos (dNTPs) e tampão com componentes otimizadores da reação e H₂O (3,5 µl) para um volume final de 10 µl. As condições de amplificação consistiram na ativação inicial da AmpliTaq Gold a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de incubação a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

Controles positivo pertinente (DNA genômico de indivíduos saudáveis, com genótipos já previamente estabelecidos) e negativo (água estéril) foram colocados em todas as reações de genotipagem. Amostras escolhidas aleatoriamente (15,0%), foram novamente genotipadas como controle de qualidade do método, com 100,0% de concordância entre as determinações. As imagens dos genótipos foram analisados pelo software TaqMan Genotyper (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos) e identificadas por dois observadores distintos e independentes (**Figura 2**).

Todas as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética do Câncer (LAGECA) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

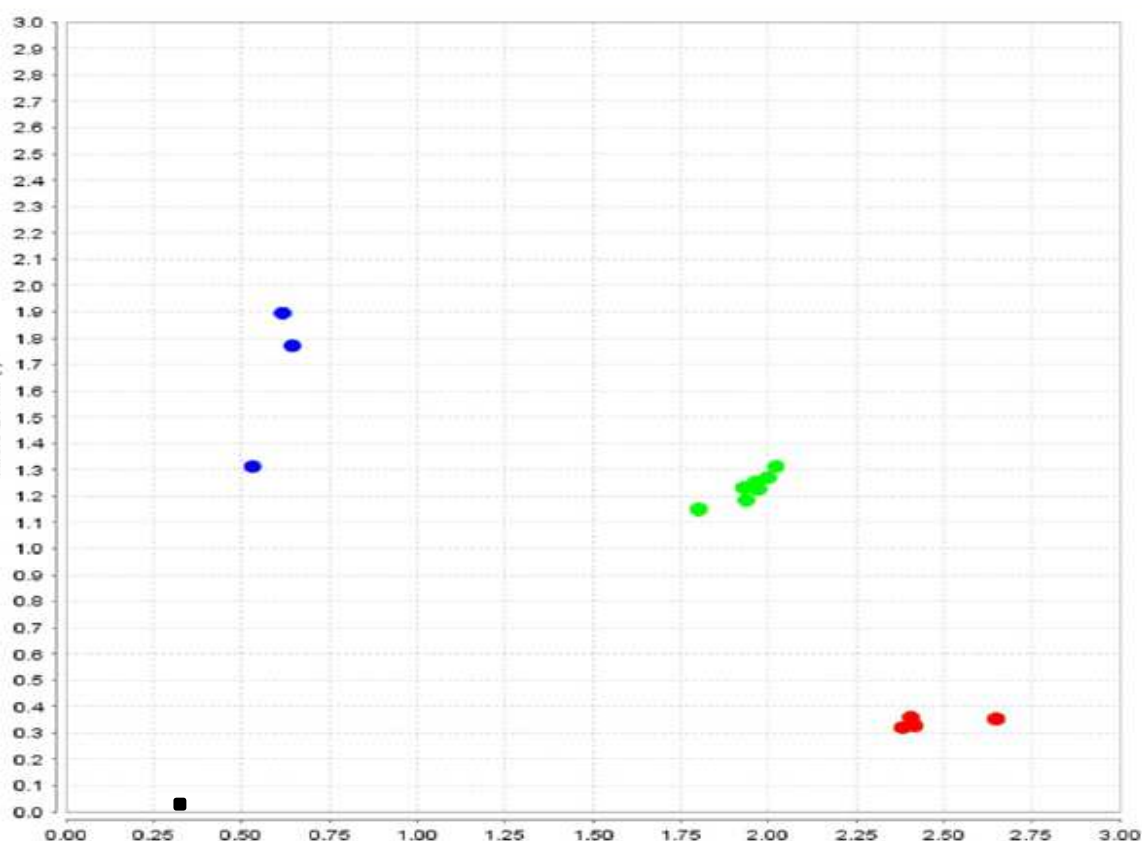


Figura 2. Representação gráfica dos genótipos. Distribuição dos três distintos genótipos de um determinado polimorfismo, analisado pelo TaqMan Genotyper Software (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), após reação de polimerase em cadeia em tempo real. A figura representa um plot de discriminação alélica, onde os círculos vermelho, verde e azul representam, respectivamente, os genótipos homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante. O quadrado preto representa o controle negativo da reação.

3. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados após a obtenção do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) assinados por pacientes e controles que aceitaram participar do estudo proposto. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinki, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM da UNICAMP (processo 21998214.3.0000.5404) (**Anexo**).

4. Análise estatística

O teste de verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos dos polimorfismos avaliados nos pacientes do estudo.

O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado pelo teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado (χ^2). A regressão logística múltipla foi feita para obter as razões de chance “odds ratio” (ORs), ajustadas por eventuais discrepâncias específicas para cada variável categórica, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%. A correção para múltiplo testes, quando aplicável, foi feita pelo método de Bonferroni.

Foram considerados como referencias, os genótipos ou alelos dos SNPs do *VEGFA* e *KDR* associados com produção padrão do VEGFA ou KDR ou afinidade padrão do KDR pelo VEGFA. Os genótipos ou alelos associados com maior produção do VEGFA e KDR ou maior afinidade do KDR pelo VEGFA, que ao menos em teoria estariam associados a maior risco ou agressividade do tumor, foram os objetos de teste.

Considerando que os papéis dos alelos “G” e “C” do *VEGFA* -634G/C e “C” e “T” do *VEGFA* -460C/T na produção do VEGFA são controvertidos, todos os genótipos e alelos foram testados no risco e manifestações clínicas de pacientes e biológicas do tumor.

O software Haploview 4.2 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview) foi utilizado para marcar todos os haplótipos comuns e as suas frequências. Haplótipos com frequência maior que 10% foram selecionados para as análises. O desequilíbrio de ligação (LD) foi medida pelo coeficiente de desequilíbrio (D'), e a significância de LD foi analisada para $D' \geq 80\%$. Uma análise de bootstrap foi executada como uma técnica de reamostragem em todos os resultados significativos. (54).

Os haplotipos foram analisados de acordo com os papéis funcionais da maioria dos alelos do *VEGFA* e *KDR*. Foram considerados referências os haplótipos com a maioria dos alelos associados com maior produção de VEGFA ou KDR ou maior afinidade do KDR pelo VEGFA, e os haplótipos do *VEGFA* com a maioria dos alelos associados com menor produção do VEGFA.

Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos, e para correção por múltiplos testes valores de P menores que 0,017 foram considerados significativos.

Todas as análises foram realizadas por estatístico do LAGECA, com a utilização dos programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences* versão 15.0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

1. Características dos pacientes e controles

Foram incluídos no estudo 410 indivíduos, sendo 205 pacientes com diagnóstico de GAG e 205 controles.

Do total de 216 pacientes com diagnóstico de GAG incluídos no estudo, 11 pacientes foram excluídos, pois não apresentaram material biológico satisfatório para a avaliação molecular.

As características clínicas dos pacientes e controles incluídos no estudo estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes com glioma de alto grau e controles.

Características clínicas	Pacientes (N, mediana, DP,%)	Controles (N, mediana, DP,%)	Valor <i>p</i>
Idade ao diagnóstico			
Mediana	54 (15-82)	50 (18-64)	<0,0001
Média ± DP	51 ± 15,3	48 ± 8,10	0,006
Gênero			
Feminino	70 (34%)	105 (51%)	0,001
Masculino	135 (66%)	100 (49%)	
Grau histológico *			
grau III	36 (18%)	N A	
grau IV	168 (81%)	N A	
Não classificado	1	N A	

N: número absoluto; DP: desvio padrão, NA: não aplicável. *: Grau histológico classificado de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde 2007, onde grau III incluiu astrocitoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico e grau IV incluiu o glioblastoma multiforme.

Os pacientes foram mais velhos que os controles e foi observada uma maior quantidade de homens entre pacientes do que entre controles. Por esta razão, as comparações entre pacientes e controles foram ajustadas por idade e sexo por análises pertinentes.

Os resultados do HWE nos loci dos SNPs no *VEGFA* e *KDR* estão representados na **Tabela 4** e **Tabela 5**, respectivamente. As amostras de controles e de pacientes confirmaram o HWE nos loci avaliados dos genes *VEGFA* e *KDR*.

Tabela 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos loci dos polimorfismos do gene *VEGFA* de pacientes com glioma de alto grau

Polimorfismo	χ^2 ; valor de <i>P</i>
<i>VEGFA</i> 2578C/A	1,62; 0,20
<i>VEGFA</i> 2489C/T	2,22; 0,13
<i>VEGFA</i> 1154G/A	0,58; 0,44
<i>VEGFA</i> 634G/C	0,006; 0,93
<i>VEGFA</i> 460C/T	3,54; 0,06

Tabela 5. Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos loci dos polimorfismos do gene *KDR* de pacientes com glioma de alto grau

Polimorfismo	χ^2 ; Valor de <i>P</i>
<i>KDR</i> -604T/C	2,14; 0,14
<i>KDR</i> -271G/A	2,56; 0,10
<i>KDR</i> +1192G/A	0,19; 0,27
<i>KDR</i> +1719A/T	3,54; 0,06

2. Polimorfismos nos genes *VEGFA* e *KDR* e risco de GAG

As frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos dos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com GAG e controles estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por genótipos e alelos dos polimorfismos do gene *VEGFA* e *KDR*.

Genótipos/alelos	Pacientes (N, %)	Controles (N, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA</i> -2578C/A				
CC	97 (47.3)	77 (37.6)	0.06	1.47 (0.98 – 2.20)
CA+AA	108 (52.7)	128 (62.4)		Referência
CC+CA	189 (92.2)	167 (81.5)	0.003¹	2.56 (1.36 – 4.80)
AA	16 (7.8)	38 (18.5)		Referência
C	286 (69.8)	244 (59.5)	0.004²	1.53 (1.14 – 2.03)
A	124 (30.2)	166 (40.5)		Referência
<i>VEGFA</i> -2489C/T				
CC	96 (46.8)	76 (37.1)	0.06	1.48 (0.99 – 2.21)
CT+TT	109 (53.2)	129 (62.9)		Referência
CC+CT	188 (91.7)	165 (80.5)		Referência
TT	17 (8.3)	40 (19.5)	0.002³	0.38 (0.20 – 0.71)
C	284 (69.3)	241 (58.8)		Referência
T	126 (30.7)	169 (41.2)	0.003⁴	0.64 (0.47 – 0.86)
<i>VEGFA</i> -1154G/A				
GG	124 (60.5)	100 (48.8)	0.03⁵	1.53 (1.03 – 2.29)
GG+GA	191 (93.2)	183 (89.3)	0.37	1.39 (0.68 – 2.85)
AA	14 (6.8)	22 (10.7)		Referência
G	315 (76.8)	283 (69)	0.04⁶	1.39 (1.01 – 1.91)
A	95 (23.2)	127 (31)		Referência
<i>VEGFA</i> -634G/C				
GG	65 (31.7)	88 (42.9)	0.04	0.64 (0.42-0.98)
GC+CC	140 (68.3)	117 (57.1)		Referência

Genótipos/alelos	Pacientes (N, %)	Controles (N, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
GG+GC	169 (82.4)	181 (88.3)	0.14	1.54 (0.87 – 2.72)
CC	36 (17.6)	24 (11.7)		Referência
GG	65 (31.7)	88 (42.9)		Referência
GC+CC	140 (68.3)	117 (57.1)	0.04⁷	1.54 (1.02 – 2.33)
GG+GC	169 (82.4)	181 (88.3)		Referência
CC	36 (17.6)	24 (11.7)	0.14	1.54 (0.87 – 2.72)
G	234 (57.1)	269 (65.6)		Referência
C	176 (42.9)	141 (34.4)	0.02⁸	1.38 (1.03 – 1.84)
G	234 (57.1)	269 (65.6)		0.72 (0.54 – 0.96)
C	176 (42.9)	141 (34.4)		Referência
<i>VEGFA -460C/T</i>				
CC	27 (13.2)	45 (22.0)	0.02	0.54 (0.31 – 0.92)
CT+TT	178 (86.8)	160 (78.0)		Referência
CC+CT	122 (59.5)	133 (64.9)		Referência
TT	83 (40.5)	72 (35.1)	0.32	1.23 (0.82 – 1.85)
CC	27 (13.2)	45 (22.0)		Referência
CT+TT	178 (86.8)	160 (78.0)	0.02⁹	1.84 (1.08 – 3.14)
TT	83 (40.5)	72 (35.1)		Referência
C	149 (36.3)	178 (43.4)		Referência
T	261 (63.7)	232 (56.6)	0.04¹⁰	1.32 (1.00 – 1.76)
C	149 (36.3)	178 (43.4)		0.75 (0.56 – 1.00)
T	261 (63.7)	232 (56.6)		Referência
<i>KDR -604T/C</i>				
TT	48 (23.4)	57 (27.8)	0.52	1.15 (0.74 – 1.82)
TC+CC	157 (76.6)	148 (72.2)		Referência
TT+ TC	144 (70.2)	149 (72.7)	0.54	1.15 (0.74 – 1.78)

Genótipos/alelos	Pacientes (N, %)	Controles (N, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
CC	61 (29.8)	56 (27.3)		Referência
T	192 (46.8)	206 (50.2)	0.43	1.05 (0.91 – 1.21)
C	218 (53.2)	204 (49.8)		Referência
<i>KDR -271G/A</i>				
GG	54 (26.3)	59 (28.8)		Referência
GA+AA	151 (73.7)	146 (71.2)	0.77	1.07 (0.68 – 1.67)
GG+GA	151 (73.7)	150 (73.2)		Referência
AA	54 (26.3)	55 (26.8)	0.76	1.07 (0.68 – 1.67)
G	205 (50.0)	209 (51.0)		Referência
A	205 (50.0)	201 (49.0)	0.99	1.00 (0.86 – 1.15)
<i>KDR +1192G/A</i>				
GG	155 (75.6)	144 (70.2)	0.40	1.21 (0.77 – 1.89)
GA+AA	50 (24.4)	61 (29.8)		Referência
GG+GA	202 (98.5)	197 (96.1)	0.22	2.36 (0.59 – 9.40)
AA	3 (1.5)	8 (3.9)		Referência
A	53 (12.9)	69 (16.8)		Referência
<i>KDR +1719A/T</i>				
AA	6 (2.9)	11 (5.4)		Referência
AT+TT	199 (97.1)	194 (94.6)	0.15	2.11 (0.75 – 5.94)
AA+AT	69 (33.7)	65 (31.7)		Referência
TT	136 (66.3)	140 (68.3)	0.69	1.09 (0.71 – 1.66)
A	75 (18.3)	76 (18.5)	0.84	Referência
T	335 (81.7)	334 (81.5)		1.01 (0.84 – 1.22)

N: número; %: porcentagem; OR: odds ratio ajustada por idade e sexo, IC: intervalo de confiança. Os genótipos foram analisados de acordo com o papel funcional dos alelos, e genótipos ou alelos associados com menor produção de VEGFA ou KDR ou menor eficiência de ligação foram tomados como referências nas análises; como os papéis dos alelos “G” e “C” do *VEGFA* -634G/C e “C” e “T” do *VEGFA* -460C/T na produção de

VEGFA são controversos, todos os genótipos e alelos foram testados. Resultados significativos são apresentados em negrito. ¹bootstrap = 0,003, ²bootstrap = 0,006, ³bootstrap = 0,002, ⁴bootstrap = 0,004, ⁵bootstrap = 0,03, ⁶bootstrap = 0,03, ⁷bootstrap = 0,04, ⁸bootstrap = 0,03, ⁹bootstrap = 0,02, ¹⁰bootstrap = 0,03.

Observamos que as frequências dos genótipos *VEGFA* -2578 CC ou CA, *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -634 GC ou CC, e *VEGFA* -460 CT ou TT foram maiores em pacientes com GAG do que em controles. Indivíduos com estes genótipos estiveram sob riscos 2,56, 1,53, 1,54, e 1,84 vezes maiores de desenvolver GAG do que aqueles com os demais genótipos, respectivamente. Apenas o genótipo *VEGFA* -2489 TT foi mais comum em controles do que em pacientes, sendo que indivíduos com o genótipo TT estiveram sob risco 0,38 vezes menor de GAG do que aqueles com o genótipo CC ou CT.

Frequências semelhantes de genótipos dos SNPs do gene *KDR* foram observados em pacientes e controles; indivíduos com os genótipos distintos dos SNPs estiveram sob riscos similares de GAG.

3. Combinações de polimorfismos nos genes *VEGFA* e *KDR* e risco de GAG

As frequências das combinações de genótipos dos SNPs dos genes *VEGFA* em pacientes com GAG e controles estão apresentados na **Tabela 7**. As frequências das combinações de genótipos dos SNPs no gene *KDR* em pacientes com GAG e controles estão apresentados na **Tabela 8**. As frequências das combinações de genótipos dos SNPs no gene *VEGFA* e *KDR* em pacientes com GAG e controles estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 7. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações dos genótipos dos polimorfismos do gene *VEGFA*.

Genótipos	Pacientes (N,%)	Controles (N,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA</i> -2578C/A + -2489C/T				
CC + TT	0 (0)	1 (0)	NA	NA
CA+AA + CC+CT	91 (100)	89 (98.9)		Referência
CC+CA + CT+TT	93 (100)	91 (100)	NA	NA
AA + CC	0 (0)	0 (0)		Referência
<i>VEGFA</i> -2578C/A + -1154G/A				
CC + GG	90 (54.9)	71 (41.8)	0.035¹	1.61 (1.03 – 2.52)
CA+AA + GA+AA	74 (45.1)	99 (58.2)		Referência
CC+CA + GG+GA	183 (95.8)	161 (91.0)	0.108	2.07 (0.85 – 5.04)
AA + AA	8 (4.2)	16 (9.0)		Referência
<i>VEGFA</i> -2578C/A + -634G/C				
CC + CC	36 (25.0)	24 (15.8)	0.08	1.69 (0.93 – 3.07)
CA+AA + GG+GC	108 (75.0)	128 (84.2)		Referência
CC+CA + GC+CC	140 (89.7)	117 (75.5)	0.003²	2.66 (1.29 – 5.08)
AA + GG	16 (10.3)	38 (24.5)		Referência
<i>VEGFA</i> -2578C/A + -460C/T				
CC + TT	83 (43.5)	72 (36.0)	0.16	1.34 (0.88 – 2.03)
CA+AA + CC+CT	108 (56.5)	128 (64.0)		Referência
CC+CA + CT+TT	178 (91.8)	160 (80.8)	0.004³	2.52 (1.33 – 4.74)
AA + CC	16 (8.2)	38 (19.2)		Referência
<i>VEGFA</i> -2489C/T + -1154G/A				
TT + GG	2 (2.9)	4 (5.5)	0.42	0.48 (0.08 – 2.79)
CC+CT + GA+AA	66 (97.1)	69 (94.5)		Referência

Genótipos	Pacientes (N,%)	Controles (N,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
CT+TT + GG+GA	100 (95.2)	107 (100)	NA	NA
CC + AA	5 (4.8)	0 (0)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + -634G/C</i>				
TT + CC	0 (0.0)	0 (0.0)	NA	NA
CC+CT + GG+GC	152 (100.0)	141 (100.0)		Referência
TT+CT + GC+CC	51 (87.9)	52 (82.5)	0.43	1.51 (0.53 – 4.25)
CC + GG	7 (12.1)	11 (17.5)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + -460C/T</i>				
TT + TT	0 (0.0)	1 (1.1)	NA	NA
CC+CT + CC+CT	105 (100.0)	94 (98.9)		Referência
CT+TT + CT+TT	82 (100.0)	84 (100.0)	NA	NA
CC + CC	0 (0.0)	0 (0.0)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + -634G/C</i>				
GG + CC	31 (29.0)	21 (17.1)	0.05	1.86 (0.97 – 3.54)
GA+AA + GG+GC	76 (71.0)	102 (82.9)		Referência
GG+GA + GC+CC	134 (94.4)	115 (85.2)	0.04⁴	2.53 (1.05 – 6.09)
AA + GG	8 (5.6)	20 (14.8)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + -460C/T</i>				
GG + TT	77 (50.7)	66 (40.0)	0.10	1.46 (0.92 – 2.31)
GA+AA + CC+CT	75 (49.3)	99 (60.0)		Referência
GG+GA + CT+TT	172 (95.6)	156 (89.7)	0.06	2.27 (0.94 – 5.46)
AA + CC	8 (4.4)	18 (10.3)		Referência
<i>VEGFA 634G/C + -460C/T</i>				
CC + TT	36 (22.8)	24 (15.3)	0.14	1.56 (0.86 – 2.81)
GG+GC + CC+CT	122 (77.2)	133 (84.7)		Referência
GC+CC + CT+TT	138 (84.7)	116 (72.5)	0.01⁵	2.02 (1.15 – 3.53)
GG + CC	25 (15.3)	44 (27.5)		Referência

Genótipos	Pacientes (N,%)	Controles (N,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
GC + CC + CT + TT	138 (84,7)	116 (72,5)	0,014⁵	2,02 (1,15-3,53)
GG + CC	25 (15,3)	44 (27,5)		Referência

N: número; %: porcentagem; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança. Os genótipos foram considerados de acordo com o papel funcional dos alelos, e genótipos combinados associados à menor produção de VEGFA ou KDR ou menor eficiência de ligação foram tomados como referências nas análises. Nos casos do *VEGFA* -634G/C e -460C/T, os genótipos GG e CC foram tomados como referências nas análises, respectivamente, uma vez que os genótipos GC + CC e CT + TT foram associados ao aumento do risco de gliomas de alto grau no presente estudo.

¹bootstrap = 0,04, ²bootstrap = 0,003, ³bootstrap = 0,001, ⁴bootstrap = 0,03, ⁵bootstrap = 0,008.

Tabela 8. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações dos genótipos dos polimorfismos do gene *KDR*.

Genótipos	Pacientes (N,%)	Controles (n,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>KDR</i> -604T/C + -271G/A				
TT + AA	0 (0,0)	3 (3,0)	NA	NA
TC + CC + GG + GA	103 (100,0)	96 (97,0)		Referência
TT + CT + AG + AA	91 (98,9)	92 (97,9)		Referência
CC + GG	1 (1,1)	2 (2,1)	0,479	0,40 (0,03-4,94)
<i>KDR</i> -604T/C + +1192G/A				
TT + GG	43 (48,9)	42 (47,7)		Referência
TC + CC + AG + AA	45 (51,1)	46 (52,3)	0,851	0,94 (0,52-1,72)
TT + CT + GG + GA	143 (98,6)	145 (97,3)		Referência
CC + AA	2 (1,4)	4 (2,7)	0,855	0,85 (0,14-5,11)
<i>KDR</i> -604T/C + +1719A/T				
TT + TT	26 (35,6)	38 (45,2)		Referência
TC + CC + AA + AT	47 (64,4)	46 (54,8)	0,360	1,36 (0,70-2,65)
TT + TC + AT + TT	139 (99,3)	143 (96,6)		Referência
CC + AA	1 (0,7)	5 (3,4)	0,168	0,21 (0,02-1,92)
<i>KDR</i> -271G/A + +1192G/A				
AA + GG	35 (53,0)	36 (46,2)		Referência
GG + GA + AG + AA	31 (47,0)	42 (53,8)	0,703	0,88 (0,44-1,73)
AG + AA + GG + GA	149 (99,3)	140 (98,6)		Referência
GG + AA	1 (0,7)	2 (1,4)	0,421	0,37 (0,03-4,20)
AA + TT	39 (41,9)	37 (44,0)		Referência
GG + AG + AA + AT	54 (58,1)	47 (56,0)	0,719	1,12 (0,61-2,05)

Genótipos	Pacientes (N,%)	Controles (n,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
AG + AA + AT + TT	146 (99,3)	136 (99,3)		Referência
GG + AA	1 (0,7)	1 (0,7)	0,791	0,67 (0,04-12,60)
<i>KDR +1192G/A + +1719A/T</i>				
GG + TT	114 (80,3)	110 (78,0)		Referência
AG + AA + AA + AT	28 (19,7)	31 (22,0)	0,75	0,91 (0,50-1,64)
GG + GA + AT + TT	197 (99,5)	186 (100,0)	NA	NA
AA+ AA	1 (0,5)	0 (0,0)		Referência

N: número; %: porcentagem; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança. Os genótipos foram analisados de acordo com o papel funcional dos alelos, e genótipos combiados associados à menor produção de KDR ou menor eficiência de ligação de KDR pela VEGFA foram considerados como referências. NA: não aplicáveis.

Tabela 9. Distribuições dos pacientes com glioma de alto grau e controles por combinações dos genótipos dos polimorfismos nos genes *VEGFA* e *KDR*.

Genótipos	Pacientes (N, %)	Controles (n, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA -2578C/A + KDR -604T/C</i>				
CC + TT	23 (21.7)	21 (18.6)	0.52	1.24 (0.63 – 2.46)
CA+AA + TC+CC	83 (78.3)	92 (81.4)		Referência
CC+CA + TT+TC	133 (96.4)	119 (93.7)	0.47	1.53 (0.47 – 4.99)
AA + CC	5 (3.6)	8 (6.3)		Referência
<i>VEGFA -2578C/A + KDR -271G/A</i>				
CC + AA	28 (25.5)	20 (17.7)	0.25	1.47 (0.75 – 2.90)
CA+AA + GG+GA	82 (74.5)	93 (82.3)		Referência
CC+CA + GA+AA	139 (97.2)	118 (92.2)	0.13	2.52 (0.75 – 8.41)
AA + GG	4 (2.8)	10 (7.8)		Referência

Genótipos	Pacientes (N, %)	Controles (n, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA -2578C/A + KDR +1192G/A</i>				
CC + GG	75 (72.8)	53 (58.9)	0.09	1.69 (0.91 – 3.14)
CA+AA + GA+AA	28 (27.2)	37 (41.1)		Referência
CC+CA + GG+GA	186 (100.0)	161 (98.8)	NA	NA
AA + AA	0 (0.0)	2 (1.2)		Referência
<i>VEGFA -2578C/A + KDR +1719A/T</i>				
CC + TT	68 (63.0)	51 (56.7)	0.41	1.27 (0.71 – 2.28)
CA+AA + AA+AT	40 (37.0)	39 (43.3)		Referência
CC+CA + AT+TT	183 (100.0)	159 (98.1)	NA	NA
AA + AA	0 (0.0)	3 (1.9)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + KDR -604T/C</i>				
TT + TT	4 (2.7)	10 (7.8)	0.12	0.38 (0.11 – 1.29)
CC+CT + TC+CC	144 (97.3)	118 (92.2)		Referência
CT+TT + TT+TC	79 (71.8)	94 (81.7)	0.08	0.56 (0.29 – 1.08)
CC + CC	31 (28.2)	21 (18.3)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + KDR -271G/A</i>				
TT + AA	3 (2.1)	9 (7.0)	0.14	0.36 (0.09 – 1.40)
CC+CT + GG+GA	137 (97.9)	119 (93.0)		Referência
CT+TT + GA+AA	80 (76.2)	94 (79.7)	0.52	0.80 (0.42 – 1.55)
CC + GG	25 (23.8)	24 (20.3)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + KDR +1192G/A</i>				
TT + GG	13 (22.8)	27 (35.1)	0.06	0.40 (0.17 – 0.90)
CC+CT + GA+AA	44 (77.2)	50 (64.9)		Referência
CT+TT + GG+GA	108 (98.2)	125 (96.9)	0.59	1.63 (0.27 – 9.70)
CC + AA	2 (1.8)	4 (3.1)		Referência
<i>VEGFA -2489C/T + KDR +1719A/T</i>				
TT + TT	18 (23.1)	30 (40.0)	0.05	0.36 (0.16 – 0.80)

Genótipos	Pacientes (N, %)	Controles (n, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
CT+TT + AA+AT	60 (76.9)	50 (60.0)		Referência
CT+TT + AT+TT	104 (99.0)	122 (96.8)	0.18	4.49 (0.48 – 41.87)
CC + AA	1 (1.0)	4 (3.2)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + KDR -604T/C</i>				
GG + TT	30 (32.3)	26 (26.0)	0.32	1.37 (0.73 – 2.58)
GA+AA + TC+CC	63 (67.7)	74 (74.0)		Referência
GG+GA + TT+TC	0 (0.0)	0 (0.0)	NA	NA
AA + CC	136 (100.0)	132 (100.0)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + KDR -271G/A</i>				
GG + AA	35 (36.1)	22 (23.4)	0.13	1.65 (0.85 – 3.18)
GA+AA + GG+GA	62 (63.9)	72 (76.6)		Referência
GG+GA + GA+AA	140 (97.9)	128 (97.0)	0.79	1.23 (0.26 – 5.78)
AA + GG	3 (2.1)	4 (3.0)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + KDR +1192G/A</i>				
GG + GG	92 (83.6)	70 (69.3)	0.05	1.97 (0.99 – 3.90)
GA+AA + GA+AA	18 (16.4)	31 (30.7)		Referência
GG+GA + GG+GA	188 (100.0)	178 (98.3)	NA	NA
AA + AA	0 (0.0)	3 (1.7)		Referência
<i>VEGFA -1154G/A + KDR +1719A/T</i>				
GG + TT	83 (74.8)	69 (67.0)	0.25	1.42 (0.77 – 2.62)
GA+AA + AA+AT	28 (25.2)	34 (33.0)		Referência
GG+GA + AT+TT	185 (100.0)	172 (100.0)	NA	NA
AA + AA	0 (0.0)	0 (0.0)		Referência
<i>VEGFA -634G/C + KDR -604T/C</i>				
CC + TT	7 (5.2)	5 (3.7)	0.54	1.46 (0.42 – 5.00)
GC+CC + TC+CC	128 (94.8)	129 (96.3)		Referência
CC+GC + TT+TC	97 (84.3)	88 (76.5)	0.14	1.66 (0.83 – 3.29)

Genótipos	Pacientes (N, %)	Controles (n, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
GG + CC	18 (15.7)	27 (23.5)		Referência
<i>VEGFA -634G/C + KDR -271G/A</i>				
CC + AA	6 (4.7)	5 (3.7)	0.73	1.25 (0.35 – 4.46)
GG+GC + GG+GA	121 (95.3)	131 (96.3)		Referência
GC+CC + GA+AA	101 (87.1)	82 (77.4)	0.13	1.74 (0.84 – 3.60)
GG + GG	15 (12.9)	24 (22.6)		Referência
<i>VEGFA -634G/C + KDR +1192G/A</i>				
CC + GG	30 (40.5)	20 (26.0)	0.14	1.69 (0.82 – 3.46)
GG+ GC + GA+AA	44 (59.5)	57 (74.0)		Referência
GC+CC + GG+GA	138 (99.3)	113 (96.6)	0.19	4.45 (0.46 – 42.80)
GG + AA	1 (0.7)	4 (3.4)		Referência
<i>VEGFA -634G/C + KDR +1719A/T</i>				
CC + TT	25 (30.1)	17 (22.7)	0.38	1.38 (0.66 – 2.88)
GG+GC + AA+AT	58 (69.9)	58 (77.3)		Referência
GC+CC + AT+TT	136 (98.6)	110 (96.5)	0.40	2.09 (0.37 – 11.86)
GG + AA	2 (1.4)	4 (3.5)		Referência
<i>VEGFA -460C/T + KDR -604T/C</i>				
TT + TT	19 (17.0)	20 (17.2)	0.97	0.99 (0.49 – 2.00)
CC+CT + TC+CC	93 (83.0)	96 (82.8)		Referência
CT+TT + TT+TC	124 (94.7)	116 (90.6)	0.21	1.87 (0.69 – 5.08)
CC + CC	7 (5.3)	12 (9.4)		Referência
<i>VEGFA -460C/T + KDR -271G/A</i>				
TT + AA	21 (19.1)	17 (15.2)	0.63	1.19 (0.57 – 2.49)
CC+CT + GG+GA	89 (80.9)	95 (84.8)		Referência
CT+TT + GA+AA	132 (94.3)	112 (91.1)	0.49	1.40 (0.53 – 3.68)
CC + GG	8 (5.7)	11 (8.9)		Referência

Genótipos	Pacientes (N, %)	Controles (n, %)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA</i> -460C/T + <i>KDR</i> +1192G/A				
TT + GG	64 (67.4)	50 (56.2)	0.18	1.50 (0.81 – 2.77)
CC+CT + GA+AA	31 (32.6)	39 (43.8)		Referência
CT+TT + GG+GA	175 (100.0)	154 (98.7)	NA	NA
CC + AA	0 (0.0)	2 (1.3)		Referência
<i>VEGFA</i> -460C/T + <i>KDR</i> +1719A/T				
TT + TT	57 (57.0)	48 (53.9)	0.72	1.11 (0.62 – 1.99)
CC+CT + AA+AT	43 (43.0)	41 (46.1)		Referência
CT+TT + AT+TT	173 (99.4)	152 (98.1)	0.37	2.84 (0.28 – 28.14)
CC + AA	1 (0.6)	3 (1.9)		Referência

N: número; %: porcentagem; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança. Os genótipos foram analisados de acordo com o papel funcional dos alelos, e genótipos combinados associados à menor produção de VEGFA ou KDR ou menor eficiência de ligação de KDR pelo VEGFA foram considerados como referências. Nos casos de *VEGFA* -634G/C e -460C/T, os genótipos GG e CC foram tomados como referências nas análises, respectivamente, uma vez que os genótipos GC + CC e CT + TT foram associados ao aumento do risco de glioma de alto grau no presente estudo. NA: não aplicável.

Observamos frequências maiores dos genótipos combinados *VEGFA* -2578 CC e *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -2578 CC ou CA e *VEGFA* -634 GC ou CC, *VEGFA* -2578 CC ou CA e *VEGFA* -460 CT ou TT, *VEGFA* -1154 GG ou AG e *VEGFA* -634 GC ou CC, e *VEGFA* 634 GC ou CC e *VEGFA* -460 CT ou TT em pacientes com GAG quando comparado com os controles. Os indivíduos que apresentaram essas combinações de genótipos estiveram sob riscos 1,61, 2,66, 2,52, 2,53, e 2,02 vezes maiores de GAG do que os controles.

Não houve diferenças de frequências das combinações de genótipos dos SNPs do *KDR* isolado e *VEGFA* e *KDR* associados em pacientes e controles; indivíduos com as distintas combinações de genótipos estiveram sob riscos similares de desenvolver GAG.

4. Polimorfismos nos genes *VEGFA* e *KDR* e aspectos clínicopatológicos de GAG

As frequências dos genótipos dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* isolados em pacientes com GAG estratificados por idade, sexo e grau histológico estão representados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Frequências dos genótipos dos polimorfismos dos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.

Genótipo	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N,%)		(N, %)	(N, %)	
VEGFA -2578C/A									
CC	49 (48,5)	48 (46,2)		66 (48,9)	31 (44,3)		17 (47,2)	80 (47,6)	
CA ou AA	52 (51,5)	56 (53,8)	0,735	69 (51,1)	39 (55,7)	0,531	19 (52,8)	88 (52,4)	0,965
CC ou CA	95 (94,1)	94 (90,4)		124 (91,9)	65 (92,9)		35 (97,2)	153 (91,1)	
AA	6 (5,9)	10 (9,6)	0,437	11 (8,1)	5 (7,1)	1.000	1 (2,8)	15 (8,9)	0,315
VEGFA -2489C/T									
CC	48 (47,5)	48 (46,2)		65 (48,1)	31 (44,3)		17 (47,2)	79 (47,0)	
CT ou TT	53 (52,5)	56 (53,8)	0,844	70 (51,9)	39 (55,7)	0,599	19 (52,8)	89 (53,0)	0,983
CC ou CT	95 (94,1)	93 (89,4)		123 (91,1)	65 (92,9)		35 (97,2)	152 (90,5)	
TT	6 (5,9)	11 (10,6)	0,312	12 (8,9)	5 (7,1)	0,793	1 (2,8)	16 (9,5)	0,317
VEGFA -1154G /A									
GG	58 (57,4)	66 (63,5)		83 (61,5)	41 (58,6)		20 (55,6)	104 (61,9)	

Genótipo	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54 (N, %)	> 54 (N, %)		Masculino (N, %)	Feminino (N, %)		GIII (N, %)	GIV (N, %)	
GA ou AA	43 (42,6)	38 (36,5)	0,377	52 (38,5)	29 (41,4)	0,686	16 (44,4)	64 (38,1)	0,479
GG ou AG	94 (93,1)	97 (93,3)		128 (94,8)	63 (90,0)		33 (91,7)	157 (93,5)	
AA	7 (6,9)	7 (6,7)	1.000	7 (5,2)	7 (10,0)	0,244	3 (8,3)	11 (6,5)	0,717
VEGFA -634G/C									
GG	29 (28,7)	36 (34,6)		39 (28,9)	26 (37,1)		9 (25,0)	55 (32,7)	
GC ou CC	72 (71,3)	68 (65,4)	0,364	96 (71,1)	44 (62,9)	0,228	27 (75,0)	113 (67,3)	0,432
GG ou GC	83 (82,2)	86 (82,7)		111 (82,2)	58 (82,9)		30 (83,3)	138 (82,1)	
CC	18 (17,8)	18 (17,3)	0,923	24 (17,8)	12 (17,1)	0,910	6 (16,7)	30 (17,9)	1.000
VEGFA -460C/T									
CC	11 (10,9)	16 (15,4)	0,342	18 (13,3)	9 (12,9)	1.000	1 (2,8)	25 (14,9)	0,054
CT ou TT	90 (89,1)	88 (84,6)		117 (86,7)	61 (87,1)		35 (97,2)	143 (85,1)	
CC ou CT	60 (59,4)	62 (59,6)	0,976	81 (60,0)	41 (58,6)	0,843	22 (61,1)	99 (58,9)	0,809
TT	41 (40,6)	42 (40,4)		54 (40,0)	29 (41,4)		14 (38,9)	69 (41,1)	

Genótipo	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N,%)		(N, %)	(N, %)	
<i>KDR -604T/C</i>									
TT	27 (26,7)	21 (20,2)	0,323	30 (22,2)	18 (25,7)	0,576	12 (33,3)	35 (20,8)	0,106
TC ou CC	74 (73,3)	83 (79,8)		105 (77,8)	52 (74,3)		24 (66,7)	133 (79,2)	
TT ou TC	72 (71,3)	72 (69,2)	0,747	99 (73,3)	45 (64,3)	0,179	27 (75,0)	116 (69,0)	0,551
CC	29 (28,7)	32 (30,8)		36 (26,7)	25 (35,7)		9 (25,0)	52 (31,0)	
<i>KDR -271G/A</i>									
GG	28 (27,7)	26 (25,0)	0,658	34 (25,2)	20 (28,6)	0,602	13 (36,1)	40 (23,8)	0,127
GA ou AA	73 (72,3)	78 (75,0)		101 (74,8)	50 (71,4)		23 (63,9)	128 (76,2)	
GG ou AG	78 (77,2)	73 (70,2)	0,253	101 (74,8)	50 (71,4)	0,602	29 (80,6)	121 (72,0)	0,405
AA	23 (22,8)	31 (29,8)		34 (25,2)	20 (28,6)		7 (19,4)	47 (28,0)	
<i>KDR + 1192G/A</i>									
GG	75 (74,3)	80 (76,9)		106 (78,5)	49 (70,0)		28 (77,8)	126 (75,0)	
GA ou AA	26 (25,7)	24 (23,1)	0,657	29 (21,5)	21 (30,0)	0,178	8 (22,2)	42 (25,0)	0,833
GG ou AG	100 (99,0)	102 (98,1)		133 (98,5)	69 (98,6)		35 (97,2)	166 (98,8)	

Genótipo	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54 (N, %)	> 54 (N, %)		Masculino (N, %)	Feminino (N, %)		GIII (N, %)	GIV (N, %)	
AA	1 (1,0)	2 (1,9)	1.000	2 (1,5)	1 (1,4)	1.000	1 (2,8)	2 (1,2)	0,443
KDR + 1719A/T									
AA	3 (3,0)	3 (2,9)	1.000	5 (3,7)	1 (1,4)	0,666	2 (5,6)	4 (2,4)	0,286
AT ou TT	98 (97,0)	101 (97,1)		130 (96,3)	69 (98,6)		34 (94,4)	164 (97,6)	
AA ou AT	32 (31,7)	37 (35,6)	0,555	40 (29,6)	29 (41,4)	0,090	13 (36,1)	55 (32,7)	0,697
TT	69 (68,3)	67 (64,4)		95 (70,4)	41 (58,6)		23 (63,9)	113 (67,3)	

N: número; %: porcentagem.*: Grau histológico classificados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde 2007, onde grau III incluiu astrocitoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico, e grau IV incluiu glioblastoma multiforme; o grau histológico não foi identificado em um paciente.

Encontramos frequências semelhantes dos genótipos dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* isolados em pacientes com GAG estratificados por idade, gênero e grau histológico.

5. Combinações de polimorfismos nos genes *VEGFA* e *KDR* e aspectos clinicopatológicos do GAG

As frequências dos genótipos combinados dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com GAG estratificados por idade, sexo e grau histológico estão representados na Tabela 11 e Tabela 12, respectivamente. As frequências dos genótipos combinados dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com GAG estratificados por idade, sexo e grau histológico estão representados na Tabela 13.

Tabela 11. Frequências das combinações dos genótipos combinados dos polimorfismos nos gene *VEGFA* em pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N,%)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
<i>VEGFA</i>2578C / A + -2489C / T									
CC + TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
CA ++ CC AA + CT	46 (100)	45 (100)	1,00	57 (100)	34 (100)	1,00	18 (100)	72 (100)	1,00
CC + CA + CT + TT	46 (100)	45 (100)		59 (100)	34 (100)		18 (100)	74 (100)	
CC + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
<i>VEGFA</i>-2578C / A + -1154G / A									
CC + GG	45 (53,6)	45 (56,2)		64 (56,1)	26 (52,0)		16 (51,6)	74 (56,1)	
CA + AA + GA + AA	39 (46,4)	35 (43,8)	0,75	50 (43,9)	24 (48,0)	0,73	15 (48,4)	58 (43,9)	0,69
CC + CA + GG + GA	92 (95,8)	91 (95,8)		123 (95,3)	60 (96,8)		33 (97,1)	149 (95,5)	
AA + AA	4 (4,2)	4 (4,2)	1,00	6 (4,7)	2 (3,2)	1,00	1 (2,9)	7 (4,5)	1,00

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N,%)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
VEGFA-2578C / A + -634G / C									
CC + CC	18 (25,7)	18 (24,3)		24 (25,8)	12 (23,5)		6 (24,0)	30 (25,4)	
CA + AA + GG + GC	52 (74,3)	56 (75,7)	0,85	69 (74,2)	39 (76,5)	0,84	19 (76,0)	88 (74,6)	1,00
CC + CA + GC + CC	72 (92,3)	68 (87,2)		96 (89,7)	44 (89,8)		27 (96,4)	113 (88,3)	
AA + GG	6 (7,7)	10 (12,8)	0,42	11 (10,3)	5 (10,2)	1,00	1 (3,6)	15 (11,7)	0,30
VEGFA-2578C / A + -460C / T									
CC + TT	41 (44,1)	42 (42,9)		54 (43,9)	29 (42,6)		14 (42,4)	69 (43,9)	
CA + + CC AA + CT	52 (55,9)	56 (57,1)	0,88	69 (56,1)	39 (57,4)	0,88	19 (57,6)	88 (56,1)	1,00
CC + CA + CT + TT	90 (93,8)	88 (89,8)		117 (91,4)	61 (92,4)		35 (97,2)	143 (90,5)	
CC + AA	6 (6,3)	10 (10,2)	0,43	11 (8,6)	5 (7,6)	1,00	1 (2,8)	15 (9,5)	0,31
VEGFA-2489C / T + -1154G / A									
TT + GG	1 (2,6)	1 (3,4)		2 (4,5)	0 (0)		0 (0)	2 (3,8)	
CC + CT + AG + AA	38 (97,4)	28 (96,6)	1,00	42 (95,5)	24 (100)	0,53	15 (100)	50 (96,2)	1,00
CT + TT + GG + GA	48 (96,0)	52 (94,5)		64 (98,5)	36 (90,0)		17 (94,4)	82 (95,3)	

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N,%)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
CC + AA	2 (4,0)	3 (5,5)	1,00	1 (1,5)	4 (10,0)	0,06	1 (5,6)	4 (4,7)	1,00
VEGFA-2489C / T + -634G / C									
TT + CC	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
CC + CT + + GG GC	77 (100)	75 (100)	1,00	99 (100)	53 (100)	1,00	29 (100)	122 (100)	1,00
TT + CT + GC + CC	28 (87,5)	23 (88,5)		35 (89,7)	16 (84,2)		11 (91,7)	40 (87,0)	
CC + GG	4 (12,5)	3 (11,5)	1,00	4 (10,3)	3 (15,8)	0,67	1 (8,3)	6 (13,0)	1,00
VEGFA-2489C / T + -460C / T									
TT + TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
CT + CC + CT CC +	54 (100)	51 (100)	1,00	69 (100)	36 (100)	1,00	21 (100)	83 (100)	1,00
CT + TT + CT + CT	42 (100)	40 (100)		52 (100)	30 (100)		18 (100)	64 (100)	
CC + CC	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA-1154G / A + -634G / C									
GG + CC	16 (28,1)	15 (30,0)		23 (31,1)	8 (24,2)		6 (27,3)	25 (29,8)	
AG + AA + + GG GC	41 (71,9)	35 (70,0)	0,83	51 (68,9)	25 (75,8)	0,64	16 (72,7)	59 (70,2)	1,00

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N,%)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
GG + GA + GC + CC	69 (94,5)	65 (94,2)		95 (94,1)	39 (95,1)		25 (96,2)	109 (94,0)	
AA + GG	4 (5,5)	4 (5,8)	1,00	6 (5,9)	2 (4,9)	1,00	1 (3,8)	7 (6,0)	1,00
VEGFA-1154G / A + -460C / T									
GG + TT	38 (48,7)	39 (52,7)		53 (51,0)	24 (50,0)		13 (46,4)	64 (52,0)	
AG + AA + CC + CT	40 (51,3)	35 (47,3)	0,63	51 (49,0)	24 (50,0)	1,00	15 (53,6)	59 (48,0)	0,67
GG + GA + CT + TT	87 (95,6)	85 (95,5)		116 (95,1)	56 (96,6)		33 (97,1)	139 (95,2)	
CC + AA	4 (4,4)	4 (4,5)	1,00	6 (4,9)	2 (3,4)	1,00	1 (2,9)	7 (4,8)	1,00
VEGFA634G / C + -460C / T									
CC + TT	18 (23,1)	18 (22,5)	1,00	24 (22,9)	12 (22,6)	1,00	6 (21,4)	30 (23,3)	1,00
GG + GC + CC + CT	60 (76,9)	62 (77,5)		81 (77,1)	41 (77,4)		22 (78,6)	99 (76,7)	
GC + CC + CT + TT	72 (86,7)	66 (82,5)	0,51	94 (85,5)	44 (83,0)	0,81	27 (96,4)	111 (82,8)	0,08
GG + CC	11 (13,3)	14 (17,5)		16 (14,5)	9 (17,0)		1 (3,6)	23 (17,2)	

N: número; %: porcentagem.*: Grau histológico classificados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde 2007, onde grau III incluiu astrocitoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico, e grau IV incluiu glioblastoma multiforme; o grau histológico não foi identificado em um paciente.

Tabela 12. Frequências das combinações dos genótipos dos polimorfismos no gene *KDR* em pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
<i>KDR -604T / C + -271G / A</i>									
TT + AA	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
TC + CC + GG + GA	51 (100)	52 (100)	1,00	71 (100)	32 (100)	1,00	17 (100)	86 (100)	1,00
TT + CT + AG + AA	44 (100)	47 (97,9)		66 (98,5)	25 (100)		14 (100)	77 (98,7)	
CC + GG	0	1 (2,1)	1,00	1 (1,5)	0	1,00	0	1 (1,3)	1,00
<i>KDR -604T / C + + 192G / A</i>									
TT + GG	25 (51,0)	18 (46,2)		28 (50,9)	15 (45,5)		11 (61,1)	31 (44,9)	
TC + CC + AG + AA	24 (49,0)	21 (53,8)	0,67	27 (49,1)	18 (54,5)	0,66	7 (38,9)	38 (55,1)	0,29
TT + CT + GG + GA	72 (98,6)	71 (98,6)		98 (99,0)	45 (97,8)		27 (96,4)	115 (99,1)	
CC + AA	1 (1,4)	1 (1,4)	1,00	1 (1,0)	1 (2,2)	0,53	1 (3,6)	1 (0,9)	0,35

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
<i>KDR -604T / C + +1719A / T</i>									
TT + TT	14 (42,4)	12 (30,0)		18 (39,1)	8 (29,6)		7 (46,7)	19 (32,8)	
TC + CC + AA + AT	19 (57,6)	28 (70,0)	0,33	28 (60,9)	19 (70,4)	0,45	8 (53,3)	39 (67,2)	0,37
TT + TC + AT + TT	70 (98,6)	69 (100)		95 (99,0)	44 (100)		1 (3,7)	0 (0)	
CC + AA	1 (1,4)	0 (0)	1,00	1 (1,0)	0 (0)	1,00	26 (96,3)	112 (100)	0,19
<i>KDR -271G / A + +1192G / A</i>									
AA + GG	13 (44,8)	22 (59,5)		25 (55,6)	10 (47,6)		4 (44,4)	31 (54,4)	
GG + GA + AG + AA	16 (55,2)	15 (40,5)	0,32	20 (44,4)	11 (52,4)	0,60	5 (55,6)	26 (45,6)	0,72
AG + AA + GG + GA	72 (100)	77 (98,7)		100 (99,0)	49 (100)		22 (100)	127 (99,2)	
GG + AA	0 (0)	1 (1,3)	1,00	1 (1,0)	0 (0)	1,00	0 (0)	1 (0,8)	1,00
<i>KDR -271G / A + +1719A/T</i>									
AA + TT	18 (40,0)	21 (43,8)		26 (44,8)	13 (37,1)		5 (31,3)	34 (44,7)	
GG + AG + AA + AT	27 (60,0)	27 (56,2)	0,83	32 (55,2)	22 (62,9)	0,52	11 (68,8)	42 (55,3)	0,40

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
AG + AA + AT + TT	70 (100)	76 (98,7)		97 (99,0)	49 (100)		21 (100)	125 (99,2)	
GG + AA	0 (0)	1 (1,3)	1,00	1 (1,0)	0 (0)	1,00	0 (0)	1 (0,8)	1,00
<i>KDR + 1192G/A + +1719A/T</i>									
GG + TT	56 (81,2)	58 (79,5)		81 (84,4)	33 (71,7)		22 (75,9)	92 (81,4)	
AG + AA + AA + AT	13 (18,8)	15 (20,5)	0,83	15 (15,6)	13 (28,3)	0,11	7 (24,1)	21 (18,6)	0,60
GG + GA + AT + TT	97 (100)	100 (99,0)		129 (99,2)	68 (100)		33 (100)	163 (99,4)	
AA + AA	0 (0)	1 (1,0)		1 (0,8)	0 (0)		0 (0)	1 (0,6)	1,00

N: número; %: porcentagem.*: Grau histológico classificados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde 2007, onde grau III incluiu astrocitoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico, e grau IV incluiu glioblastoma multiforme; o grau histológico não foi identificado em um paciente.

Tabela 13. Frequências das combinações dos genótipos dos polimorfismos dos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N,%)		(N,%)	(N,%)	
<i>VEGFA -2578C/A + KDR -604T/C</i>									
CC + TT	14 (26,4)	9 (17,0)		17 (23,3)	6 (18,2)		7 (33,3)	16 (18,8)	
CA + AA + TC + CC	39 (73,6)	44 (83,0)	0,34	56 (76,7)	27 (81,8)	0,62	14 (66,7)	69 (81,2)	0,23
CC + CA + TT + TC	68 (97,1)	65 (95,6)		90 (97,8)	43 (93,5)		26 (100)	106 (95,5)	
CC + AA	2 (2,9)	3 (4,4)	0,67	2 (2,2)	3 (6,5)	0,33	0 (0)	5 (4,5)	0.58
<i>VEGFA -2578C/A + KDR -271G/A</i>									
CC + AA	12 (22,6)	16 (28,1)		20 (26,7)	8 (22,9)		3 (16,7)	25 (27,5)	
CA + AA + GG + GA	41 (77,4)	41 (71,9)	0,66	55 (73,3)	27 (77,1)	0,81	15 (83,3)	66 (72,5)	0,55
CC + CA + GA + AA	68 (98,6)	71 (95,9)		93 (96,9)	46 (97,9)		23 (95,8)	116 (97,5)	
AA + GG	1 (1,4)	3 (4,1)	0,62	3 (3,1)	1 (2,1)	1,00	1 (4,2)	3 (2,5)	0,52
<i>VEGFA -2578C/A + KDR +1192G/A</i>									
CC + GG	37 (72,5)	38 (73,1)		53 (76,8)	22 (64,7)		14 (73,7)	61 (72,6)	

Genótipos	Idade		Valor	Gênero		Valor	Grau Histológico *		Valor
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>
CA + AA + GA + AA	14 (27,5)	14 (26,9)	1,00	16 (23,2)	12 (35,3)	0,24	5 (26,3)	23 (27,4)	1,00
CC + CA + GG + GA	94 (100)	92 (100)		122 (100)	64 (100)		34 (100)	151 (100)	
AA + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA -2578C/A + KDR +1719A/T									
CC + TT	36 (65,5)	32 (60,4)		49 (68,1)	19 (52,8)		13 (59,1)	55 (64,7)	
CA + AA + AA + AT	19 (34,5)	21 (39,6)	0,69	23 (31,9)	17 (47,2)	0,14	9 (40,9)	30 (35,3)	0,62
CC + CA + AT + TT	92 (100)	91 (100)		119 (100)	64 (100)		33 (100)	149 (100)	
AA + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA -2489C/T + KDR -604T/C									
TT + TT	1 (1,4)	3 (3,8)		3 (3,0)	1 (2,0)		1 (4,0)	3 (2,4)	
CC + CT + TC + CC	69 (98,6)	75 (96,2)	0,62	96 (97,0)	48 (98)	1,00	24 (96,0)	120 (97,6)	0,52
CT + TT + TT + TC	39 (72,2)	40 (71,4)		54 (73,0)	25 (69,4)		13 (81,3)	65 (69,9)	
CC + CC	15 (27,8)	16 (28,6)	1,00	20 (27,0)	11 (30,6)	0,82	3 (18,8)	28 (30,1)	0,54

Genótipos	Idade		Valor	Gênero		Valor	Grau Histológico *		Valor
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)	P	(N, %)	(N, %)	P	(N, %)	(N, %)	P
<i>VEGFA -2489C/ T + KDR -271G/A</i>									
TT + AA	1 (1,4)	2 (3,0)		1 (1,1)	2 (4,1)		0 (0)	3 (2,7)	
CC + CT + GG + GA	73 (98,6)	64 (97,0)	0,60	90 (98,9)	47 (95,9)	0,28	28 (100)	108 (97,3)	1,00
CT TT + + AG + AA	38 (74,5)	42 (77,8)		54 (75,0)	26 (78,8)		13 (65,0)	67 (78,8)	
CC + GG	13 (25,5)	12 (22,2)	0,81	18 (25,0)	7 (21,2)	0,80	7 (35,0)	18 (21,2)	0,24
<i>VEGFA -2489C/T + KDR +1192G/A</i>									
TT + GG	3 (11,5)	8 (27,6)		9 (25,7)	2 (10,0)		1 (11,1)	10 (21,7)	
CC + CT + AG + AA	23 (88,5)	21 (72,4)	0,18	26 (74,3)	18 (90,0)	0,29	8 (88,9)	36 (78,3)	0,66
CT + TT + GG + GA	53 (98,1)	55 (98,2)		69 (98,6)	39 (97,5)		19 (95,0)	88 (98,9)	
CC + AA	1 (1,9)	1 (1,8)		1 (1,4)	1 (2,5)		1 (5,0)	1 (1,1)	0,33
<i>VEGFA -2489C/T + KDR +1719A/T</i>									
TT + TT	4 (11,8)	9 (20,5)		10 (20,8)	3 (10,0)		0 (0)	13 (20,0)	
CT + TT + AA + AT	30 (88,2)	35 (79,5)	0,37	38 (79,2)	27 (90,0)	0,34	12 (100)	52 (80,0)	0,20
CT + TT + AT + TT	50 (100)	54 (98,2)		66 (98,5)	38 (100)		17 (100)	86 (98,9)	

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
CC + AA	0 (0)	1 (1,8)		1 (1,5)	0 (0)	1,00	0 (0)	1 (1,1)	1,00
<i>VEGFA -1154G/A + KDR -604T/C</i>									
GG + TT	17 (34,0)	13 (30,2)		20 (32,3)	10 (32,3)		8 (40,0)	22 (30,1)	
AG + AA + CT + CC	33 (66,0)	30 (69,8)	0,82	42 (67,7)	21 (67,7)	1,00	12 (60,0)	51 (69,9)	0,42
GG + GA + TT + CT	69 (100)	67 (100)		94 (100)	42 (100)		26 (100)	109 (100)	
CC + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
<i>VEGFA -1154G/A + KDR -271G/A</i>									
GG + AA	13 (28,3)	22 (43,1)		24 (36,4)	11 (35,5)		3 (20,0)	32 (39,5)	
AG + AA + GG + GA	33 (71,7)	29 (56,9)	0,14	42 (63,6)	20 (64,5)	1,00	12 (80,0)	49 (60,5)	0,24
GG + GA + AG + AA	67 (98,5)	73 (97,3)		96 (98,0)	44 (97,8)		21 (95,5)	119 (98,3)	
AA + GG	1 (1,5)	2 (2,7)	1,00	2 (2,0)	1 (2,2)	1,00	1 (4,5)	2 (1,7)	0,39
<i>VEGFA -1154G / A + KDR + 1192G/A</i>									
GG + GG	42 (80,8)	50 (86,2)		65 (85,5)	27 (79,4)		15 (83,3)	77 (83,7)	
AG + AA + AG + AA	10 (19,2)	8 (13,8)	0,45	11 (14,5)	7 (20,6)	0,41	3 (16,7)	15 (16,3)	1,00

Genótipos	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau Histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
GG + AG + GG + GA	93 (100)	95 (100)		126 (100)	62 (100)		32 (100)	155 (100)	
AA + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA -1154G / A + KDR + 1719A/T									
GG + TT	41 (73,2)	42 (76,4)		60 (77,9)	23 (67,6)		14 (66,7)	69 (77,5)	
AG + AA + AA + AT	15 (26,8)	13 (23,6)	0,82	17 (22,1)	11 (32,4)	0,34	7 (33,3)	20 (22,5)	0,39
GG + GA + AT + TT	91 (100)	94 (100)		123 (100)	62 (100)		31 (100)	153 (100)	
+ AA AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA -634G / C + KDR -604T / C									
CC + TT	4 (6,2)	3 (4,2)		6 (6,5)	1 (2,4)		1 (5,0)	6 (5,2)	
GC + GG + CT + CC	60 (93,8)	68 (95,8)	0,70	87 (93,5)	41 (97,6)	0,43	19 (95,0)	109 (94,8)	1,00
CC + GC + TT + CT	49 (89,1)	48 (80,0)		69 (88,5)	28 (75,7)		19 (95,0)	78 (82,1)	
GG + CC	6 (10,9)	12 (20,0)	0,20	9 (11,5)	9 (24,3)	0,10	1 (5,0)	17 (17,9)	0,19
VEGFA -634G / C + KDR -271G / A									
CC + AA	2 (3,1)	4 (6,3)		4 (4,7)	2 (4,8)		1 (4,0)	5 (5,0)	

Genótipos	Idade		Valor	Gênero		Valor	Grau Histológico *		Valor
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>
GG + GC + GG + GA	62 (96,9)	59 (93,7)	0,44	81 (95,3)	40 (95,2)	1,00	24 (96,0)	96 (95,0)	1,00
GC + CC + AG + AA	52 (86,7)	49 (87,5)		70 (89,7)	31 (81,6)		16 (88,9)	85 (87,6)	
GG + GG	8 (13,3)	7 (12,5)	1,00	8 (10,3)	7 (18,4)	0,24	2 (11,1)	12 (12,4)	1,00
VEGFA -634G/C + KDR +1192G/A									
CC + GG	14 (38,9)	16 (42,1)		22 (44,9)	8 (32,0)		6 (42,9)	24 (40,0)	
GG GC ++ AG + AA	22 (61,1)	22 (57,9)	0,81	27 (55,1)	17 (68,0)	0,32	8 (57,1)	36 (60,0)	1,00
GC + GG CC ++ GA	71 (100)	67 (98,5)		95 (99,0)	43 (100)		26 (100)	112 (99,1)	
GG + AA	0 (0)	1 (1,5)	0,48	1 (1,0)	0 (0)	1,00	0 (0)	1 (0,9)	1,00
VEGFA -634G/C + KDR + 1719A/T									
CC + TT	13 (32,5)	12 (27,9)		18 (34,6)	7 (22,6)		6 (31,6)	19 (30,2)	
GG + GC + AA + AT	27 (67,5)	31 (72,1)	0,81	34 (65,4)	24 (77,4)	0,32	13 (68,4)	44 (69,8)	1,00
GC + CC + AT + TT	70 (98,6)	66 (98,5)		92 (98,9)	44 (97,8)		26 (96,3)	110 (99,1)	
GG + AA	1 (1,4)	1 (1,5)	1,00	1 (1,1)	1 (2,2)	0,54	1 (3,7)	1 (0,9)	0,35

Genótipos	Idade		Valor	Gênero		Valor	Grau Histológico *		Valor
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>
<i>VEGFA -460C/T + KDR -604T/C</i>									
TT + TT	12 (21,1)	7 (12,7)		13 (16,9)	6 (17,1)		5 (25,0)	14 (15,2)	
CC + CT + TC + CC	45 (78,9)	48 (87,3)	0,31	64 (83,1)	29 (82,9)	1,00	15 (75,0)	78 (84,8)	0,32
CT + TT + TT + TC	63 (96,9)	61 (92,4)		85 (95,5)	39 (92,9)		26 (100)	98 (93,3)	
CC + CC	2 (3,1)	5 (7,6)	0,44	4 (4,5)	3 (7,1)	0,68	0 (0)	7 (6,7)	0,34
<i>VEGFA -460C/T + KDR -271G/A</i>									
TT + AA	8 (15,1)	13 (22,8)		14 (18,7)	7 (20,0)		3 (14,3)	18 (20,5)	
CC + CT + GG + GA	45 (84,9)	44 (77,2)	0,34	61 (81,3)	28 (80,0)	1,00	18 (85,7)	70 (79,5)	0,75
CT TT + + AG + AA	66 (94,3)	66 (94,3)		87 (95,6)	45 (91,8)		23 (95,8)	109 (94,8)	
CC + GG	4 (5,7)	4 (5,7)	1,00	4 (4,4)	4 (8,2)	0,45	1 (4,2)	6 (5,2)	1,00
<i>VEGFA -460C/T + KDR +1192G/A</i>									
TT + GG	32 (65,3)	32 (69,6)		43 (70,5)	21 (61,8)		12 (66,7)	52 (67,5)	
CC + CT + AG + AA	17 (34,7)	14 (30,4)	0,66	18 (29,5)	13 (38,2)	0,49	6 (33,3)	25 (32,5)	1,00
CT + TT + GG + GA	89 (100)	86 (100)		115 (100)	60 (100)		34 (100)	141 (100)	

Genótipos	Idade		Valor	Gênero		Valor	Grau Histológico *		Valor
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>	(N, %)	(N, %)	<i>P</i>
CC + AA	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	0 (0)	1,00
VEGFA -460C/T + KDR +1719A/T									
TT + TT	29 (59,2)	28 (54,9)		39 (60,9)	18 (50,0)		11 (52,4)	46 (59,0)	
CC + CT + AA + AT	20 (40,8)	23 (45,1)	0,69	25 (39,1)	18 (50,0)	0,30	10 (47,6)	32 (41,0)	0,62
CT + TT + AT + TT	87 (100)	86 (98,9)		112 (100)	61 (98,4)		33 (100)	140 (99,3)	
CC + AA	0 (0)	1 (1,1)	1,00	0 (0)	1 (1,6)	0,35	0 (0)	1 (0,7)	1,00

N: número; %: porcentagem.*: Grau histológico classificados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde 2007, onde grau III incluiu astrocitoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico, e grau IV incluiu glioblastoma multiforme; o grau histológico não foi identificado em um paciente.

Encontramos frequências semelhantes dos genótipos combinados dos SNPs nos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com GAG estratificados por idade, gênero e grau histológico.

6. Haplótipos dos genes *VEGFA* e *KDR* e risco de GAG

Foram consideradas para o estudo apenas as quatro haplótipos do gene *VEGFA* identificados com frequências maiores que 10%: CCGCT (64,4%), ATACG (36,1%), CCGGT (68,3%) e ATAGGC (48,3%), dos SNPs do *VEGFA* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C e -460C/T.

O haplótipo ATACG do *VEGFA* foi menos comum em pacientes com GAG do que em controles; pacientes com o haplótipo ATACG do *VEGFA* estiveram sob risco 0,61 (IC 95%: 0,41-0,93, $P=0,021$) vezes menor de apresentar o tumor do que os pacientes sem o referido haplótipo.

Foram incluídos para análise os dois haplótipos do gene *KDR* que apresentaram frequência maior que 10%: TGGT (65,9%) e CAGT (69,8) dos SNPs do *KDR* -604T/C, -271G/A, +1192G/A e +1719A/T.

Os desequilíbrios de ligação dos pacientes com GAG para os SNPs do *VEGFA* e *KDR* estão apresentados na **Figura 3**.

As frequências dos haplótipos do gene *VEGFA* e *KDR* em pacientes e controles estão representados na **Tabela 14**.

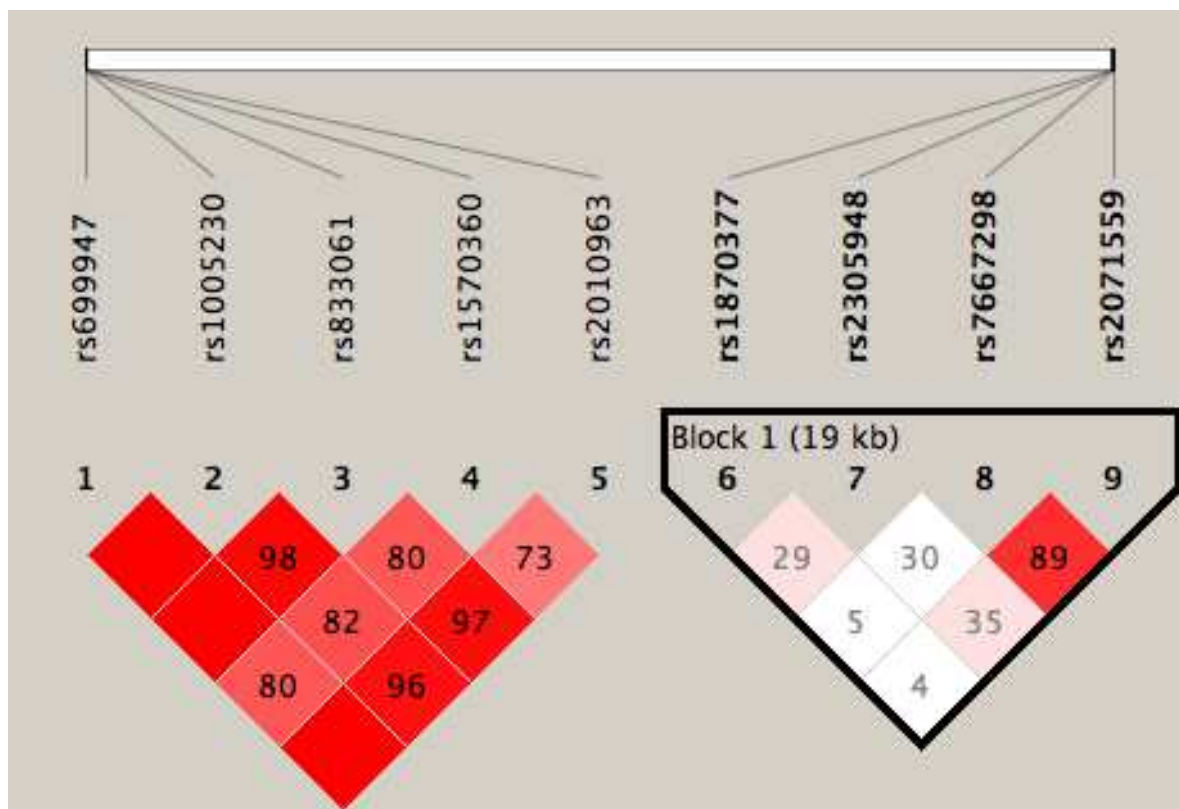


Figura 3. Representação do desequilíbrio de ligação dos genes *VEGFA* e *KDR*.

Representação do desequilíbrio de ligação nos pacientes com glioma de alto grau para os polimorfismos do gene *vascular endothelial growth factor gene* (*VEGFA*) 2578C/A (1, rs699947), 2489C/T (2, rs1005230), 460C/T (3, rs833061), 1154G/A (4, rs1570360), 634G/C (5, rs2010963), e para os polimorfismos do gene *vascular endothelial growth factor gene receptor 2* (*KDR*) 1192 G/A (6, rs1870377), 1719A/T (7, rs2305948), 271G/A (8, rs7667298) e 604T/C (9, rs2071559). Os valores dentro dos quadrados representam os valores de D' ; os quadrados vermelhos correspondem a $D' \geq 95,0$.

Tabela 14. Haplótipos dos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com glioma de alto grau e controles.

Haplótipos *	Pacientes (N,%)	Controles (N,%)	Valor <i>P</i>	OR (95% IC)
<i>VEGFA</i> *				
CCGCT	132 (64,4)	114 (55,6)	0,141	1,36 (0,90-2,05)
Outros haplótipos	73 (35,6)	91 (44,4)		Referência
ATAGC	74 (36,1)	99 (48,3)	0,021¹	0,61 (0,41-0,93)
Outros haplótipos	131 (63,9)	106 (51,7)		Referência
CCGGT	140 (68,3)	131 (63,9)	0,390	1,20 (0,79-1,83)
Outros haplótipos	65 (31,7)	74 (36,1)		Referência
ATGGC	99 (48,3)	106 (51,7)		Referência
Outros haplótipos	106 (51,7)	99 (48,3)	0,433	1,17 (0,79-1,75)
<i>KDR</i> **				
TGGT	135 (65,9)	132 (64,4)	0,627	1,11 (0,73-1,68)
Outros haplótipos	70 (34,1)	73 (35,6)		Referência
CAGT	143 (69,8)	124 (60,5)	0,097	1,42 (0,93-2,17)
Outros haplótipos	62 (30,2)	81 (39,5)		Referência

N: número; %: porcentagem ; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança. * Haplótipos dos polimorfismos do *VEGFA* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C e -460C/. ** Haplótipos dos polimorfismos do *KDR* -604T/C, -271G/A, +1192G/A e +1719A/T. Os haplótipos foram considerados de acordo com o papel funcional dos alelos; a maioria dos alelos dos haplótipos CCGCT e CCGGT do *VEGFA* e TGGT e CAGT do *KDR* foram associados com maior produção de VEGFA ou KDR ou maior eficiência de ligação do KDR pelo VEGFA, e a maioria dos alelos dos haplótipos ATAGC e ATGGC do *VEGFA* foram associados com menor produção de VEGFA. Resultados significativos são apresentados em negrito. ¹bootstrap = 0,02. Resultados significativos são apresentados em negrito.

Não encontramos diferenças significativas nas frequências dos haplótipos dos genes *VEGF* e *KDR* em pacientes com GAG e controles.

7. Haplótipos dos genes *VEGFA* e *KDR* e aspectos clínico-patológicos de GAG

As distribuições dos pacientes com GAG por haplótipos dos genes *VEGFA* e *KDR* e aspectos clínico-patológicos estão representados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Frequência dos haplótipos dos genes *VEGFA* e *KDR* em pacientes com glioma de alto grau estratificados por características clinicopatológicas.

Haplótipos*	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
VEGFA									
CCGCT	69 (68,3)	63 (60,6)	0,247	93 (68,9)	39 (55,7)	0,062	25 (69,4)	107 (63,7)	0,512
Outros haplótipos	32 (31,7)	41 (39,4)		42 (31,1)	31 (44,3)		11 (30,6)	61 (36,3)	
ATAGC	39 (38,6)	35 (33,7)	0.460	50 (37,0)	24 (34,3)	0,697	15 (41,7)	58 (34,5)	0,417
Outros haplótipos	62 (61,4)	69 (66,3)		85 (63,0)	46 (65,7)		21 (58,3)	110 (65,5)	
CCGGT	70 (69,3)	70 (67,3)	0,758	93 (68,9)	47 (67,1)	0,799	27 (75,0)	113 (67,3)	0,432
Outros haplótipos	31 (30,7)	34 (32,7)		42 (31,1)	23 (32,9)		9 (25,0)	55 (32,7)	
ATGGC	47 (46,5)	52 (50,0)	0.620	63 (46,7)	36 (51,4)	0,557	17 (47,2)	81 (48,2)	0,914
Outros haplótipos	54 (53,5)	52 (50,0)		72 (53,3)	34 (48,6)		19 (52,8)	87 (51,8)	
KDR									
TGGT	68 (67,3)	67 (64,4)	0,661	91 (67,4)	44 (62,9)	0,515	26 (72,2)	108 (64,3)	0,441
Outros haplótipos	33 (32,7)	37 (35,6)		44 (32,6)	26 (37,1)		10 (27,8)	60 (35,7)	

Haplótipos*	Idade		Valor <i>P</i>	Gênero		Valor <i>P</i>	Grau histológico *		Valor <i>P</i>
	≤ 54	> 54		Masculino	Feminino		GIII	GIV	
	(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)		(N, %)	(N, %)	
CAGT	68 (67,3)	75 (72,1)	0,455	95 (70,4)	48 (68,6)	0.790	19 (52,8)	124 (73,8)	0,012
Outros haplótipos	33 (32,7)	29 (27,9)		40 (29,6)	22 (31,4)		17 (47,2)	44 (26,2)	

N: número; %: porcentagem ; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança. * Haplótipos dos polimorfismos do *VEGFA* -2578C/A, -2489C/T, -1154G/A, -634G/C e -460C/. ** Haplótipos dos polimorfismos do *KDR* -604T/C, -271G/A, +1192G/A e +1719A/T. Os haplótipos foram considerados de acordo com o papel funcional dos alelos; a maioria dos alelos dos haplótipos CCGCT e CCGGT do *VEGFA* e TGGT e CAGT do *KDR* foram associados com maior produção de VEGFA ou KDR ou maior eficiência de ligação do KDR pelo VEGFA, e a maioria dos alelos dos haplótipos ATAGC e ATGGC do *VEGFA* foram associados com menor produção de VEGFA. Resultados significativos são apresentados em negrito. O ajuste de Bonferroni foi usado para corrigir múltiplos testes ($p = 0,017$) . ¹bootstrap = 0,02. Resultados significativos são apresentados em negrito.

O haplótipo CAGT do gene *KDR* foi mais comum em pacientes com glioma de grau IV quando comparado com os pacientes com glioma de grau III, (73,8% *versus* 52,8%, $p = 0,012$).

O O haplótipo CAGT do gene *KDR* também mais comum em pacientes com glioma de grau IV do que em controles. Indivíduos com esse haplótipo estiveram sob risco 1,76 vezes maior de apresentar glioma de grau IV do que indivíduos com os outros haplótipos. (IC 95%: 1,10-2,82, $P = 0,01$, P -Bootstrap = 0,02).

DISCUSSÃO

O GAG é o principal tumor maligno do cérebro, e apesar de sua incidência relativamente baixa, tem alta mortalidade.(1)(3) É uma doença clínica e biologicamente heterogênea, e apesar das múltiplas vias moleculares estudadas a fim do seu entendimento (55), o melhor conhecimento biológico dessa doença é uma meta necessária para que melhores desfechos sejam alcançados.

É sabido que a AG é um processo crucial no desenvolvimento e progressão de tumores. (56) Os GAG são tumores altamente vascularizados e a presença histológica de proliferação microvascular é um dos fatores que indica que o tumor é de alto grau.(4) Portanto, a AG é um ponto crucial para o crescimento e progressão desses tumores no cérebro.(30,55) Também já está bem estabelecido que o VEGFA e o KDR são essenciais para a proliferação, migração e organização endotelial em vasos funcionais (56) e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de GAG.

Uma vez que a capacidade de produzir essas proteínas é variável em humanos, (56,57,58), alguns fatores genéticos da via metabólica da AG podem influenciar a expressão de proteínas estimuladoras da AG e a formação de vasos intratumorais, resultando em maior risco de GAG, ou em características clínicas de pacientes com esse diagnóstico.

Inicialmente encontramos um aumento no risco de GAG em carreadores dos genótipos CC ou CA do SNP *VEGFA* -2578C/A.

Até onde atinge nosso conhecimentos, há apenas um estudo anterior com foco no papel desse SNP no risco de GAG. (52) Linhares et al. (52) não demonstraram essa associação de risco para o SNP *VEGFA* -2578 C/A com GAG em uma população significativamente menor de pacientes com GBM (N = 84), o que pode ser a razão para essa disparidade de resultados, uma vez que as frequências alélicas dos controles foram

semelhantes nas duas populações. De fato, a associação dos genótipos CC ou CA do -2578 e aumento do risco de GAG era esperada, uma vez que o alelo “C” desse SNP tem sido relacionado à maior produção de VEGFA, (46,48) e maior risco de outros tumores, como linfoma e mieloma múltiplo. (57,58) Assim, hipotetizamos que indivíduos que carregem o alelo “C” do VEGFA -2578 C/A podem produzir mais fatores estimuladores de AG do que aqueles com o genótipo AA, e podem ter como consequência, mais risco de GAG.

O *VEGFA* -1154 GG foi associado com risco aumentado de GAG no presente estudo. Há poucos relatos anteriores com foco na associação do SNP *VEGFA* -1154 G/A com risco aumentado de mieloma múltiplo (58) e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, (59) mas seu papel na origem ou progressão de GAG é desconhecido na literatura. Assim, esse novo achado pode ser devido ao já bem descrito papel funcional do alelo “G” do *VEGFA* -1154, que aumenta a expressão do VEGFA, (45,48) o que pode predispor indivíduos aos tumores, e nesse caso ao GAG.

Observamos que indivíduos portadores do *VEGFA* -634 GC ou CC e *VEGFA* -460 CT ou TT apresentaram maior risco de desenvolver GAG. Em relação ao *VEGFA* -634 G/C, nosso achado está de acordo com os relatados anteriormente na população chinesa, também demonstrando que o alelo “C” esteve associado ao aumento do risco de glioma de todos os graus, incluindo o GAG em suas análises de subgrupo, (60,61,62,63). Quanto ao papel *VEGFA* -460 C/T no risco de GAG, Linhares et al. (52) também relataram aumento do risco de gliomas grau II-IV em pacientes que exibiam o alelo “T” do *VEGFA* -460C/T em caucasianos de Portugal.

Sabendo que os papéis dos alelos “G” e “C” do SNP *VEGFA* -634G/C, e do alelo “C” e “T” do SNP *VEGFA* -460C/T na produção de VEGFA são incertos na

literatura, (39,46,50) os resultados do presente estudo somado aos dados dos estudos acima descritos, sugerem que o alelo "C" do *VEGFA*-634G/C e o alelo "T" do *VEGFA* -460C / T podem determinar maior produção de VEGFA, mais formação de vasos sanguíneos e maior susceptibilidade ao desenvolvimento de GAG.

Surpreendentemente, encontramos pela primeira vez na literatura um efeito protetor do *VEGFA* -2489 TT quanto ao risco de GAG. Esse achado não era esperado por nós, uma vez que o alelo "C" do *VEGFA* -2489 C/T foi previamente associado com transcrição reprimida de VEGFA, resultando e AG reduzida em células gástricas. (38) No entanto, esses autores também mostraram que o alelo "C" não teve nenhuma influência sobre as células ovarianas no mesmo estudo (38), culminando na fragilidade desse achado.

Considerando a escassez de informações sobre o papel funcional do alelo "T" do SNP *VEGFA* -2489 C/T, acreditamos que esse alelo possa estar relacionado à AG diminuída. Piores respostas aos agentes anti-angiogênicos foram observadas no tratamento de pacientes com GAG e com o genótipo *VEGFA* -2489 TT, sendo que esse achado foi atribuído à menor expressão de VEGFA e redução da formação de vasos sanguíneos, (64) e sustenta a nossa hipótese.

Encontramos uma forte associação entre as combinações dos genótipos *VEGFA* -2578 CC mais *VEGFA* -1154 GG, *VEGFA* -2578 CC ou CA mais *VEGFA* -634 GC ou CC, *VEGFA* -2578 CC ou CA mais *VEGFA*-460 CT ou TT, *VEGFA* -1154 GG ou GA mais *VEGFA* -634 GC ou CC e *VEGFA* 634 GC ou CC mais *VEGFA* -460 CT ou TT em nossos indivíduos quanto ao risco de GAG, mostrando a alta relevância desta análise combinada entre os SNPs do *VEGFA*, e com um possível efeito sinérgico. Essas combinações fomentam a possibilidade da realização de ferramentas genômicas de avaliação de risco que são feitas por combinações de genótipos de risco de diferentes

vias, e podem ter especial aplicabilidade em estratégias de rastreamento dirigido. Até onde sabemos, todas essas combinações relacionadas ao risco de GAG são apresentadas pela primeira vez em nosso estudo.

O haplótipo “ATAGC” dos SNPs do *VEGFA* mostrou-se um fator protetor para GAG em nosso estudo. Embora esse dados tenha menor aplicabilidade clínica, ele corrobora e reforça todos os nossos achados, considerando a total ausência de qualquer alelo relacionado ao aumento de risco de GAG por nós demonstrado, ao menos nessa composição haplotípica. Esse achado foi relatado pela primeira vez no presente estudo.

Não encontramos associação de risco para GAG nos SNPs do *KDR* isolados ou em combinações. Existem apenas dois estudos com foco nesta associação em gliomas, ambos realizados na população chinesa, e nenhum exclusivamente em GAG. As associações entre o alelo “T” do *KDR* +1719A/T (62) e do alelo “C” do *KDR* -604T/C (62,66) foram relacionadas ao risco de glioma GII-IV, embora Chen et al. (65) não demonstraram essa associação no subgrupo de pacientes com GBM.

Como a população brasileira é heterogênea, mista e composta por ameríndios, europeus, asiáticos e africanos migrantes, (67,68) e a população chinesa é homogênea, e que diferenças significativas nas frequências do genótipo *KDR* +1719 TT (68,3% vs 40,7%; $P < 0,0001$), (62) e do genótipo *KDR* -604 CC (8,8 % vs 27,3% $P < 0,0001$), (66) foram encontradas nos nossos controles e em controles chineses, acreditamos que diferenças étnicas podem ser a explicação para a disparidade de resultados encontrados em nosso estudo e naqueles realizados na China.

O alelo “A” do *KDR* +1192 G/A também foi previamente relacionado ao risco de glioma, (65,66) mas este achado não está de acordo com o papel funcional descrito na literatura para esse alelo, que resulta em redução da eficiência de ligação ao VEGFA. (44)

Encontramos um resultado clinicamente muito relevante na avaliação dos haplótipos do *KDR*. O haplótipo "CAGT" dos SNPs -604T/C, -271G/A, +1192G/A e +1719A/T foi mais comum em pacientes com glioma de grau IV do que em tumores de grau III, denotando maior agressividade tumoral. Além disso, também descrevemos que o haplótipo do *KDR* "CAGT" esteve associado a um risco aumentado de glioma de grau IV. Assim, hipotetizamos que esse haplótipo amplifique a AG, e a faça trabalhar mais rapidamente e com maior eficiência, resultando, consequentemente, na formação e agressividade do GAG de grau IV. De fato, os alelos "A", "G" e "T" dos SNPs -271G/A, +1192G/A e +1719A/T do *KDR* foram previamente associados com maior eficiência de ligação ou maior transcrição de *KDR* (42,44), o que pode favorecer a agressividade do tumor. (69,70)

Essas informações podem trazer auxílio na distinção diagnóstica entre tumores de grau III e IV, e inferem maior agressividade de doença com possíveis implicações de prática clínica.

Em conclusão, nossos dados sugerem que anormalidades herdadas na formação de vasos sanguíneos, relacionadas aos SNPs dos genes *VEGFA* e *KDR*, influenciam o risco e a agressividade de GAG em uma população etnicamente diversa do sudeste do Brasil.

Consideramos que os dados do presente estudo são importantes e podem auxiliar na formação de uma ferramenta genética de rastreio populacional dirigida a grupos específicos, principalmente quando colocados em somatória aos SNPs descritos como elevadores de risco de GAG em outras vias, por exemplo em genes envolvidos no metabolismo carcinogênico, reparo de DNA, inflamação e resposta imune.(13)

Como resultados inéditos, descrevemos pela primeira vez que os SNPs *VEGFA* -2578C/A, *VEGFA*-1154 G/A e o haplótopo “CAGT” de SNPs do *KDR* -604T/C, -271G/A, +1192G/A e +1719A/T aumentam o risco e/ou agressividade de GAG.

Acreditamos que nossos resultados são clinicamente relevantes; no entanto, estamos cientes de que nosso estudo tem limitações, como o tamanho amostral relativamente pequeno e a falta de estudos funcionais enfocando os papéis dos SNPs na AG do GAG.

Frente ao exposto, consideramos que o estudo cumpriu seus objetivos propostos e trouxe de modo preliminar contribuições relevantes na relação de marcadores genéticos relacionados a via de AG quanto ao risco e aspectos clínicos de GAG.

CONCLUSÕES

- Os genótipos CC ou CA do SNP *VEGFA* -2578 C/A esteve associado a maior risco de GAG, ressaltando importância do alelo C.
- O genótipo GG do SNP *VEGFA* -1154 G/C esteve associado a maior risco de GAG.
- Os genótipos GC ou CC do SNP *VEGFA* -634 G/C esteve associado a maior risco de GAG, ressaltando importância do alelo C.
- Os genótipos CT ou TT do SNP *VEGF* -460 C/T esteve associado a maior risco de GAG, ressaltando importância do alelo T.
- O genótipo TT do SNP *VEGFA* -2489 TT esteve associado a menor risco de GAG.
- A combinação dos genótipos *VEGFA* -2578 CC e *VEGFA* -1154GG, *VEGFA* -2578CC ou CA e *VEGFA* -634 GC ou CC, *VEGFA* -2578 CC ou CA e *VEGFA* -460 CT ou TT, *VEGFA* -1154 GG ou GA e *VEGFA* -634 GC ou CC, e *VEGFA* 634 GC ou CC e *VEGFA* -460 CT ou TT estiveram associadas a maior risco de GAG.
- O haplótipo “ATACG” dos SNPs do gene *VEGFA* mostrou-se um fator protetor de GAG.
- O haplótipo “CAGT” dos SNPs do gene *KDR* mostrou-se mais comum em pacientes com glioma de grau IV do que naqueles com tumores de grau III.
- O haplótipo “CAGT” dos SNPs do gene *KDR* esteve associado a maior risco de glioma de grau IV do que em controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. Neuro-Oncology CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United. 2017;19:1–88.
2. INCA. Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2018. <http://www1.inca.gov/estimativas/2018/>
3. Stupp R, Mason W, van den Bent MJ, Weller M, Fisher BM, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352: 987–996.
4. 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(2):97–109.
5. 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 Neuropathologica*. 2016; 131: 803-820.
6. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica*. 2005; 109: 93-108.
7. Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, Asher AL, Bernstein M, et al. Patterns of Care for Adults With Newly Diagnosed Malignant Glioma. *JAMA*. 2005 Feb 2;293(5):557–564.
8. De Roos AJ, Stewart PA, Linet MS, et al. Occupation and the risk of adult glioma in the United States. *Cancer Causes Control* 2003; 14: 139–150.
9. Bondy ML, Lustbader ED, Buffler PA, William J, Hardy RJ, Strong LC. Genetic Epidemiology of Childhood Brain Tumors. 1991;267:253–267.
10. Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, et al. Mouse Models of Tumor Development in Neurofibromatosis Type 1. *Science*. 1999 Dec 10;286(5447):2172-2176.
11. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al. Li-Fraumeni and Related Syndromes. *Cancer Res*. 2003 Oct 15;63(20):6643-6650.
12. Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, Enting RH, de Vries J, Kleibeuker JH, et al.

- Extra-Intestinal Manifestations of Familial Adenomatous Polyposis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(9):2439–2450.
13. Gu J, Liu Y, Kyritsis AP, Bondy ML. Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics*. 2009 Jul;6(3):427–435.
 14. Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, Wrensch MR, et al. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet* 2017; 49: 789–794.
 15. Mertens AC, Meadows AT, Kasper CE, Neglia JP, Robison LL, Stovall M, et al. New Primary Neoplasms of the Central Nervous System in Survivors of Childhood Cancer: a Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2006 Nov 1;98(21):1528–1537.
 16. Blair A, Fine HA, Loeffler JS, Bowman J, Coble JB, Linet MS, et al. Occupational exposure to magnetic fields and the risk of brain tumors. *Neuro Oncol*. 2009 Jun 1;11(3):242–249.
 17. Little MP, Rajaraman P, Curtis RE, Devesa SS, Inskip PD, Check DP, et al. Mobile phone use and glioma risk : comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. 2012;1147:1–16.
 18. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182–1186.
 19. Shi W, Giaid A, Hu F, Michel RP. Increased Reactivity to Endothelin of Pulmonary Arteries in Long-term Post-obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998;11(2):189–196.
 20. Growth of Ewing's Sarcoma &in Bolontrade MF, Zhou R-R, Kleinerman ES. Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma; *Clin Cancer Res*. 2002 Nov 1;8(11):3622-3627.
 21. Maharaj ASR, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *Am J Pathol*. 2006 Feb 1;168(2):639–648.
 22. De Palma M, Biziato D, Petrova T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017 Jul 14;17:457-474.
 23. Ribatti D, Nico B, Ranieri G, Specchia G, Vacca A. The role of angiogenesis in human non-Hodgkin lymphomas. *Neoplasia*. 2013 Mar;15(3):231–238.
 24. Zhao Y, Adjei AA. Targeting angiogenesis in cancer therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist*. 2015 Jun;20(6):660–73.

25. Louis D.N. Molecular Pathology of malignant gliomas. *Ann Rev Pathol Mech Dis.* 2006 Jan 24;1(1):97–117.
26. Brat DJ, Mapstone TB. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and Its Role in Tumor Progression. *Ann Intern Med.* 2003 Apr 15;138(8):659–668.
27. Bristow R. G., Hill R.P. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev. Cancer* 2008,(3) 180-192.
28. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, et al. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):920-927.
29. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Investig.* 2004 Mar 1;84:397-405.
30. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2013 Oct 17;369(16):1561–1563.
31. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 2010 Dec 9;468(7325):829-833.
32. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010 Nov 21;468:824-828.
33. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108(11):4274–4280.
34. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell.* 2013 Mar 28;153(1):139–152.
35. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1011-1127.
36. Valeria V, Caterina C, Mariano R, Graziella PM. Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996 Apr 15;93(8):1493–1495.
37. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson I V. Novel

- polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999;60(12):1245–1249.
38. Kim YS, Park SW, Kim MH, Jang EJ, Park JS, Park SJ, et al. Novel single nucleotide polymorphism of the VEGF gene as a risk predictor for gastroduodenal ulcers. 2008;23:131–139.
 39. Watson CJ, Webb NJA, Bottomley MJ, Brenchley PEC. Short communication identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. 2000;12(8):1232–1235.
 40. Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62(3):179–213.
 41. Sait SNJ, Dougher-Vermazen M, Shows TB, Terman BI. The kinase insert domain receptor gene (KDR) has been relocated to chromosome 4q11→q12. *Cytogenet Genome Res.* 1995;70(1–2):145–146.
 42. Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE, et al. Novel Functional Germline Variants in the VEGF Receptor 2 Gene and Their Effect on Gene Expression and Microvessel Density in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 15;17(16):5257-5267.
 43. Kariyazono H, Ohno T, Khajoe V, Ihara K, Kusuhara K, Kinukawa N, et al. Association of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor Gene Polymorphisms with Coronary Artery Lesions of Kawasaki Disease. *Pediatr Res.* 2004 Dec 1;56:953-959.
 44. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y. Polymorphisms of KDR Gene Are Associated With Coronary Heart Disease. 2007;50(8): 760-767.
 45. Shahbazi M, Fryer a a, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson I V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *JAmSocNephrol.* 2002; 13: 260-264.
 46. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003; Aug;34(4):383-394.
 47. Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, Jakobsen A. Gynecologic Oncology The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol*

- Oncol. 2010;117(1):109–116.
48. Gerger A, Labonte M, Lenz HJ. Molecular predictors of response to antiangiogenesis therapies. *Cancer Journal*. 2011; 17: 134-141.
 49. Chen Y, Dawes PT, Matthey DL. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: Differential effect of cigarette smoking. *Cytokine*. 2012;58(3):390–397.
 50. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter 1. 2003;812–816.
 51. Al-Habboubi HH, Sater MS, Almawi AW, Al-Khateeb GM, Almawi WY. Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population. *Eur Cytokine Netw*. 2011; 22: 154 - 158.
 52. Linhares P, Viana-Pereira M, Ferreira M, Amorim J, Nabiço R, Pinto F, et al. Genetic variants of vascular endothelial growth factor predict risk and survival of gliomas. *Tumor Biol*. 2018;40(3):1–11.
 53. Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcom AD. Alternative methodology of gene diagnosis. *Human genetic diseases practical approach*. Oxford: IRL Press Limited; 1986. p. 51-64.
 54. Varian H. Bootstrap Tutorial. 2005; 11: 768 - 775.
 55. Fischer I, Gagner J-P, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in Gliomas: Biology and Molecular Pathophysiology. *Brain Pathol*. 2006;15(4):297–310.
 56. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. 2012;23(5):1011–1027.
 57. de Mendonça GRA, Brito ABC, Rocha RM, Delamain MT, de Andrade Natal R, Soares FA, et al. Association of VEGFA-2578 C>A polymorphism with clinicopathological aspects and outcome in follicular lymphoma patients. *Blood cancer journal*. 2016; 6: 464-469.
 58. Hematol A, Borsarelli A, Brito C, Lourenço GJ. Associations of VEGF and VEGFR2 polymorphisms with increased risk and aggressiveness of multiple myeloma. 2014; Aug;93(8):1363-1369.
 59. Toyoshima T, Eletr S, Ka P, Kuhr K. Single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene associated with incidence of oral

- squamous cell carcinoma. 2010;786–792.
60. Jiang H, Lian M, Xie J, Li J, Wang M. Three single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and glioma risk in a Chinese population. *J Int Med Res.* 2013;41(5):1484–1494.
 61. Li R, Zhao Y, Fan W, Chen H, Chen Y, Liu Y, et al. Possible association between polymorphisms of human vascular endothelial growth factor A gene and susceptibility to glioma in a Chinese population. *Int J Cancer.* 2011;128(1):166–175.
 62. Zhang J, Yang J, Chen Y, Mao Q, Li S, Xiong W, et al. Genetic Variants of VEGF (rs201963 and rs3025039) and KDR (rs7667298, rs2305948, and rs1870377) Are Associated with Glioma Risk in a Han Chinese Population: a Case-Control Study. *Mol Neurobiol.* 2016;53(4):2610–2618.
 63. Zhao P, Chen A, Qi Q, Zhou W, Feng Z, Wang J, et al. Impact of *VEGFA* polymorphisms on glioma risk in Chinese. *Oncotarget.* 2017;8(48):83712–83722.
 64. Galanis E, Anderson SK, Lafky JM, Uhm JH, Giannini C, Kumar SK, et al. Phase II study of bevacizumab in combination with sorafenib in recurrent glioblastoma (N0776): a north central cancer treatment group trial. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 4816-4823.
 65. Chen H, Wang W, Xingjie Z, Song X, Fan W, Keke Z, et al. Association between genetic variations of vascular endothelial growth factor receptor 2 and glioma in the Chinese Han population. *J Mol Neurosci.* 2012; 47: 448-457.
 66. Gao Y, Ma P, He Y, Liu Y, Jiang Y. Genetic Variations of Kinase Inserts Domain Receptor (KDR) Gene Are Associated with the Risk of Astrocytomas. *Mol Neurobiol.* 2016; 53: 2541-2549.
 67. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet.* 2001; Jan; 68(1):281-286.
 68. Sortica V de A, Ojopi EB, Genro JP, Callegari-Jacques S, Ribeiro-dos-Santos Â, de Moraes MO, et al. Influence of Genomic Ancestry on the Distribution of *SLCO1B1*, *SLCO1B3* and *ABCB1* Gene Polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012 May 1;110(5):460–468.
 69. Sjöström S, Wibom C, Andersson U, Brännström T, Broholm H, Johansen C, et al. Genetic variations in VEGF and VEGFR2 and glioblastoma outcome. *J Neurooncol.* 2011; 104: 523-527.
 70. Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, Kolar Z, et al.

Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle*. 2008; 7: 2553-2561.

ANEXOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de Polimorfismos nos Genes VEGF e VEGFR2 no Risco de Gliomas de Alto Grau e Impacto nas Manifestações Clínicas e Biológicas do Tumor

Pesquisador: Vivian Castro Antunes dos Santos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 3

CAAE: 21998214.3.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 635.826

Data da Relatoria: 02/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional, de coorte prospectiva, com financiamento de bolsa FAPESP.

Gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central; sendo o astrocitoma anaplásico (AA) e glioblastoma multiforme (GBM) considerados tumores de alto grau de malignidade devido a maior agressividade. A angiogênese é um importante fator na origem e progressão dos gliomas de alto grau. O principal estimulador da angiogênese é o vascular endothelial growth factor (VEGF), que atua particularmente no vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2). A habilidade para formar vasos sanguíneos é variável em humanos e é herdada dos ancestrais. Polimorfismos nos genes VEGF e VEGFR2 alteram a quantidade ou a função dos fatores por eles codificados e podem constituir explicação plausível para a variabilidade herdada para formar vasos sanguíneos entre indivíduos distintos. Os papéis dos polimorfismos do gene VEGF e do gene VEGFR2 na origem dos gliomas de alto grau, suas manifestações clínicas e seus aspectos biológicos são desconhecidos. Esclarecer este assunto constitui o objetivo do presente estudo, além de definir grupos de risco para desenvolvimento de glioma de alto grau a partir de polimorfismos dos genes relacionados à angiogênese vegf e vegfr2.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 635.826

Objetivo da Pesquisa:

- Verificar se os polimorfismos -2578C/A (rs699947), -2489C/T (rs1005230), -1154G/A (rs1570360), -634G/C (rs2010963), -460C/T (rs833061) e +936C/T (rs3025039) do gene VEGF e os polimorfismos +1192G/A (rs2305948), +1719A/T (rs1870377), -271G/A (rs7667298) e -604 T/C (rs2071559) do gene VEGFR2 alteram o risco de desenvolvimento do GBM, as manifestações clínicas e o comportamento biológico do tumor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Riscos relativos apenas à coleta de sangue periférico (dor de pequena intensidade e curta duração e pequena mancha roxa no local de punção venosa).

Benefícios: Nenhum benefício direto ao participante da pesquisa. Academicamente, o estudo poderá gerar conhecimento relativo ao risco de desenvolvimento de gliomas de alto grau e, assim, contribuir para o entendimento da fisiopatologia do tumor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critério de inclusão: Histologia confirmada de glioma de alto grau.

Critério de Exclusão: Pacientes que não aceitem participar do estudo.

Serão incluídos no estudo 350 pacientes adultos (idade maior ou igual a 18 anos), com diagnóstico confirmado de gliomas de alto grau (AA ou GBM), de ambos os sexos, atendidos nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Neurocirurgia do HC da Unicamp (n= 100), da Faculdade de Medicina da USP (n= 150), do Hospital Estadual de Sumaré (n= 50) e do Hospital Sírio Libanês (n= 50). Serão avaliados 350 doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, tidos como controles do estudo, que serão pareados aos pacientes por idade, gênero e raça. Os dados relativos à identificação, idade ao diagnóstico, gênero e etnia serão obtidos em formulários específicos preenchidos pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo. O diagnóstico de glioma de alto grau será realizado em exame histopatológico de fragmento de material tumoral obtido por biópsia ou ressecção cirúrgica das lesões, e será classificado segundo critérios da OMS (WHO, 2007). Análise molecular dos genes VEGF e VEGFR2 O DNA genômico será obtido de amostras de sangue periférico dos pacientes com gliomas de alto grau e de controles por extração com cloreto de lítio [40] e a concentração do DNA será determinada por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EUA). Os genótipos dos polimorfismos dos genes VEGF e VEGFR2 serão obtidos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, usando TaqMan® SNP Genotyping Assays, (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA) com as referências de cada polimorfismo do VEGF, descritas no projeto. A análise molecular dos genes VEGF e VEGFR2 será realizada no Laboratório de Genética do Câncer da Disciplina de Oncologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 635.826

FCM da UNICAMP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável e pelo superintendente do HC/Unicamp.

Cronograma adequado.

TCLE dos sujeitos do grupo caso foi modificado, conforme orientações feitas por esse colegiado em relatoria anterior, no que se refere aos riscos, desconfortos e possíveis benefícios aos participantes, à confidencialidade dos dados, às condições de ressarcimento(ou não) para participar da pesquisa, a garantia de retirar o consentimento a qualquer momento.

Foi apresentado o TCLE adequadamente redigido para o grupo controle, segundo recomendação de parecer anterior.

A responsabilidade dos pesquisadores quanto a informação de resultado de exame genético, e do aconselhamento genético, foi incluída nos 2 TCLEs, do grupo controle e do caso. Os pesquisadores anexaram o regimento do biorepositório referido no presente estudo, conforme solicitado.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, após resolução de pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme apresentado nesta plataforma, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 635.826

CAMPINAS, 05 de Maio de 2014

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de Polimorfismos nos Genes VEGF e VEGFR2 no Risco de Gliomas de Alto Grau e Impacto nas Manifestações Clínicas e Biológicas do Tumor

Pesquisador: Vivian Castro Antunes dos Santos

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 21998214.3.3001.0068

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 742.137

Data da Relatoria: 21/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo clínico prospectivo, financiado pela FAPESP. Pretende-se avaliar a influência que os polimorfismos - 2578C/A (rs699947), -2489C/T (rs1005230), -1154G/A (rs1570360), -634G/C (rs2010963), -460C/T (rs833061) e +936C/T (rs3025039) do gene VEGF e os polimorfismos +1192G/A (rs2305948), +1719A/T (rs1870377), -271G/A (rs7667298) e - 604 T/C (rs2071559) do gene VEGFR2 podem exercer no desenvolvimento do glioma de alto grau, no comportamento biológico do tumor e nas manifestações clínicas. O conhecimento do papel desses polimorfismos, pode auxiliar na definição de grupos de risco no desenvolvimento desse tipo de tumor. Para tal estudo, serão selecionados 350 pacientes adultos (idade mínima de 18 anos), com diagnóstico confirmado de gliomas de alto grau (AA ou GBM), de ambos os sexos, atendidos nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Neurocirurgia do HC da UNICAMP (n= 100), da Faculdade de Medicina da USP (n=150), do Hospital Estadual de Sumaré (n= 50) e do Hospital Sírio Libanês (n= 50). Serão avaliados 350 doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, tidos como controles do estudo, que serão pareados aos pacientes por idade, gênero e raça. O diagnóstico de glioma de alto grau será realizado em exame histopatológico de fragmento de material tumoral obtido por biópsia ou ressecção cirúrgica das lesões, e será classificado segundo critérios da OMS (WHO, 2007). Para a

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 742.137

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os Documentos solicitados para a submissão à CAPPesq, incluindo: Anuências das Instituições participantes da coleta de amostras biológicas. Apresentação de TCLE do Grupo Controle e do Paciente para participação no Estudo e Apresentação do Regimento de Biorepositório adequado para autorização de estocagem de material biológico.

Recomendações:

Seguir sempre as normas da Resolução 466/2012 (CNS/MS).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 07 de Agosto de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br