

# FACTORES PREDITIVOS DA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA NO CANCRO COLORRECTAL: PAPEL DOS POLIMORFISMOS NOS GENES QUE MEDEIAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Catarina Rodrigues<sup>1</sup>; Carina Pereira<sup>2</sup>, Rui Medeiros<sup>2</sup>, Mário Dinis-Ribeiro<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Oncologia; Enfermeira do Serviço de Oncologia Médica - Centro Oncológico, CHTMAD, EPE;

<sup>2</sup> Grupo de Oncologia Molecular, IPOPG, EPE; ICBAS, Universidade do Porto;

<sup>3</sup> Serviço de Gastrenterologia, IPOPG, EPE;

<sup>4</sup> C.I.N.T.E.S.I.S. – Serviço de Bioestatística e Informática Médica. Faculdade de Medicina do Porto

A partir de uma série consecutiva de doentes oncológicos com cancro colorrectal submetidos a quimioterapia (n=108), foi realizado um estudo de caso-controlo de forma a determinar o papel dos polimorfismos genéticos nos genes que medeiam a resposta inflamatória no processo de evolução da mucosite oral. Foram ainda incluídas outras variáveis para estudo, capazes de influenciar o risco individual para desenvolver este efeito secundário. Contudo, não foram identificadas quaisquer divergências entre géneros, idade média dos participantes, índice de massa corporal, diabetes mellitus, prótese dentária, hábitos tabágicos e alcoólicos e alterações hematológicas nos grupos caso e controlo. A mucosite oral prévia foi identificada numa grande proporção de casos (35%) (vs 0% no grupo controlo,  $p \leq 0.001$ ). Os portadores do alelo A na posição -308G>A no gene TNF- $\alpha$  (genótipos GA e AA) possuem um risco diminuído para desenvolver a mucosite oral (OR=0.266; 95%IC: 0.073-0.964) após os tratamentos de quimioterapia específicos para cancro colorrectal. Para que se possam estabelecer medidas profiláticas e realizar diagnósticos precoces da mucosite oral em indivíduos com cancro colorrectal submetidos a quimioterapia serão necessários estudos ulteriores que incluam os factores preditivos identificados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Mucosite oral; polimorfismos genéticos; cancro colorectal; quimioterapia; inflamação.

*From a consecutive series of colorectal cancer patients treated with chemotherapy (n=108), a case-control study was performed, to establish the role of genetic polymorphisms in genes modulating the inflammatory response in the evolution of oral mucositis (OM). However, other variables influencing the individual risk for oral mucositis were included for study. No differences are observed both in gender, mean age of participants, body mass index, diabetes mellitus, dental prosthesis, smoking, alcohol consumption and hematological data changes between cases and controls. Earlier OM was reported in a higher proportion of cases (35%) (vs 0% in controls,  $p \leq 0.001$ ). The TNF- $\alpha$  -308A allele appeared to be associated with a decreased risk for oral mucositis onset (OR=0.266; 95%CI: 0.073-0.964) in colorectal cancer patients treated with chemotherapy. Further studies should be conducted as this may represent a risk marker for this important side-effect after chemotherapy, in a way that may enable to submit patients to preventive strategies and early diagnosis..*

**KEYWORDS:** Oral mucositis; genetic polymorphisms, colorectal cancer, chemotherapy, inflammation.

## INTRODUÇÃO

A nível mundial, são diagnosticados anualmente 783.000 novos casos de cancro colorrectal (CCR) e é estimado que ocorram cerca de 394.000 mortes por ano devido a esta neoplasia. Na União Europeia, o CCR surge como a segunda causa de morte relacionada com o cancro no sexo masculino<sup>[1]</sup>.

Na última década, assistimos a progressos significativos no tratamento do CCR localizado, relacionados com os avanços ocorridos nos domínios da cirurgia, radioterapia e quimioterapia (QT)<sup>[2]</sup>. Actualmente, a QT é responsável pelo incremento da sobrevivência em diversos tumores e tem um papel importante na cura do cancro, no aumento da esperança de vida e no alívio dos sintomas<sup>[3]</sup>. Contudo, estes tratamentos apresentam toxicidades dose-limitantes consideráveis, onde se inclui a mucosite oral (MO)<sup>[4]</sup>, e efeitos secundários dispendiosos relacionados com os tratamentos antineoplásicos<sup>[5]</sup>. A incidência e gravidade da MO são influenciadas pelo tipo de tratamento antineoplásico administrado e pelos factores inerentes ao doente oncológico. Cerca de 40% dos utentes submetidos a QT convencional apresentaram complicações orais relacionadas com o tratamento<sup>[6]</sup>.

A MO está associada a consequências clínicas e económicas importantes, como o atraso ou a redução da dose de QT ou de radioterapia, comprometendo os resultados dos tratamentos a longo prazo, e aumenta o tempo do internamento e os recursos necessários ao controlo dos sintomas<sup>[7]</sup>. Está também associada a uma variedade de sintomas agudos e crónicos que têm um impacto negativo considerável na qualidade de vida, e é responsável pelo aumento da depressão nos doentes oncológicos, pelas perturbações do sono e pelo aumento significativo dos distúrbios de humor<sup>[7]</sup>, razão pela qual as disfunções orais podem influir no bem-estar psicológico dos indivíduos<sup>[8]</sup>.

Apenas nos últimos tempos é que a biopatologia complexa e os mecanismos moleculares inerentes à mucosite foram considerados<sup>[9,10]</sup>. Sonis<sup>[10,11]</sup> propôs um mecanismo fisiopatológico, baseado numa cascata de eventos destrutivos e inflamatórios iniciados por agentes citotóxicos e exacerbados pela presença de factores locais e sistémicos. Durante a fase infla-

matória desse modelo constituído por cinco etapas, a agressão dos tecidos leva à libertação de: radicais livre, proteínas específicas, prostaglandinas e citocinas pro-inflamatórias, onde se inclui a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e o factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pelas células dos tecidos epitelial, endotelial e conjuntivo. Durante anos, as vulnerabilidades individuais relacionadas com as toxicidades induzidas por QT e radioterapia foram reconhecidas como distintas<sup>[10,11]</sup>.

A resposta inflamatória possui, provavelmente, um papel considerável na iniciação e progressão da MO induzida pelos tratamentos antineoplásicos, e esta resposta inflamatória é modelada possivelmente por polimorfismos genéticos. Neste estudo foi avaliada a influência dos polimorfismos genéticos em algumas citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-6, TNF- $\alpha$ ) e, de uma forma original, na enzima cicloxigenase (COX)-2. No entanto, foram incluídas para estudo outras variáveis que influenciam o risco individual para desenvolver a MO após QT nos indivíduos com CCR.

## OBJECTIVOS E MÉTODOS

### a) Desenho do estudo e população:

De forma a estabelecer os factores preditivos biológicos da MO, foi desenvolvido um estudo de Caso-Controlo a partir de séries consecutivas de doentes com CCR submetidos a QT (a qualquer um destes protocolos: DeGramont, Mayo, Roswell Park, Irinotecan, Folfiri ou Folfax) e seguidos no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil entre Fevereiro e Março de 2008. Todos os doentes oncológicos que satisfizeram os critérios de inclusão e estavam acessíveis durante este período concordaram em participar no estudo após o consentimento informado e voluntário esclarecido. Os critérios de inclusão obrigavam a que cada participante tivesse sido submetido a pelo menos quatro ciclos de qualquer um dos esquemas de QT entre Janeiro de 2004 e Março de 2008, e ter-lhe sido diagnosticado CCR (confirmado histologicamente). Os indivíduos excluídos eram portadores de deficiência mental, incapazes de entender o

objectivo da sua participação neste estudo / apresentavam barreiras comunicacionais, ou possuíam outra neoplasia associada.

A população estudada incluiu cento e oito indivíduos (65% dos participantes eram do sexo masculino) com uma idade mediana de 62 anos (desvio padrão 10,9) e uma idade média de 63 anos (entre os 34 e os 80 anos). Destes, vinte e seis (24%) desenvolveram MO e constituíram o grupo dos casos. O grupo controlo incluiu indivíduos (76% da amostra estudada) que não apresentaram MO.

### **b) Identificação das variáveis em estudo**

Nesta investigação clínica, a MO foi definida como a variável dependente, enquanto que os polimorfismos genéticos modificadores da resposta inflamatória (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-6, TNF- $\alpha$  e COX-2) constituíram a variável independente. As outras variáveis de interesse para o estudo/co-variáveis, com efeito preditivo para a MO, incluíram a idade, género, diabetes, tipo de tumor, QT (protocolo citotóxico), valores hematológicos, índice de massa corporal, uso de prótese dentária e os hábitos tabágicos e alcoólicos. Estes dados clínicos foram obtidos através da consulta do processo clínico.

### **c) Genotipagem de polimorfismos**

Foram colhidos aproximadamente 9 ml de sangue para tubos com EDTA a cada um dos participantes. O sangue colhido foi cuidadosamente armazenado a -20 °C, até à extracção do DNA (utilizando o QIA-amp DNA blood mini kit - Qiagen, Madrid, Spain). Os polimorfismos +4845G>T IL-1 $\alpha$  (rs17561), +3954C>T IL-1 $\beta$  (rs1143634), +2018T>C IL-1RN (rs419598) e -308G>A TNF-a (rs1800629) foram caracterizados através da técnica de reacção em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR), utilizando as seguintes TaqMan SNP genotyping assays validadas, C\_\_9546471\_10, C\_\_9546517\_10, C\_\_8737990\_10 and C\_\_7514879\_10, respectivamente.

As outras três variações genéticas, -1195A/G e -765G/C na COX2 e -174G/C na IL6, foram definidas através da técnica Polymerase Chain Reaction –

Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RLFP) baseada nos protocolos previamente descritos por Zhang et al. [12], Pereira et al. [13] e Kristiansen et al. [14], respectivamente. Toda a genotipagem foi realizada por técnicos do laboratório que desconheciam quais as amostras pertencentes a indivíduos com MO (estudo cego). Para além disso, cada análise incluiu controlos negativos (mix de PCR sem DNA) de forma a garantir que não ocorrem contaminações durante a execução das técnicas. A análise de 10% dos casos foi repetida, de forma randomizada, para cada polimorfismo estudado, e cada um dos resultados obtidos através da técnica de RFLP foi interpretado independentemente por dois profissionais, de forma a assegurar uma caracterização correcta. Não se observaram discrepâncias entre os resultados.

### **d) Análise estatística**

Os dados obtidos foram informatizados e as análises realizadas utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 14.0). As diferenças observada relativas às frequências genotípicas entre os grupos casos e controlos foram avaliadas utilizando o teste do Qui-quadrado ( $X^2$ ) ou o teste exacto de Fisher apenas quando necessário, utilizado para comparar variáveis categóricas, com um nível de significância de 5%. De forma a estabelecer a força da associação entre a mucosite oral e as co-variáveis em estudo, foi calculado o *Odds Ratio* (OR) com um intervalo de confiança de 95%, para além dos valores de P, que também foram estabelecidos.

## **RESULTADOS**

### **a) Caracterização dos participantes: clínica, patologia e tratamento:**

Observou-se que os doentes oncológicos desenvolveram de uma forma mais frequente MO de grau 1 (55%), no que respeita à gravidade; e que apenas 5% dos casos apresentaram o grau mais severo (grau 4). Os indivíduos em estudo foram submetidos, essencialmente, a QT adjuvante (52%), e a MO foi detectada mais frequentemente naqueles submetidos a esquemas de poliquimioterapia (62%), porém não é

significativo quando comparado com os protocolos de monoterapia. Relativamente aos esquemas de monoterapia, apenas os indivíduos que foram submetidos ao protocolo De Gramont apresentaram MO. Não foram observadas quaisquer divergências entre géneros, idade média dos participantes, índice de massa corporal, diabetes mellitus, prótese dentária, esquemas de QT, hábitos tabágicos e alcoólicos e alterações hematológicas nos grupos caso e controlo, como está apresentado na tabela 1. A MO prévia foi identificada numa grande proporção dos casos (35%) (vs 0% em controlos,  $p \leq 0.001$ ). Esta pode ser considerada um factor preditivo para a MO nos indivíduos com CCR submetidos a QT, uma vez que todos os doentes oncológicos que apresentaram MO já a tinham desenvolvido anteriormente.

#### b) Frequências genótípicas e avaliação do risco

Na tabela 2 estão apresentadas as frequências genótípicas, para os vários polimorfismos, dos indivíduos com e sem MO. Não foram observadas diferenças significativas no que respeita às variações genéticas estudadas, com excepção do polimorfismo do TNF- $\alpha$  na posição -308 G>A, onde o genótipo GA possui uma representação significativa no grupo controlo (OR=0.287; 95%IC: 0.079-1.045). Os portadores do alelo A (genótipos GA+AA) parecem estar protegidos para desenvolver MO após a QT (OR=0.266; 95%IC:0.073-0.964). Apesar de não ser estatisticamente significativo, foi observado que os portadores do genótipo heterozigótico GC do polimorfismo da COX-2 na posição -765G>C possuem uma predisposição acrescida, na ordem dos 2,5, para o desenvolvimento desta patologia (95%CI: 0.952-6.800). Quando os resultados são ajustados para a MO prévia, considerada um factor preditivo para a MO, as associações descritas anteriormente não se verificam (OR=0.437; 95%IC:0.116-1.649 para os portadores do alelo A do -308 G>A TNF- $\alpha$ ; e OR=2.494; 95%IC: 0.819-7.595 para os portadores do genótipo GC da -765G>C COX-2). Por outro lado, como apresentado na tabela 3, o polimorfismo -1195A>G da COX-2 parece exercer alguma influência na susceptibilidade genética para desenvolver a patologia nos

**Tabela 1.** Caracterização da amostra.

	Doentes com CCR submetidos a QT		
	Sem MO n=82	Com MO n=26	P
<b>Caracterização dos participantes</b>			
Sexo masculino n (%)	56 (68)	14 (54)	0,179
Idade* média (desvio padrão)	62 (12)	63 (8,6)	0,843
IMC > 25 n (%)	55 (67)	16 (62)	0,604
Diabetes mellitus n (%)	13 (16)	6 (23)	0,390
Mucosite Oral prévia n (%)	0 (0)	9 (35)	0,001
Prótese dentária n (%)	20 (24)	8 (31)	0,518
Hábitos tabágicos n (%)	7 (9)	0 (0)	0,192
Hábitos alcoólicos n (%)	28 (34)	5 (19)	0,150
<b>Patologia</b>			
Localizada no Cólon n (%)	40 (49)	14 (54)	0,653
Estadio $\geq$ III n (%)	58 (72)	23 (88)	0,096
<b>Tratamentos de Quimioterapia</b>			
Monoterapia n (%)	36 (44)	10 (39)	0,625
Protocolo DeGramont n (%)	26 (72)	10 (100)	0,089

CCR, Cancro colorrectal; QT, Quimioterapia; MO, Mucosite oral; IMC, índice de massa corporal.

doentes oncológicos com história prévia de MO, apesar de ser observada apenas uma tendência ( $p=0.057$ ). O grupo dos casos tem uma proporção acrescida de portadores dos genótipos AG (53 vs 32%) e GG (6 vs 2%), conferindo um risco aumentado para desenvolver MO nos indivíduos com CCR portadores do alelo -1195G (OR=2.76; 95%IC: 0.947-8.019). No que respeita aos restantes polimorfismos estudados, não foi observada qualquer tendência.

## DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

A QT pode tratar com sucesso várias formas de cancro. No entanto, estes tratamentos possuem toxicidades dose-limitantes importantes, onde se inclui a MO<sup>[5,7]</sup>. A resposta inflamatória apresenta certamente um papel considerável na iniciação e progressão da MO induzida pelos tratamentos antineoplásicos. É possível que esta resposta inflamatória seja mediada por polimorfismos genéticos. Os polimorfismos que ocorrem nos genes das citocinas permitiram compreender as determinantes genéticas das patologias. As citocinas pró-inflamatórias IL-1  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  possuem papéis reconhecidos na inflamação e na imunidade

**Tabela 2.** Frequências genéticas nos doentes com e sem mucosite oral.

Polimorfismos		Doentes sem MO n (%)	Doentes com MO n (%)	OR	95% IC	P	
IL-1a +4854G/T	GG	43 (52.4)	14 (53.8)	1.00	Referência	-	
	GT	28 (34.1)	7 (26.9)	0.768	0.276-2.139	0.613	
	TT	11 (13.4)	5 (19.2)	1.396	0.413-4.715	0.748	
	T portadores	39 (47.6)	12 (46.2)	0.945	0.390-2.289	0.900	
IL-1b +3954G/A	GG	45 (54.9)	16 (61.5)	1.00	Referência	-	
	GA	30 (36.6)	10 (38.5)	0.938	0.375-2.341	0.890	
	AA	7 (8.5)	0 (0)	0.738	0.635-0.857	0.186	
	A portadores	37 (45.1)	10 (38.5)	0.760	0.308-1.873	0.551	
IL1RN +2018C/T	TT	47 (57.3)	13 (50.0)	1.00	Referência	-	
	TC	31 (37.8)	11 (42.3)	1.283	0.510-3.226	0.596	
	CC	4 (4.9)	2 (7.7)	1.808	0.297-10.99	0.612	
	C portadores	35 (42.7)	13 (50.0)	1.343	0.554-3.252	0.513	
IL6 -174G/C	GG	38 (46.3)	11 (42.3)	1.00	Referência	-	
	GC	36 (43.9)	14 (53.8)	1.343	0.540-3.344	0.525	
	CC	8 (9.8)	1 (3.8)	0.432	0.049-3.837	0.668	
	C portadores	44 (53.7)	15 (57.7)	1.178	0.483-2.870	0.719	
TNF-a -308G/A	GG	55 (67.1)	23 (88.5)	1.00	Referência	-	
	GA	25 (30.5)	3 (11.5)	0.287	0.079-1.045	0.048	
	AA	2 (2.4)	0 (0)	0.705	0.611-0.814	1	
	A portadores	27 (32.9)	3 (11.5)	0.266	0.073-0.964	0.034	
COX-2	-765G/C	GG	57 (69.5)	14 (53.8)	1.00	Referência	-
		GC	16 (19.5)	10 (38.5)	2.545	0.952-6.800	0.058
		CC	9 (11.0)	2 (7.7)	0.905	0.176-4.664	1
		C portadores	25 (30.5)	12 (46.2)	1.954	0.792-4.822	0.142
	-1195A/G	AA	54 (65.9)	16 (61.5)	1.00	Referência	-
		AG	26 (31.7)	9 (34.6)	1.168	0.256-2.994	0.746
		GG	2 (2.4)	1 (3.8)	1.157	0.144-19.84	0.544
		G portadores	28 (34.1)	10 (28.5)	1.205	0.484-3.002	0.688

MO, mucosite oral; OR, odds ratio; IC, Intervalo de confiança.

inata, e a ocorrência de variações apenas numa das bases do gene IL-1RN na posição + 2018 está implicada nas doenças inflamatórias<sup>[15]</sup>. Sonis<sup>[11]</sup> estabeleceu um modelo relacionado com a agressão da mucosa oral no qual um grupo de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6, têm um papel significativo. Do mesmo modo, os polimorfismos que ocorrem na região reguladora do gene da COX-2 podem influenciar a função e/ou a expressão e contribuir para a variabilidade inter-individual na susceptibilidade à inflamação<sup>[16]</sup>.

Esta pesquisa incluiu o estudo de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e, de uma forma original, a enzima COX-2.

Os factores clínicos monitorizados incluíram: o género, a idade, o índice de massa corporal, a diabetes mellitus, próteses dentárias, os hábitos tabágicos e alcoólicos, os dados hematológicos, os esquemas de quimioterapia e o diagnóstico do doente oncológico.

Na nossa amostra, a MO foi diagnosticada em 24% dos indivíduos. Provavelmente a incidência desta patologia foi subdiagnosticada nos doentes oncológicos estudados pois, de acordo com Sonis<sup>[10]</sup>, nas estimativas da incidência apenas a mucosite severa é considerada, razão pela qual os graus 1 e 2 (da MO) raramente são relatados. No que respeita aos factores clínicos, não foram observadas discrepâncias estatisticamente significativas entre os grupos, com excepção

**Tabela 3.** Polimorfismos do TNF- $\alpha$  e da COX-2, ajustados para mucosite oral prévia, nos indivíduos com e sem mucosite oral.

Polimorfismos	Genótipos	Sem MO n (%)	Com MO n (%)	OR	95%IC	P	
TNF- $\alpha$ -308 G/A	Com MOP	GG	0 (0)	9 (100)	1.00		
	Sem MOP	GG	55 (67)	14 (82)	1.00	Referência	-
		GA	25 (31)	3 (18)	0,471	0,124-1,789	0,379
		AA	2 (2)	0 (0)	0,965	0,918-1,014	1
		A Portador	27 (33)	3 (18)	0,437	0,116-1,649	0,212
COX2 -1195 A/G	Com MOP	AA	0 (0)	9 (100)	1.00		
	Sem MOP	AA	54 (66)	7 (41)	1.00	Referência	-
		AG	26 (32)	9 (53)	2,670	0,895-7,966	1
		GG	2 (2)	1 (6)	3,857	0,308-48,241	0,335
		G Portador	28 (34)	10 (59)	2,755	0,947-8,019	0,057

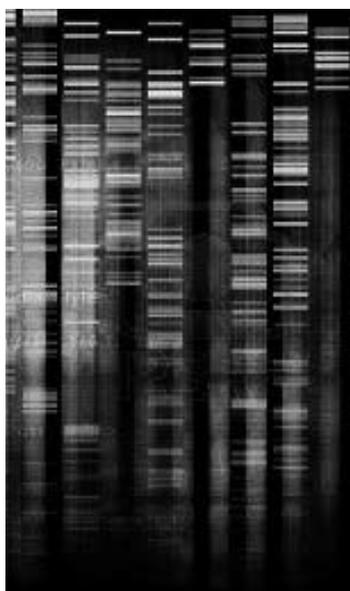
MOP, mucosite oral prévia; MO, mucosite oral; OR, odds ratio; IC, Intervalo de confiança.

da MO prévia, a qual foi identificada numa grande proporção de casos. Consequentemente, o risco de desenvolver MO aumenta em função dos episódios prévios de mucosite induzida por QT, razão pela qual considerámos a MO prévia um factor preditivo para esta patologia. Este fenómeno já tinha sido observado previamente num estudo desenvolvido por Köstler e pelos seus parceiros<sup>[6]</sup>.

A nossa pesquisa confirma que o índice de massa corporal e a diabetes mellitus não influenciam a toxicidade induzida pelo tratamento (incluindo a MO), tal como foi descrito em estudos anteriores<sup>[17,18]</sup>. Da mesma forma, foi estabelecido que os fumadores não apresentam uma incidência de MO diferente da observada nos não fumadores, e também não foi observada qualquer relação entre esta patologia e o consumo de álcool<sup>[19,20]</sup>, tal como foi confirmado pela nossa pesquisa.

Até à data, nenhum outro estudo tinha sido realizado acerca da correlação entre a MO e os polimorfismos genéticos, o que faz desta uma investigação pioneira. Um polimorfismo que afecta directamente a expressão do TNF in vitro foi localizado na posição nucleotídica -308. Uma substituição G→A na posição -308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  está associada a uma actividade transcricional aumentada

(6 a 7 vezes)<sup>[21,22]</sup> e está também relacionada com os níveis mais elevados do TNF- $\alpha$ <sup>[22]</sup>. O envolvimento do TNF- $\alpha$  na patogénese da mucosite está bem estabelecido. Foram observados níveis aumentados desta citocina no soro dos indivíduos que apresentaram toxicidades de natureza não hematológica, relacionadas com a QT<sup>[23]</sup> e nos ratos após a administração de drogas estomatotóxicas<sup>[24]</sup>. Para além do que foi descrito anteriormente, a administração de pentoxifilina e de talidomida levou à inibição da síntese de citocinas e reduziu os factores macroscópicos e histológicos da MO induzida por 5-FU nos hamsters, o que sugere um papel protector destas drogas anti-TNF- $\alpha$



na fisiopatologia da mesma<sup>[25]</sup>. O papel que o polimorfismo do -308G>A TNF- $\alpha$  desempenha na patogénese das doenças de natureza inflamatória é algo controverso. Num estudo conduzido por Guimarães e colegas<sup>[26]</sup>, acerca dos polimorfismos funcionais em indivíduos com estomatite aftosa recorrente (EAR), foi estabelecido que os genótipos heterozigóticos do TNF- $\alpha$  estavam associados a um risco aumentado de desenvolvimento da doença. Pelo contrário, num estudo desenvolvido por Galbraith e pelos seus parceiros<sup>[27]</sup>, a propósito dos

genótipos polimórficos das citocinas como marcadores da gravidade da periodontite em adultos, não foi observada qualquer associação significativa entre o genótipo e a produção de citocinas nestes indivíduos. Da mesma forma, num estudo realizado por Shapira e colegas<sup>[28]</sup>, não foi estabelecida qualquer relação entre a periodontite de início precoce e os polimorfismos genéticos na posição -308 do promotor do TNF- $\alpha$ . Apesar da MO, da EAR, da periodontite e da periodontite de início precoce serem patologias distintas, existe sempre uma inflamação da mucosa oral. No nosso estudo, os genótipos heterozigóticos do TNF- $\alpha$  e os portadores do alelo A (genótipos GA+AA) na posição -308 do promotor do TNF- $\alpha$  parecem conferir protecção ou constituir um baixo risco para desenvolver a MO, mesmo quando a nossa análise é ajustada para a MO prévia, apesar de não ser estatisticamente significativo no subgrupo dos indivíduos com CCR sem história prévia de MO. Estes resultados são incongruentes quando comparados com os que foram descritos acima, nos quais os genótipos heterozigóticos do TNF- $\alpha$  foram associados a risco acrescido de perturbações infecciosas. No entanto, outros estudos publicados anteriormente relacionados com doenças inflamatórias crónicas, com excepção das de natureza oral, parecem confirmar os nossos resultados. Numa metanálise que juntou 21 estudos, Zheng e colegas<sup>[29]</sup> identificaram uma protecção importante para a infecção crónica provocada pelo vírus da hepatite B associada aos genótipos do TNF- $\alpha$  -308A. Para além disso, numa população do norte da Índia, o alelo -308A TNF- $\alpha$  era menos prevalente nos doentes com artrite reumatoide (AR), comparando com o grupo controlo, o que sugere que este polimorfismo tem um papel protector na etiologia da AR<sup>[30]</sup>.

As enzimas da COX parecem estar envolvidas na patogénese da MO, nomeadamente na inflamação e agressões inflingidas na mucosa através da *up-regulation* das prostaglandinas (PG) pro-inflamatórias, onde se inclui a PGE2 e PGI2 em caso de mucosite induzida por QT<sup>[31,32]</sup>. Os polimorfismos de base única que ocorrem naturalmente no promotor da COX-2 podem ter um impacto significativo na actividade transcripcional do gene através da alteração

da capacidade de ligação a certas proteínas nucleares e, conseqüentemente, alterar a susceptibilidade para desenvolver diversas patologias de natureza inflamatória dois polimorfismos funcionais da COX-2, -765G>C e -1195A>G, e a predisposição genética para desenvolver a MO. Após a análise dos resultados observou-se que o genótipo -765GC estava sobre-representado nos indivíduos com CCR submetidos a QT (38% vs 19%), conferindo assim um risco acrescido, embora estatisticamente não significativo, para desenvolver a MO. Por outro lado, nos indivíduos com CCR e sem história prévia de MO, portadores do alelo -1195G, é notada apenas uma tendência para incrementar o risco de desenvolver a patologia. Nos únicos dois estudos publicados acerca da associação entre os polimorfismos da COX-2 e as patologias orais de origem inflamatória e realizados, respectivamente, numa população de taiwaneses e de chineses, observou-se que os portadores do alelo -765C apresentavam um risco diminuído para a periodontite agressiva e crónica, enquanto que nos indivíduos portadores do alelo -1195A foi notada uma associação positiva para a periodontite crónica severa<sup>[35,36]</sup>. Estes resultados divergem daqueles observados no nosso estudo, no entanto é necessário ter em conta que foram avaliadas doenças inflamatórias distintas e que as populações estudadas são diferentes do ponto de vista étnico. Parece-nos, portanto, que situações patológicas distintas podem alterar o impacto biológico dos polimorfismos -765G>C e -1195A>G da COX-2 no desenvolvimento de doenças inflamatórias.

Este é o primeiro estudo conhecido acerca do envolvimento de diversos polimorfismos dos genes que medeiam a resposta inflamatória no processo de evolução da MO nos indivíduos com CCR submetidos a QT. Na nossa população, a presença do alelo -308A do TNF- $\alpha$  está associada a um risco diminuído para desenvolver MO nos doentes com CCR submetidos a QT. A maior limitação identificada nesta pesquisa foi o número reduzido de casos, o que limitou a nossa capacidade para identificar uma associação que explicasse as tendências observadas em alguns polimorfismos, nomeadamente para a variante -1195A>G da COX-2. Poderão então ser desenvolvidos estudos ulteriores,

com amostras de maiores dimensões, de forma a perceber o verdadeiro significado destes polimorfismos na biopatologia da mucosite e, eventualmente, contribuir para uma melhoria da profilaxia e diagnóstico precoce da MO nos indivíduos com CCR submetidos a QT, levando à redução da sua incidência e gravidade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Boyle, P., Langman, J.S., ABC of Colorectal Cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000; 32:805-808.
- [2] Wolpin, B.M., Meyerhardt, J.A., et al., Adjuvant Treatment of Colorectal Cancer. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 2007; 57:168-85.
- [3] Costa, C., Magalhães, H., et al., O Câncer e a Qualidade de vida – A Quimioterapia e outros Fármacos no combate ao Câncer. 1ª Edição, Novartis Farma 2005. ISBN: 972-9119-94-5.
- [4] Fadda, G., Campus, G., et al., Risk factors for oral mucositis in paediatric oncology patients receiving alkylant chemotherapy. *BMC Oral Health* 2006; 6(13): <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/6/13>.
- [5] Pico, J.L., Avila-Garavito, A., et al., Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *The Oncologist* 1998; 3:446-451.
- [6] Köstler, W.J., Hejna, M., et al., Oral Mucositis Complicating Chemotherapy and/or Radiotherapy: Options for Prevention and Treatment. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(5):290-315.
- [7] Stone, R., Flidner, M.C., et al., Management of oral mucositis in patients with cancer. *European Journal of Oncology Nursing* 2005; 9 Suppl 1:24-32.
- [8] Cheng, K.K., Oral mucositis, dysfunction, and distress in patients undergoing cancer therapy. *Journal of Clinical Nursing* 2007; 16(11):2114-21.
- [9] Peterson, D.E., Cariello Anna, Mucosal Damage: A Major Risk Factor for Severe Complications After Cytotoxic Therapy. *Seminars in Oncology* 2004; 31(3):35-44.
- [10] Sonis, S.T., Elting, L.S., Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury: Pathogenesis, Measurement, Epidemiology, and Consequences for patients. *Cancer Supplement* 2004; 100(9):1995-2011.
- [11] Sonis, S.T., Pathobiology of Oral Mucositis: Novel insights and opportunities. *J Support Oncol* 2007; 5(9):3-11.
- [12] Zhang, X., Miao, X., et al., Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and their Association with risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology* 2005; 129:565-76.
- [13] Pereira, C.; Sousa, H.; Ferreira, P.; Fragoso, M.; Moreira-Dias, L.; Lopes C.; Medeiros, R.; Dinis-Ribeiro, M.; -765G>C COX-2 polymorphism may be a susceptibility marker for gastric adenocarcinoma in patients with atrophy or intestinal metaplasia. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 5473-5478.
- [14] Kristiansen, O.P.; Nolsøe, R.L.; Larsen, L.; Gjesing, A.M.; Johannesen, J.; Larsen, Z.M.; Lykkesfeldt, A.E.; Karlsen, A.E.; Pociot, F.; Mandrup-Poulsen, T.; Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12:1101-1110.
- [15] Whyte, M., Hubbard, R., et al., Increased risk of fibrosing alveolitis associated with Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms. *Am J RespCrit Care Med.* 2000; 162:755-58.
- [16] Szczeklik, W., Sanak, M., et al., Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765Cin bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004. 114(2):248-53.
- [17] Meyerhardt, J.A.; Catalano, P.J.; Haller, D.G.; Mayer, R.J.; Benson, A.B.; Macdonald, J.S.; Fuchs, C.S.; Influence of body mass index on outcomes and treatment-related toxicity in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2003; 98:484-495.
- [18] Meyerhardt, J.A.; Catalano, P.J.; Haller, D.G.; Mayer, R.J.; Macdonald, J.S.; Benson, A.B.; Fuchs, C.S.; Impact of diabetes mellitus on outcomes in patients with colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 433-440.
- [19] Sloan, J.A.; Loprinzi, C.L.; Novotny, P.J.; Okuno, S.; Nair, S.; Barton, D.L.; Sex Differences in Fluorouracil-Induced Stomatitis. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:412-420.
- [20] McCarthy, G.M.; Awde, J.D.; Ghandi, H.; Vincent, M.; Kocha, W.I.; Risk factors associated with mucositis in cancerpatients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol.* 1998; 34:484-490.
- [21] Vatay, A., Bene, L., et al., Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphisms and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 2003; 55:247-52.
- [22] Baran, W., Szepletowski, J.C., et al., A -308 promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene does not associate with the susceptibility to psoriasis vulgaris. No difference either between psoriasis type I and type II patients. *Acta DermatovenAPA* 2006; 15(3):113-118.
- [23] Hall, P.D.; Benko, H.; Hogan, K.R.; Stuart, R.K.; The influence of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukaemia. *Exp Hematol.* 1995; 23:1256-60.
- [24] Logan, R.M.; Stringer, A.M.; Bowen, J.M.; Gibson, R.J.; Sonis, S.T.; Keefe, D.M.; Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol. Ther.* 2008; 7:1139-1145.
- [25] Lima, V.; Brito, G.A.; Cunha, F.Q.; Reboucas, C.G.; Falcão, B.A.; Augusto, R.F.; Souza, M.L.; Leitão, B.T.; Ribeiro, R.A.; Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur. J. Oral. Sci.* 2005; 113:210-217.
- [26] Guimarães, A.L., Correia-Silva, J.F., et al., Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(3):268-72.
- [27] Galbraith, G.M., Hendley, T.M., et al., Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999; 26(11):705-9.
- [28] Shapira, L., Stabholz, A., et al., Genetic Polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001; 36(3):183-6.
- [29] Zheng, M.H.; Qiu, L.X.; Xin, Y.N.; Pan, H.F.; Shi, K.Q.; Chen, Y.P.; Tumor necrosis factor- $\alpha$ -308A allele may have a protective effect for chronic hepatitis B virus infection in Mongoloid populations. *Int. J. Infect. Dis.* 2008;12:562.
- [30] D. Gambhir D; Lawrence, A.; Aggarwal, A.; Misra, R.; Mandal, S.K.; Naik, S.; Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. *Rheumatol. Int.* 2009.
- [31] Lalla, R.V.; Pilbeam, C.C.; Walsh, S.J.; Sonis, S.T.; Keefe, D.M.; Peterson, D.E.; Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. *Support Care Cancer* 2009.
- [32] Lopes, N.N.; Plapler, H.; Chavantes, M.C.; Lalla, R.V.; Yoshimura, E.M.; Alves, M.T.; Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. *Support Care Cancer* 2009; 17:1409-1415.
- [33] Zhang, X.; Miao, X.; Tan, W.; Ning, B.; Liu, Z.; Hong, Y.; et al.; Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129:565-576.
- [34] Zhao, D.; Xu, D.; Zhang, X.; Wang, L.; Tan, W.; Guo, Y.; et al.; Interaction of cyclooxygenase-2 variants and smoking in pancreatic cancer: a possible role of nucleophosmin. *Gastroenterology* 2009; 136:1659-1668.
- [35] Ho, Y.P.; Lin, Y.C.; Yang, Y.H.; Ho, K.Y.; Wu, Y.M.; Tsai, C.C.; Cyclooxygenase-2 Gene-765 single nucleotide polymorphism as a protective factor against periodontitis in Taiwanese. *J Clin Periodontol.* 2008; 35.
- [36] Xie, C.J.; Xiao, L.M.; Fan, W.H.; Xuan, D.Y.; Zhang J.C.; Common single nucleotide polymorphisms in cyclooxygenase-2 and risk of severe chronic periodontitis in a Chinese population. *J. Clin. Periodontol.* 2009; 36:198-203.