# ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO GENE DO TNF-α COM MUCOSITE EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS COM RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA

**RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO DE 2024

# ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO GENE DO TNF-α COM MUCOSITE EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS COM RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA

**RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO**

"Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia"

Orientador: Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO DE 2024

**FICHA CATALOGRÁFICA**
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

V297 Varges Filho, Ronaldo Cavalieri.

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO GENE DO TNF-α COM MUCOSITE EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS COM RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA. / Ronaldo Cavalieri Varges Filho. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

72 f.
Bibliografia: 47 - 51.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.
Orientador: Milton Masahiko Kanashiro.
Coorientador: Álvaro Fabrício Lopes Rios.

1. Câncer de cabeça e pescoço. 2. Mucosite. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO GENE DO TNF-α COM MUCOSITE EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS COM RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA

"Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia"

Aprovada em 07 de março de 2024.

**Comissão Examinadora:**

_____

**Prof. Dr. Harley F. Oliveira – USP Ribeirão Preto**

_____

**Profa. Dra. Elena Lassounskaia – LBR/UENF**

_____

**Dra. Paula Magnelli Mangiavacchia - UENF**

_____

**Prof. Dr. Milton M. Kanashiro – LBR/UENF**
**(Orientador)**

_____

**Prof. Dr. Álvaro Fabrício L. Rios – LBT/UENF**
**(Co-orientador)**

**Dedicatória**

**À minha mulher, Bebel, que é diariamente, uma inspiração acadêmica, profissional e pessoal para mim.**

**Aos meus filhos, Maya, Clara e André, que tanto amo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Milton Kanashiro pelo seu apoio, orientação, paciência, generosidade e tantos ensinamentos ao longo dessa jornada.

Ao corpo diretivo do Grupo IMNE e OncoBeda – Centro Integrado de Oncologia, em nome do Dr. Herbert Neves, Dr. Diogo Neves e Dr. André Porto, pela confiança no meu trabalho, por disponibilizarem o serviço para realização desse estudo e por criarem uma cultura em que o paciente está no centro de tudo.

Ao meu colega de especialidade, Prof. Dr. Harley de Oliveira, pelas ideias e sugestões na concepção desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Drª Elena Lassounskaia e Prof. Drª. Paula M. Mangiavacchi pela disponibilidade em avaliar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro Rios pelo aprendizado proporcionado durante todo esse período.

À Prof. Dra. Thaís Louvain, por sua contribuição na realização da revisão sistemática.

À Rita Escocard e Mariana Mendonça, pela parceria, disponibilidade e ensinamentos na bancada.

À minha colega, parceira de trabalho, radio-oncologista, Andréia Carvalho, pelo auxílio na coleta dos dados clínicos dos nossos pacientes.

Às enfermeiras Gabriela Milagres e Marcelle Eyer, pelo apoio fundamental na coleta das amostras.

Às amigas de disciplinas, Ana Mafra e Daphne Dias, pelo companheirismo ao longo desses anos.

Ao meu pai, médico na essência da palavra, Ronaldo Cavalieri, por me ensinar a ser pai e por me ensinar tanta medicina, ética e postura profissional, além de outros ensinamentos que não se aprendem dentro da faculdade.

A minha mãe, Marília, por ser um exemplo de mulher, mãe, amiga e por ter me feito estudar desde sempre.

Ao meu irmão, Rafael Cavalieri, pela nossa forte amizade e por me inspirar com sua capacidade de trabalho.

À Tereza Mariano, por nos ajudar tanto. Seu apoio em todos esses anos foi fundamental para o início e realização dessa jornada.

À Lívia Barbosa, John Wilkinson e Fernando Holanda, por há tantos anos me inspirarem academicamente.

À minha mulher, Bebel, pela nossa família linda, pelo seu companheirismo, por me incentivar sempre, ser minha parceira em tudo, estar comigo em todas as horas, e por todo nosso amor.

Aos meus filhos, Maya, Clara e André, por me darem a oportunidade de sentir o amor de pai.

E por fim, mas não menos importante, aos nossos pacientes, que tanto nos ensinam diariamente.

***"Se toda a medicina não está na bondade, menos vale dela separada."***

**(Dr. Miguel Couto)**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Iniciação da mucosite por ação do CRT. Geração de radicais livres, ativação de fatores de transcrição e expressão das citocinas pró-inflamatórias. Extraído de SONIS et al., 2004. ..... 3

**Figura 2:** Fase de amplificação da mucosite, com *feedback* positivo do TNF gerando maior ativação do NF-kB (seta), causando aumento da liberação das citocinas. Extraído de SONIS et al., 2004. ..... 4

**Figura 3:** Fase ulcerativa da mucosite, podendo ocorrer colonização bacteriana, causando maior ativação dos macrófagos e liberação de citocinas. Extraído de SONIS et al., 2004. ..... 5

**Figura 4**: Distribuição da intensidade da mucosite ao longo das semanas de CRT nos 38 pacientes incluídos. ..... 17

**Figura 5:** Número de SNPs por pacientes no grupo com mucosite graus I e II ..... 19

**Figura 6:** Número de SNPS por pacientes no grupo com mucosite graus III e IV. .. 19

**Figura 7..... 21**

**Figura 8:** Plotagem bidimensional representando classificação segundo grau de mucosite utilizando modelo com mix de variáveis ..... 24

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1**: Graduação da mucosite de acordo com o RTOG. ..... 12

**Tabela 2**: Distribuição das variáveis clínicas dos pacientes incluídos. ..... 16

**Tabela 3**: Identificação dos SNPs presentes nos grupos de pacientes de acordo com graus de mucosite. Os SNPs grifados em verde estão presentes nos dois grupos. 18

**Tabela 4**: Identificação dos SNPs por paciente no grupo com mucosite graus I e II.20

**Tabela 5**: Identificação dos SNPs por paciente no grupo com mucosite graus III e IV. ..... 20

**Tabela 6:** Análise descritiva das características clínicas associadas ao grau da mucosite. ..... 22

**Tabela 7**: Análise discriminante canônica relacionando os grupos de variáveis discriminantes e graus de mucosite. ..... 23

## LISTA DE ABREVIATURAS

**3DCRT**: Radioterapia conformacional em 3 dimensões

**CCP:** Câncer de cabeça e pescoço

**CRT**: Tratamento combinado com radioterapia e quimioterapia

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**FDA:** Food and Drug Administration

**IL-1β:** Interleucina-1β

**IL-6:** Interleucina-6

**IMRT:** Radioterapia com intensidade modulada

**MLC:** Colimação de múltiplas lâminas

**NF-kB:** Fator nuclear kappa-B

**OM**: Mucosite oral

**PRISMA:** Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis

**PS:** Performance status

**QT:** Quimioterapia

**RNA:** Ácido ribonucleico

**ROS**: Reactive oxygen species

**RT:** Radioterapia

**RTOG:** Radiation Therapy Oncology Group

**SNPs:** Polimorfismos de nucleotídeo único

**TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido

**TNFR1:** Receptor do TNF-α

**TNF-α:** Fator ne necrose tumoral α

**TNM**: Estadiamento tumoral – Tamanho, Linfonodos, Metástase

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO ..... 1**

**2. OBJETIVOS ..... 8**

2.1. OBJETIVO GERAL ..... 8

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 8

**3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 9**

3.1. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA ..... 9

3.1.1. Critérios de elegibilidade ..... 9

3.1.2. Fontes de informação e estratégias de pesquisa ..... 9

3.1.3. Seleção dos estudos e processo de recolha de dados ..... 10

3.1.4. Risco de viés e avaliação da qualidade dos estudos ..... 10

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA INCLUÍDA NA COORTE ..... 10

3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO ..... 11

3.4. RADIOTERAPIA ..... 11

3.5. QUIMIOTERAPIA ..... 11

3.6. AVALIAÇÃO DA MUCOSITE ..... 12

3.7. ETAPA LABORATORIAL ..... 12

3.7.1. Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA ..... 12

3.7.2. Extração do DNA e quantificação ..... 13

3.7.3. Desenho dos primers e amplificação da região englobando o gene TNF-α por reação em cadeia de polimerase (PCR) ..... 13

3.7.4. Identificação das variantes genéticas associadas ao locus TNF-α em pacientes com mucosite grau I-IV utilizando o software VarScan.v2.4.2 ..... 14

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 14

**4. RESULTADOS ..... 16**

4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA ..... 16

4.2. PERFIL CLÍNICO E MOLECULAR DA COORTE ..... 16

**5. DISCUSSÃO ..... 25**

**6. CONCLUSÕES ..... 31**

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: ..... 32**

**ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..... 37**

**ANEXO 2: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP ..... 40**

**ANEXO 3: PUBLICAÇÃO DO ARTIGO INTITULADO "SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AS BIOMARKER PREDICTORS OF ORAL MUCOSITIS SEVERITY IN HEAD AND NECK CANCER PATIENTS SUBMITTED TO COMBINED RADIATION THERAPY AND CHEMOTHERAPY: A SYSTEMATIC REVIEW". ..... 43**

## RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) tem como uma das principais modalidades de tratamento a radioterapia (RT) combinada a quimioterapia (QT). O tratamento combinado com quimioterapia e radioterapia (CRT) está associado à mucosite. Estudos recentes introduziram o conceito de que a injúria da mucosa é um processo multifatorial, envolvendo a expressão genética de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem alterar a síntese de proteínas, a função celular e aumentar o risco do paciente em relação à toxicidade associada ao tratamento. O presente estudo objetivou realizar uma revisão sistemática da literatura, identificando publicações que avaliaram SNPs em genes que codificam proteínas de diferentes vias de sinalização celular, e analisar a associação entre SNPS no gene do receptor do fator de necrose tumoral α (TNF-α) e mucosite em pacientes com CCP submetidos à CRT. Para o estudo da associação entre SNPs e mucosite, foi realizada análise molecular em DNA de amostras de sangue periférico de toda e extensão do gene do TNF-α em uma coorte, incluindo 38 pacientes com CCP submetidos à CRT. Após revisão sistemática da literatura, foram selecionados 23 estudos. Três publicações avaliaram SNPs em vias relacionadas ao TNF-α. Dos pacientes incluídos na coorte, 27 amostras foram estudadas de maneira completa. Foram identificados 18 SNPs distintos. No grupo de pacientes com mucosite grau I / II, 56,5% apresentaram SNPs. No grupo com mucosite III / IV, 54,5% apresentaram SNPS. O SNP rs769177 foi o polimorfismo mais encontrado. Análise discriminante canônica agrupando todas as variáveis mostrou uma relação significativa entre os SNPs rs905841621, rs3093665, rs9282875, rs3093547 e o grupo de doentes com mucosite de grau III e IV (p 0,006). Na população estudada, foram identificados novos SNPs com potencial relevância para a mucosite de alto grau. São necessários mais estudos que avaliem os SNP nas vias das citocinas pró-inflamatórias para estabelecer o seu potencial papel como biomarcadores no CCP.



**Palavras-chave:** Câncer de cabeça e pescoço, mucosite, polimorfismo de nucleotídeo único.

## ABSTRACT

Head and neck cancer (HNC) has as one of its main treatment modalities the combination of radiotherapy (RT) and chemotherapy (CT). Combined treatment with chemotherapy and radiotherapy (CRT) is associated with mucositis. Recent studies have introduced the concept that mucosal injury is a multifactorial process, involving the genetic expression of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis fator (TNF-α). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) can alter protein synthesis, cellular function, and increase the patient's risk of treatment-associated toxicity. This study aimed to conduct a systematic literature review, identifying publications that evaluated SNPs in genes encoding proteins from different cellular signaling pathways, and to analyze the association between SNPs in the TNF-α gene and mucositis in HNC patients undergoing CRT. The review was conducted following the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis) guidelines. For the study of the association between SNPs and mucositis, molecular analysis was performed on DNA from peripheral blood samples covering the entire TNF-αR gene in a cohort, including 38 HNC patients undergoing CRT. After a systematic literature review, 23 studies were selected. Three publications evaluated SNPs in pathways related to TNF-α. Of the patients included in the cohort, 27 samples were studied thoroughly, identifying 18 distinct SNPs. In the group of patients with grade I/II mucositis, 56.5% presented SNPs. In the group with grade III/IV mucositis, 54.5% presented SNPs. The rs769177 SNP was the most commonly found polymorphism. Canonical discriminant analysis grouping all the variables showed a significant relationship between the SNPs rs905841621, rs3093665, rs9282875, rs3093547 and the group of patients with grade III and IV mucositis (p 0.006). In the studied population, novel SNPs with potential relevance to high-grade mucositis were identified. Further studies evaluating SNPs in pro-inflammatory cytokine pathways are necessary to establish their potential role as biomarkers in HNC.



**Keywords:** Head and neck cancer, mucositis, single nucleotide polymorphism.

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) representa um grupo heterogêneo de doenças localizadas em determinada região anatômica, que contém estruturas delicadas, com íntima relação entre elas e envolvidas em funções críticas como alimentação e respiração. A história natural da doença e os efeitos adversos da terapia podem interferir diretamente na aparência, expressão verbal e interação social dos pacientes. Tem origem nos tecidos epiteliais ou glandulares que recobrem o trato aerodigestivo, envolvendo a cavidade oral, faringe, cavidade nasal, laringe, tireoide e as glândulas salivares (MODY, M. et al., 2021). O CCP representa o sétimo câncer mais comum no mundo, ocorrendo mais de 550 mil casos novos e 380 mil mortes anualmente (SUNG et al., 2021, FITZMAURICE et al., 2017). Estima-se que até 2030 a incidência global aumente em aproximadamente 34% (SUNG et al., 2021, FERLAY et al., 2014).

Até o início da década de 1990, o tratamento local curativo dos pacientes com CCP era baseado principalmente em cirurgia com ou sem radioterapia (RT) pós-operatória. Pacientes com doença irressecável na apresentação eram candidatos à RT exclusiva, mas apresentaram resultados decepcionantes, mesmo com diferentes estratégias de fracionamento (ADELSTEIN et al., 2003). Em 1991, o grupo Veterans Affairs divulgou um estudo que se destacou no tratamento desses tumores. Neste estudo, 332 pacientes com câncer de laringe foram randomizados para receber o tratamento cirúrgico convencional ou uma abordagem combinada, envolvendo RT e QT baseada em platina, com o intuito de preservar o órgão. A laringe foi mantida em 64% dos casos no grupo submetido ao tratamento conservador não cirúrgico, sem comprometer a sobrevida global (WOLF et al., 1991). Outros estudos incluindo CCP em diferentes sítios confirmaram os resultados positivos do tratamento conservador do órgão (PIGNON et al., 2009). O tratamento combinado se consolidou e atualmente constitui opção de escolha para muitos pacientes com doença ressecável. No entanto, o tratamento concomitante com QT alterou e intensificou os padrões de toxicidade já conhecidos da RT (ANDERSON el., 2021).

Um desses efeitos ocorre por alterações na superfície mucosa da cavidade oral e da faringe, caracterizadas por ulceração e formação de pseudomembranas, que são resultado da resposta inflamatória como consequência ao tratamento com RT e/ou QT, condição definida como mucosite (SINGH et al., 2020).

A mucosite é uma complicação aguda, frequente, e, ocorre em diferentes graus, invariavelmente em todos os pacientes que recebem altas doses de radioterapia. A incidência varia de acordo com o regime de RT, o volume de tratamento, as drogas utilizadas, e se o tratamento é concomitante ou sequencial à QT (ELTING et al., 2007). O quadro se torna evidente já entre a segunda e terceira semana do curso da RT. A piora da qualidade de vida está relacionada com o grau de severidade da mucosite (ARMSTRONG et al., 2006). O paciente pode evoluir, em diferentes intensidades, com disfagia, odinofagia, desidratação, perda de peso, sendo necessária frequentemente a interrupção temporária da RT ou diminuição da dose de QT, interferindo nos resultados, aumentando a frequência, duração e custos devido a internação hospitalar (ELTING et al., 2007).

A interrupção da CRT e o prolongamento do tempo total de tratamento estão associados a um aumento do risco de progressão locorregional em até 8 vezes, em comparação com o grupo que completou o tratamento no tempo esperado (PLATEK et al., 2012).

Mucosite severa associada com infecção também está relacionada com diminuição de sobrevida (FANNING et al., 2006), aumentando a necessidade de antibioticoterapia (NOMURA et al., 2013). A QT concomitante com taxanos, fluoracil e agentes baseados em platina, comuns no tratamento combinado, antecipa o início, aumenta a severidade e prolonga a duração do quadro (NGUYEN-TAN et al., 2014).

Classicamente a mucosite era descrita exclusivamente como efeito local da radiação sobre as células da camada basal, interferindo em sua multiplicação e na substituição das células superficiais da mucosa, ficando o epitélio subjacente mais suscetível à inflamação. Mucosite induzida por RT era reconhecida como um processo "de fora para dentro", com a quebra do DNA das células do epitélio basal. Quando induzida pela QT era atribuída principalmente pela permeação da droga pelas células basais através da circulação subjacente da submucosa. No entanto, devido à complexidade e início do entendimento e descrição de processos biológicos complexos e dinâmicos relacionados à patogênese desse efeito adverso, observa-se cada vez mais dados relatando a influência de fatores sistêmicos associados (PETERSON et al. 2012; VILLA et al. 2015).

O conceito de que a injuria à mucosa é um processo biológico e multifatorial, é relativamente novo. Em 2004, foi publicado estudo descrevendo aspectos do desenvolvimento da mucosite, como um processo dinâmico dividido em estágios

(SONIS et al., 2004). A primeira etapa da patogênese é a iniciação, que ocorre imediatamente após início do tratamento, muito antes de qualquer manifestação clínica de mucosite. Injúria direta das células da camada basal e da submucosa resulta da quebra das cadeias de DNA pela QT e/ou RT. Simultaneamente são produzidas, em resposta a terapia, espécies reativas do oxigênio (ROS; do inglês: *reactive oxygen species*) no interior das células lesadas em uma taxa que supera a capacidade de reparo (SONIS et al., 2004).

ROS lesam membranas celulares e tecidos conectivos, liberando no microambiente moléculas associadas ao dano (*DAMPS – damage associated molecular patterns*), estimulando macrófagos, se ligando a receptores específicos e dando início a eventos biológicos que ativam a resposta inflamatória, iniciando a segunda etapa. ROS podem ativar diferentes vias biológicas, incluindo o fator nuclear kappa-B (NF-kB) (BOWEN et al., 2008). Esse fator de transcrição, que pode ser também ativado diretamente pela RT e/ou QT, induz a expressão genética de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1β (IL-1β), e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) (Figura 01). A ativação dessas citocinas pró-inflamatórias parece ter importante papel no desenvolvimento da mucosite (BOSSI et al., 2016).

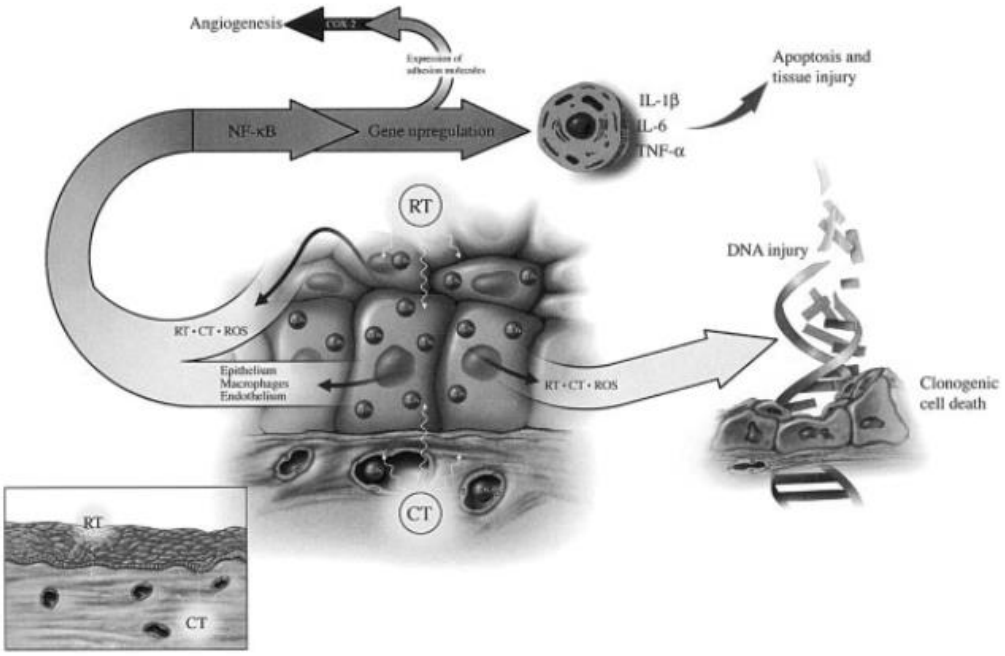



**Figura 1: Iniciação da mucosite por ação do CRT. Geração de radicais livres, ativação de fatores de transcrição e expressão das citocinas pró-inflamatórias. Extraído de SONIS et al., 2004.**

Algumas moléculas produzidas nesse momento têm capacidade de influenciar a resposta tecidual local de diferentes maneiras. O TNF-α pode se envolver em um mecanismo de *feedback* positivo com o NF-kB, aumentando sua concentração, produzindo em última análise uma liberação maciça de citocinas (*storm* de citocinas pró-inflamatórias), etapa definida como amplificação (Figura 02) (RUSSI et al., 2014).

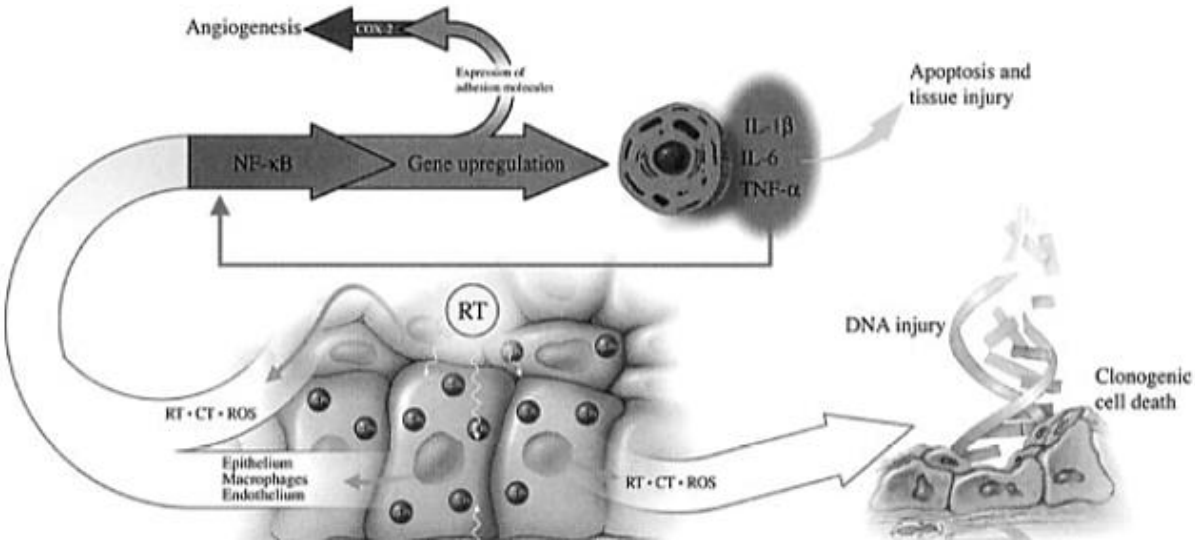



**Figura 2: Fase de amplificação da mucosite, com *feedback* positivo do TNF gerando maior ativação do NF-kB (seta), causando aumento da liberação das citocinas. Extraído de SONIS et al., 2004.**

A quarta etapa é a mais significativa para os pacientes, pois nessa fase ocorre o desenvolvimento de sinais e sintomas relacionados ao quadro, como úlceras. Nesse momento o paciente está mais suscetível a infecções, que podem prolongar a mucosite, na medida em que a ativação dos macrófagos pode liberar mais citocinas inflamatórias (Figura 03) (SONIS et al., 2004).

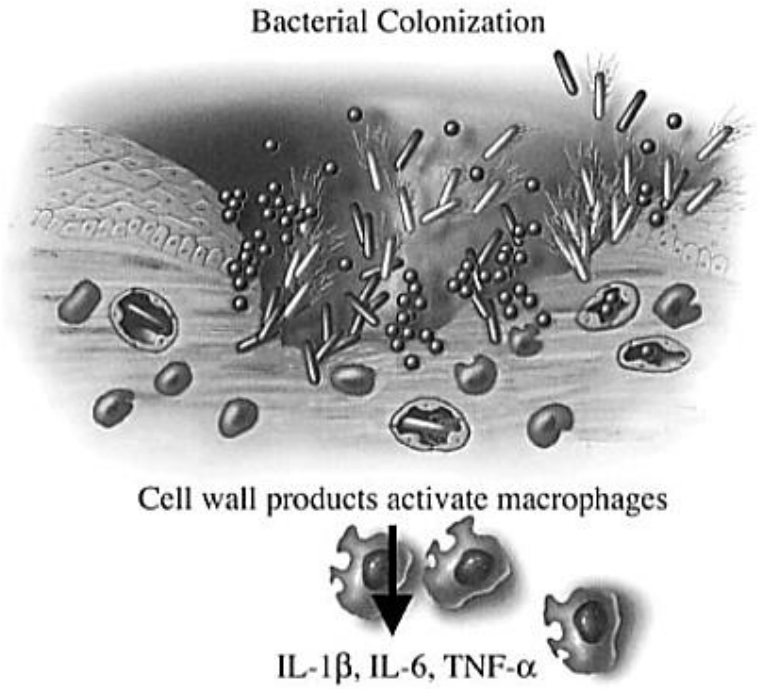



**Figura 3: Fase ulcerativa da mucosite, podendo ocorrer colonização bacteriana, causando maior ativação dos macrófagos e liberação de citocinas. Extraído de SONIS et al., 2004.**

Estudos prévios relataram a possível associação entre o aumento na concentração de determinadas citocinas e o desenvolvimento da mucosite (SONIS et al 2007; BOSSI et al., 2016). No entanto, a capacidade de predizer quais pacientes vão apresentar mucosite relacionada a RT com ou sem QT, e assim personalizar a abordagem terapêutica, se mostrou limitada, na medida em que as diferenças nos níveis de citocinas pró-inflamatórias não estavam presentes em fases basais do tratamento, entre os pacientes que evoluíram com diferentes graus da toxicidade, além de metodologias distintas como coleta de material biológico no soro ou em saliva. Sendo assim, além da compreensão das etapas envolvidas na mucosite em nível proteico com a avaliação das variações das citocinas ao longo do tratamento, análises de polimorfismos genéticos que possam estar relacionados com radiosensibilidade, influenciando tanto a resposta tumoral à RT como o desenvolvimento de toxicidades radio-induzidas, começaram a ser estudados (NORMANDO et al., 2017).

Os polimorfismos genéticos são alterações na sequência de pares de bases do DNA e podem manifestar-se de diferentes formas. Embora a maioria destas alterações seja funcionalmente neutra, o polimorfismo pode estar relacionado à regulação da expressão do gene ou à função da proteína codificada, ocasionando diferentes comportamentos biológicos e influenciando a susceptibilidade a doenças

(YE, 2000). O tipo mais comum de polimorfismo é o que envolve um único nucleotídeo, chamado de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*), onde ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro, ocorrendo a troca de um único par de bases, podendo ainda assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene (TAKASHIBA et al., 2006).

Os polimorfismos estão dispersos por todo o genoma e ocorrem em regiões codificadoras e não codificadoras. Nos polimorfismos de regiões codificadoras, denominados não-sinônimos, pode ocorrer uma substituição de um aminoácido na sequência proteica, podendo levar a modificações estruturais e funcionais na proteína e um potencial efeito biológico (IKUTA et al., 2015). Alguns polimorfismos de regiões não codificadoras, classificados como sinônimos, podem modificar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro. Outro tipo de polimorfismo também importante é aquele localizado em regiões promotoras, pois é capaz de alterar a expressão do gene (CHASMAN et al., 2001). Se a função das proteínas for afetada em um processo biológico, o polimorfismo de alguns genes pode aumentar ou diminuir o risco do paciente à expressão fenotípica da doença/alteração (KINANE et al., 2003).

Atualmente existem dados relacionando variações genéticas em pacientes com CCP com toxicidades agudas em tecidos normais, como a mucosite. No entanto, grande parte desses estudos focou em SNPs em vias relacionadas à genes de reparo de dano do DNA (CAVALIERI et al., 2024). Poucas publicações têm avaliado polimorfismos em vias relacionadas às citocinas inflamatórias. Até o momento, apenas um grupo estudou, em população polonesa, SNPs na via do TNF-α e sua relação com mucosite. Essa análise ocorreu em uma região limitada da proteína do TNFR1 (MLAK R et al., 2020). O estudo molecular, através do sequenciamento de todo o gene do TNF-α, e sua possível relação com mucosite ainda não foi realizado.

A possível identificação precoce através da análise de aspectos moleculares de pacientes que têm maior chance de desenvolvimento da mucosite, bem como da intensidade da mesma, representa a chance de uma nova abordagem em relação a essa complicação tão frequente. O conhecimento das etapas prévias ao quadro clínico instalado, da relação de SNPs em genes relacionados às vias biológicas, do padrão de variação das citocinas, tem potencial de permitir que novos tratamentos alvo sejam desenvolvidos para atuar em momentos mais precoces. Moléculas ou vias, que antes não se tinha conhecimento, podem ser inibidas, abrindo a possibilidade de novas terapias mais personalizadas, além da implementação precoce de medidas como

suporte nutricional, medicações. Abordagens preventivas podem ser aplicadas de diferentes maneiras de acordo com o conhecimento prévio se determinado paciente tem maior chance de desenvolver um efeito adverso grave ou não. Mais estudos são necessários, com um maior número de pacientes, para identificar marcadores biológicos e se essas alterações inflamatórias precoces vão se traduzir em repercussões sistêmicas, abrindo novas frentes na abordagem dessa condição.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre polimorfismos no gene do TNF-α e mucosite em pacientes com CCP submetidos à tratamento combinado com CRT.
Analisar através de uma revisão sistemática da literatura a relação entre SNPs em diferentes vias biológicas, como preditores de mucosite.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática sobre SNPs em genes responsáveis pela codificação de proteínas em diversas vias de sinalização celular, e o desenvolvimento de mucosite em pacientes com CCP submetidos à CRT.

- Identificar o perfil molecular de uma coorte de 38 pacientes com CCP submetidos à CRT, abrangendo toda a extensão do gene do TNF-α.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

A revisão sistemática foi efetuada de acordo com a lista de verificação PRISMA (LIBERATI A. et al, 2009).

### 3.1.1. Critérios de elegibilidade

Foram incluídos artigos que abordavam a relação entre SNPs em diferentes vias biológicas como biomarcadores da gravidade da mucosite oral em pacientes com CCP submetidos à RT ou CRT, com intenção curativa, podendo ser utilizada como tratamento primário ou pós-operatório.

Critérios de exclusão dos artigos: Avaliação de pacientes com outros tipos de câncer; tratamento de CCP sem CRT; correlação inexistente de SNP com mucosite; revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de conferências; associação entre biomarcadores e mucosite em estudos experimentais (ensaios clínicos, estudos in vitro ou in vivo em animais); e restrições linguísticas.

### 3.1.2. Fontes de informação e estratégias de pesquisa

Foi efetuada uma pesquisa nas principais bases de dados utilizadas como instrumentos de pesquisa - Pubmed, LILACS, Science Direct e Cochrane. Foi também efetuada uma pesquisa no Google Scholar, com o objetivo de detectar publicações adicionais. As estratégias de pesquisa incluíram a utilização dos seguintes termos: *"head and neck cancer OR head and neck carcinoma" AND "radiation therapy OR radiotherapy OR chemotherapy OR chemoradiaton" AND "mucositis OR oral mucositis" AND "single nucleotide polymorphisms OR SNPs OR SNP OR gene polymorphism".*

Artigos publicados entre janeiro de 2009 e setembro de 2022 foram incluídos na análise. Todos os artigos duplicados foram removidos. Além disso, as referências dos artigos incluídos foram revistas para identificar publicações que não foram identificadas no processo de pesquisa.

### 3.1.3. Seleção dos estudos e processo de recolha de dados

Na primeira fase, os artigos foram listados nas bases de dados e todos os títulos e resumos foram revistos por dois autores independentes, que fizeram a seleção primária. A segunda fase consistiu na leitura do texto completo e na recuperação daqueles que atendiam aos critérios de inclusão. Essa etapa também foi realizada pelos mesmos dois autores. Em caso de discordância, um terceiro autor decidiu se a referência deveria ou não ser incluída.

Para todos os artigos incluídos, foram registadas as seguintes informações: autores, ano de publicação, país, número de doentes, dose de RT, modalidades de tratamento, vias dos polimorfismos estudados, tipo de estudo e principais conclusões.

### 3.1.4. Risco de viés e avaliação da qualidade dos estudos

A qualidade e as possíveis fontes de enviesamento dos estudos selecionados foram avaliadas utilizando a ferramenta Newcastle Ottawa Scale (NOS), específica para estudos observacionais (LUCHINI et al., 2017). Foram avaliados três parâmetros de qualidade (seleção, comparabilidade e resultados), divididos em oito itens específicos. Cada item da escala foi pontuado com um ponto, exceto a comparabilidade, que pode ser pontuada com dois pontos. O máximo para cada estudo é nove, e referências com menos de cinco pontos são identificadas como representando um risco considerável de viés (LUCHINI et al., 2017).

## 3.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA INCLUÍDA NA COORTE

A coorte foi composta por pacientes tratados com RT e QT no OncoBeda - Centro Integrado de Oncologia. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), pelos pacientes ou por seus responsáveis foram obtidas informações como etnia, gênero, perfil de toxicidade, a partir de dados do prontuário (Anexo 1).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos/Fundação Benedito Pereira Nunes, parecer 5.398.103 (Anexo 2).

## 3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram elegíveis para o presente estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço específicos da cavidade oral, orofaringe, laringe supra-glótica e nasofaringe, estágios II, III e IV, com indicação de tratamento combinado com RT e QT, com intenção radical ou pós-operatória, Karnofsky Performance Status ≥ 70% (CROOKS et al., 1991), idade maior que 18 anos.

Não foram incluídos pacientes candidatos a RT exclusiva, ou que tivessem recebido RT ou QT previamente, ou aqueles que apresentassem mucosite previamente ao início do tratamento.

## 3.4. RADIOTERAPIA

A RT foi administrada com intenção radical, em acelerador linear CLINAC CX, com fótons de 6 MV, equipado com sistema de colimação de múltiplas lâminas (MLC), habilitado para realização de RT conformacional em 3 dimensões (3DCRT) e/ou RT com intensidade modulada (IMRT). Foram utilizadas para imobilização dos pacientes, máscaras termoplásticas próprias para IMRT e 3DCRT, indexadas à mesa de tratamento, além de retrator de ombros. As doses prescritas variaram entre 54 e 70 Gy. Pacientes em que a RT foi administrada como tratamento primário, receberam entre 66 e 70 Gy (1.8 – 2.2 Gy/dia) no volume tumoral primário e linfonodos acometidos. Nos pacientes operados, quando a RT foi utilizada no pós-operatório, o leito cirúrgico do tumor primário recebeu entre 60 e 66 Gy (1.8 – 2.0 Gy/dia). As cadeias de drenagem receberam, nos dois cenários entre 54 e 59.4 Gy (1.64 – 1.8 Gy/dia).

## 3.5. QUIMIOTERAPIA

A escolha da terapia sistêmica foi individualizada e baseada em características do paciente como performance status (PS) e objetivos do tratamento. Para pacientes com bom PS, QT baseada em cisplatina concomitante a RT, foi o esquema preferencial. Esquemas de QT de indução seguidos de RT e QT concomitantes também foram permitidos.

## 3.6. AVALIAÇÃO DA MUCOSITE

A mucosite foi avaliada através da aplicação da escala de graduação do *Radiotherapy Oncology Group* (RTOG) (COX et al., 1995), conforme apresentado na tabela 01. A avaliação foi feita semanalmente pelo rádio-oncologista.

**Tabela 1: Graduação da mucosite de acordo com o RTOG.**

| Grau 1: Dor, com ou sem eritema | Grau 2: Eritema, úlceras; paciente consegue engolir sólidos | Grau 3: Úlceras com eritema extenso; paciente não consegue engolir comida | Grau 4: Mucosite de tal grau que alimentação é impossível |
|---|---|---|---|
| | | | |

## 3.7. ETAPA LABORATORIAL

### 3.7.1. Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA

Amostras de sangue dos pacientes incluídos foram coletas em 4 tubos contendo citrato como anticoagulante, totalizando aproximadamente 10ml de sangue, pela equipe de enfermagem do Centro Integrado de Oncologia do Hospital OncoBeda. Os tubos de cada paciente foram homogeneizados e o sangue transferido para um único tubo de centrifugação. Então, o sangue foi centrifugado a 1200*g* por 10 minutos em temperatura ambiente. Com auxílio de pipeta Pasteur, a nuvem de leucócitos (*buffy coat)* foi coletada, transferida para outro tubo e tratada com tampão de lise de hemácias (cloreto de amônio NH4Cl 0,155M; bicarbonato de amônia NH4CO3 0,01M; EDTA 0,1M, pH 7.4) na proporção 1:1. Os tubos foram incubados em banho de gelo por 15 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200*g* em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado, foi adicionado 1ml de tampão de lise, homogeneizado por pipetagem e centrifugado nas mesmas condições, para lavagem dos leucócitos. A etapa de lavagem foi repetida três vezes. No final, o

sedimento celular foi ressuspendido em 150ul de solução estabilizadora de RNA (RNAlater, Invitrogen, #AM7024), transferido para criotubo e congelado em -80ºC.

3.7.2. Extração do DNA e quantificação

O DNA foi extraído a partir dos leucócitos estabilizados em RNAlater. Para isso, foi realizado o protocolo convencional de extração de DNA com solução de proteinase K (280ul de água ultrapura; 80ul de tampão de proteinase K contendo NaCl 0,375M e EDTA 0,12M; 10ul de SDS 20%; 8ul de proteinase K 25mg/ml). O volume total foi incubado a 55ºC *overnight*. Após a incubação foram adicionados 120ul de NaCl 5M, agitou-se por 8 segundos em vortex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000*g* e 400ul do sobrenadante foi transferido para microtubo. Foi adicionado 1ml de etanol absoluto gelado, os microtubos foram invertidos 3 vezes e colocados em freezer -80ºC por 15 minutos. Em seguida foi realizada lavagem do DNA com etanol 70% gelado, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000*g*, o excesso de sobrenadante foi cuidadosamente retirado por inversão e o material foi deixado para secagem em papel absorvente. O precipitado de DNA foi ressuspendido em 30ul de água ultrapura e armazenado a -20ºC. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, sendo considerado ideal o rendimento de 100 a 150ng de DNA por microlitro de amostra.

3.7.3. Desenho dos primers e amplificação da região englobando o gene TNF-α por reação em cadeia de polimerase (PCR)

A sequência utilizada para a construção dos primers foi obtida do genoma de referência humano (GRChg37/hg19) do UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/), correspondendo a uma região de 6150pb (chr6: 31541746-31547895) englobando todo o promotor do gene e corpo gênico do TNF-α, além de uma região *dowstream* e parte do gene LTA. Essa região foi escolhida para englobar todos os polimorfismos já descritos no gene estudado.

Foram realizadas PCR para amplificação dos fragmentos de interesse, através da reação com volume final de 20 µL, [4,0 µL de 5 x Buffer; 0,5 µM de cada primer (TNF-α_Forward 5’- CTAGGTGGGGCCTAGATCCACA - 3; TNF-α_Reverse 5’-

CTGAAGGCCTCTCTGTCTCCTA - 3'); 100 mM de dNTP; 0,2 µL da Taq Phusion (Uniscience); 2,0 µL de DNA-alvo; água ultrapura para completar 20 µL]. As condições da PCR foram: 98ºC por 2 minutos; 35 ciclos de 98ºC por 10 segundos; Tm °C (temperatura de anelamento) por 15 segundos, 72ºC por 4 minutos; e extensão final de 72°C por 10 minutos. Por fim, os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% marcados com fluoróforo Unisafe (Uniscience).

3.7.4. Identificação das variantes genéticas associadas ao locus TNF-α em pacientes com mucosite grau I-IV utilizando o software VarScan.v2.4.2

Os arquivos no formato sorted.bam foram agrupados e convertidos em arquivo formato result_file.mpileup para dois grupos distintos de pacientes, os pacientes com mucosite I-II e os pacientes com mucosite III-IV utilizando o software samtools (parâmetros: mpileup -B -f pathway/to/genome/hg19.fa *sorted.bam > result_file.pileup). Os arquivos .mpileup dos grupos mucosite I-II e mucosite III-IV foram utilizados para a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único entre os grupos utilizando o software VarScan.v2.4.2 (parâmetros: java -jar /home/alvaro/varscan/VarScan.v2.4.2.jar mpileup2snp mcr_grau_I_II.mpileup mcr_grau_III_IV.mpileup --p-value 0.01 1 --output-vcf > mc_snp_total.vcf) resultando em um arquivo no formato .vcf (variant call format). Os resultados encontrados foram visualizados utilizando a ferramenta Integrative Genomics Viewer – IGV (https://igv.org/doc/desktop/).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise considerou em duas etapas, primeiro, uma análise descritiva simples (frequência) das características clínicas associadas ao grau da mucosite. Na segunda etapa, para diferenciar os grupos segundo o grau de mucosite utilizou-se uma técnica de aprendizado de máquina (*machine learning*) não supervisionada, a análise discriminante canônica ($A_{DC}$). Para esta foi utilizado modelo multivariado que considera a inclusão de todas as variáveis que são importantes no fenómeno, no caso o método stepwise. A classificação dos grupos segundo grau de mucosite foi dada para 4 grupamentos de variáveis, assim: **I.** genéticas (SNPs,) **II.** Clínicas, **III**. Epidemiológicas e **IV.** Mix de variáveis, que considerou características de cada

grupamento. A homogeneidade de matrizes de covariância multivariada foi avaliada através do estatístico M de Box (P>0,05). A significância da função foi determinada através do estatístico de Lambda de Wilks, considerando valores probabilidade menores a 5% (P<0,05). Para todos os grupamentos duas funções discriminantes canônicas foram obtidas. A identificação das principais características discriminantes entre graus de mucosite foi dada pelo maior valor do coeficiente estrutural não padronizado da função canônica.

# 4. RESULTADOS

## 4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA

Os resultados da revisão sistemática estão disponíveis no artigo intitulado "Single Nucleotide Polymorphisms as Biomarker Predictors of Oral Mucositis Severity in Head and Neck Cancer Patients Submitted to Combined Radiation Therapy and Chemotherapy: A Systematic Review", publicado na revista Cancers, o qual está disponível no Anexo 3.

## 4.2. PERFIL CLÍNICO E MOLECULAR DA COORTE

No estudo, foram incluídos 38 pacientes com CCP tratados no OncoBeda - Centro Integrado de Oncologia. Todos receberam tratamento combinado com RT e QT. A idade média foi de 60 anos (variando de 34 a 79 anos) e 81,6% eram do sexo masculino e 18.4% do sexo feminino. O sítio do tumor primário mais comum foi a orofaringe (63,1%), seguido da cavidade oral (23.6%), tumores primários ocultos (10,5%). De acordo com a 8th edição da classificação dos tumores malignos TNM (BRIERLEY et. al), 10,5% dos pacientes eram estágio II, 50% dos pacientes eram estágio III, 39.5% estágio IV. Carcinoma epidermoide foi o único tipo histológico presente no grupo, sendo que o grau de diferenciação mais prevalente foi o grau II. Em relação a dose de RT 86,8% receberam 70 Gy e 13,2% entre 60 e 66 Gy. IMRT foi a técnica mais utilizada, em 89,5% dos pacientes. Quimioterapia baseada em cisplatina foi administrada em todos os pacientes. Todos foram tratados com intenção curativa (Tabela 2).

**Tabela 2: Distribuição das variáveis clínicas dos pacientes incluídos**

| Variável | N = 38 (%) |
|---|---|
| Idade | 60 anos (34 – 79) |
| Sexo | Masculino: 81,6<br>Feminino: 18,4 |
| Sítio Tumor 1o | Orofaringe: 63.1<br>Cavidade Oral: 23.6<br>Nasofaringe: 2.6<br>Primário Oculto: 10.5 |

**Continuação: Tabela 3: Distribuição das variáveis clínicas dos pacientes incluídos**

| | |
|---|---|
| Estadiamento | II: 10,5<br>III: 50<br>IV: 39,5 |
| Tipo Histológico | CEC: 100 |
| Grau de diferenciação | I: 2,6<br>II: 68,4<br>III: 28,9 |
| Dose de Radioterapia | 60 – 66 Gy: 13,2<br>70 Gy: 86,8 |
| Técnica | IMRT: 89,5<br>3DCRT: 10,5 |

Ao final da segunda semana, 86,8% dos indivíduos apresentavam algum grau de mucosite, no entanto nenhum paciente com mucosite grau III. Como esperado, devido ao caráter cumulativo da dose de RT, observou-se aumento da intensidade da mucosite ao longo das semanas de CRT. A primeira classificação de mucosite grau III, ocorreu durante a terceira semana, mas somente em um paciente. Ao final da 7ª semana, 34,2% evoluíram pelo menos em algum momento com a classificação de mucosite grau III. Nenhum paciente apresentou mucosite grau IV (Figura 04).

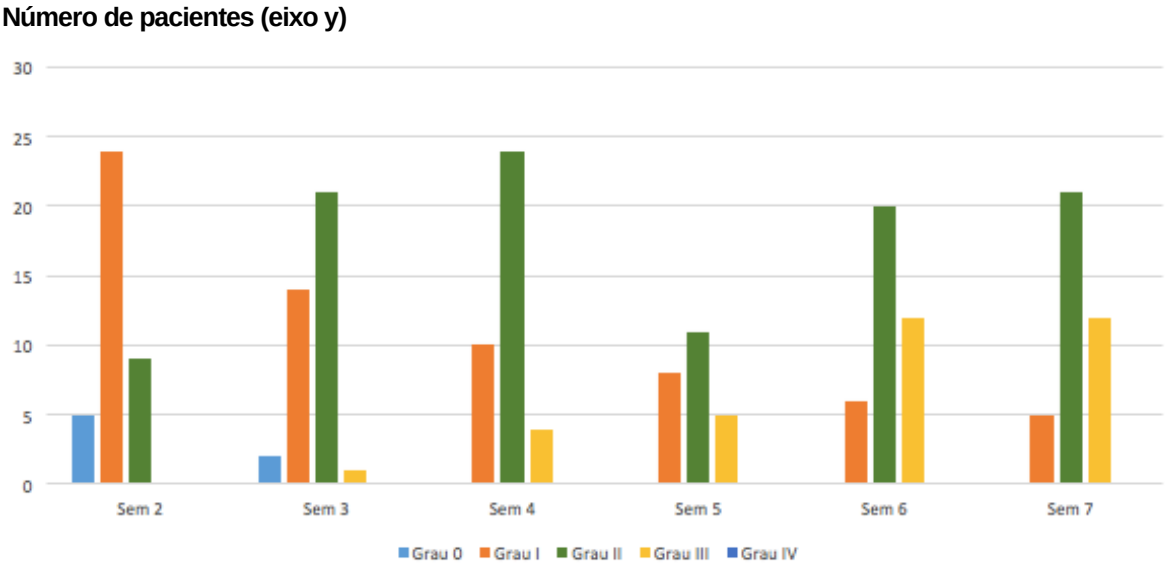



**Figura 4: Distribuição da intensidade da mucosite ao longo das semanas de CRT nos 38 pacientes incluídos.**

Dos 38 pacientes incluídos, 27 indivíduos tiveram amostras adequadas, incluídas para análise de perfil molecular. Desses, 16 pacientes apresentaram mucosite graus I e II, e 11 evoluíram com mucosite grau III e IV. Nove pacientes (56,5%) apresentaram SNPs no grupo de mucosite graus I e II, enquanto 06 pacientes (54,5%) do grupo III e IV apresentaram SNPS. No grupo de pacientes com mucosite grau I e II, 10 SNPS foram identificados, enquanto no grupo com graus III e IV, foram 14 SNPs. Seis SNPs estavam presentes nos dois grupos (Tabela 03).

**Tabela 4: Identificação dos SNPs presentes nos grupos de pacientes de acordo com graus de mucosite. Os SNPs grifados em verde estão presentes nos dois grupos.**

| Graus I e II | Graus III e IV |
|---|---|
| rs4248161 | rs769177 |
| rs3093672 | rs1800610 |
| rs3093665 | rs3093547 |
| rs3093559 | rs673 |
| rs769177 | rs2228088 |
| rs3093558 | rs3093666 |
| rs1799724 | rs905841621 |
| rs1800610 | rs3093544 |
| rs769178 | rs3093665 |
| rs3093561 | rs3093559 |
| | rs9282875 |
| | rs1799724 |
| | rs538552423 |
| | rs169178 |

Três pacientes que evoluíram com mucosite graus I e II apresentaram mais de um SNP, enquanto seis pacientes apresentaram um polimorfismo cada (Figura 05). Nos pacientes com mucosite graus III e IV, três também apresentaram mais de um SNP (Figura 06).

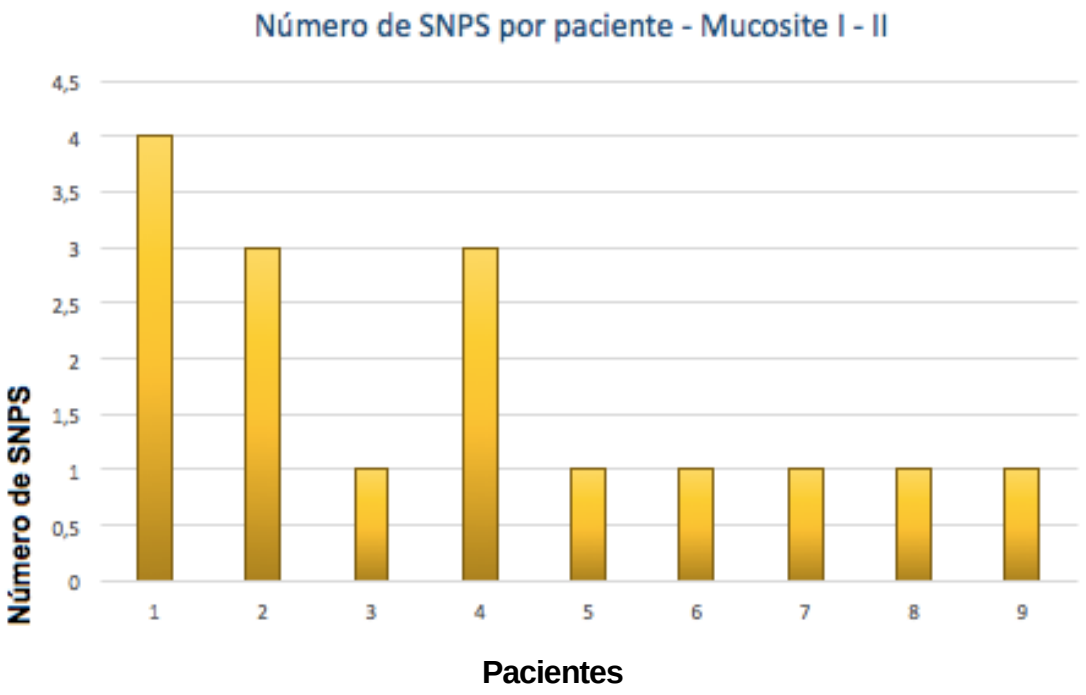



**Figura 5: Número de SNPs por pacientes no grupo com mucosite graus I e II**

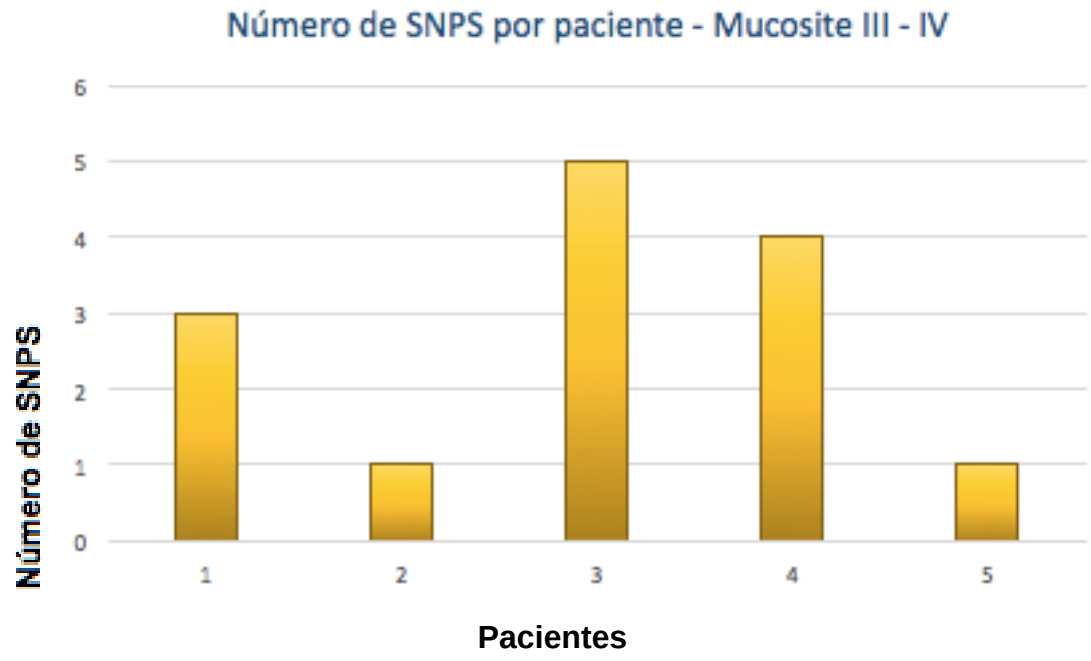



**Figura 6: Número de SNPS por pacientes no grupo com mucosite graus III e IV.**

As tabelas 04 e 05 identificam os SNPs presentes nos pacientes que tiveram suas amostras analisadas e evoluíram com mucosite graus I e II e graus III e IV, respectivamente.

**Tabela 5: Identificação dos SNPs por paciente no grupo com mucosite graus I e II.**

| I_II | SNPS | | | |
|---|---|---|---|---|
| Paciente 01 | rs1799724 | rs1800610 | rs3093561 | rs769178 |
| Paciente 02 | rs3093665 | rs769177 | rs3093559 | |
| Paciente 03 | rs4248161 | | | |
| Paciente 04 | rs3093665 | rs3093559 | rs3093558 | |
| Paciente 05 | rs1800610 | | | |
| Paciente 06 | rs1800610 | | | |
| Paciente 07 | rs769177 | | | |
| Paciente 08 | rs769177 | | | |
| Paciente 09 | rs3093672 | | | |

**Tabela 6: Identificação dos SNPs por paciente no grupo com mucosite graus III e IV.**

| III_IV | SNPS | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Paciente 01 | rs3093544 | rs3093665 | rs3093559 | | |
| Paciente 02 | rs905841621 | | | | |
| Paciente 03 | rs9282875 | rs1799724 | rs538552423 | rs1800610 | rs169178 |
| Paciente 04 | rs3093547 | rs673 | rs2228088 | rs3093666 | |
| Paciente 05 | rs769177 | | | | |
| Paciente 06 | rs769177 | | | | |

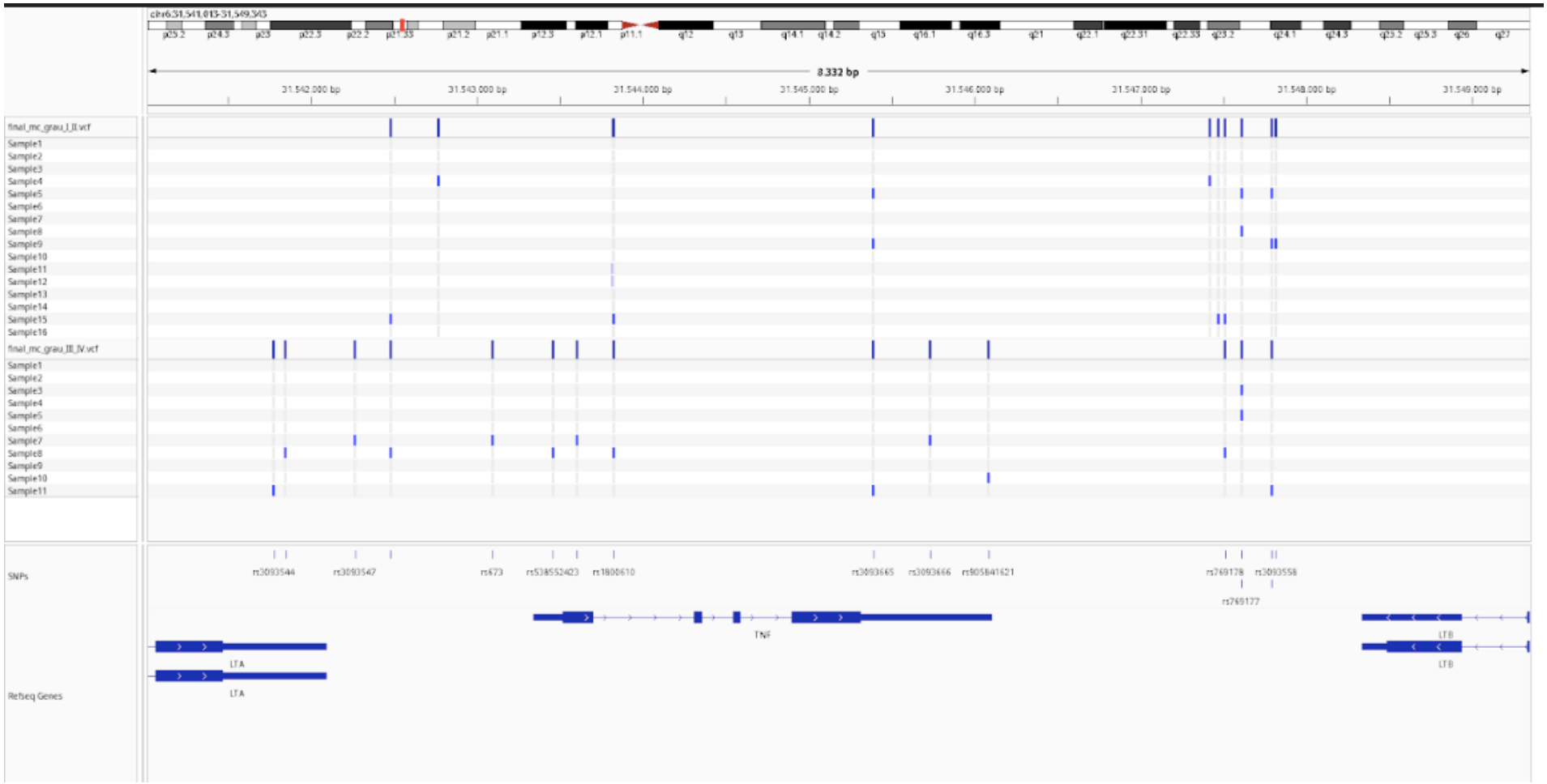



**Figura 7: Distribuição dos SNPs nos dois grupos em toda extensão do gene do TNF-α.**

A **figura 07** mostra a distribuição dos SNPs nos dois grupos em toda extensão do gene do TNF-α. O SNP rs2228088 presente no grupo III e IV, encontra-se na região codificadora do gene.

A análise descritiva das características clínicas associadas ao grau da mucosite está apresentada na tabela 6.

**Tabela 7: Análise descritiva das características clínicas associadas ao grau da mucosite.**

| ***Indicadores*** | ***Variáveis*** | | **Tipologia** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **GI (n= 4)** | **GII (n= 19** | **GIII (n= 15)** |
| ***Epidemiológicos*** | *Gênero (%)* | Homem | 4 | 17 | 10 |
| | | Mulher | - | 2 | 5 |
| | *Idade (anos)* | | 55,7 | 63,8 | 56,4 |
| | *Estadiamento (%)* | I | - | - | |
| | | II | - | 5,4 | 20,1 |
| | | III | 50,0 | 47,3 | 53,3 |
| | | IV | 50,0 | 47,3 | 26,6 |
| ***Clínicos*** | *Dose RT (%)* | 70 Gy | 100,0 | 94,7 | 26,6 |
| | | 60-66 Gy | - | 5,3 | 73,4 |
| | *Técnica (%)* | IMRT | 100,0 | 84,3 | 93,7 |
| | | 3DCRT | - | 15,7 | 6,6 |
| | *Sítio (%)* | Orofaringe | 100,0 | 57,9 | 60,0 |
| | | Nasofaringe | - | - | 6,6 |
| | | Cav. Oral | - | 26,3 | 26,7 |
| | | Primário O. | - | 15,7 | 6,6 |

A tabela 07 mostra a análise discriminante canônica relacionando os grupos de variáveis discriminantes e graus de mucosite. Quando as variáveis foram analisadas de forma individual, não houve relação significativa entre elas e a intensidade da mucosite. Foi realizado um agrupamento das variáveis genéticas, clínicas e epidemiológicas em grupo definido como *mix* de variáveis. Quando analisadas de forma integrada, a dose de RT, estadiamento, idade e seis SNPs (rs905841621, rs3093665, rs3093558, rs9282875, rs3093547), mostraram relação significativa com a intensidade da mucosite (p 0.006).

**Tabela 8: Análise discriminante canônica relacionando os grupos de variáveis discriminantes e graus de mucosite.**

| Grupo de variáveis discriminantes | Classificação por grau de mucosite (%) | | | CCC[1] (%) | Variância Explicada (%) | Lambda de Wilks[2] (P-valor) | Principais Características[3] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GI | GII | GIII | | FC1 | FC1 | FC1 e FC2 |
| **Genéticas (SNPs)** | 100,0 | 100,0 | 57,1 | 78,6 | 83,0 | 0,332 | rs3093558, rs3093665, rs769177, rs4248161, rs1800610 |
| **Clínicas** | 100,0 | 47,4 | 46,7 | 52,6 | 72,6 | 0,419 | Dose RT, técnica RT, sitio |
| **Epidemiológicas** | 100,0 | 68,4 | 46,7 | 63,2 | 82,5 | 0,073 | Idade, estadiamento, gênero |
| **Mix de variáveis** | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 88,1 | 0,006 | Dose RT, rs905841621, rs3093665, rs3093558, rs9282875, rs3093547, idade, estadiamento |

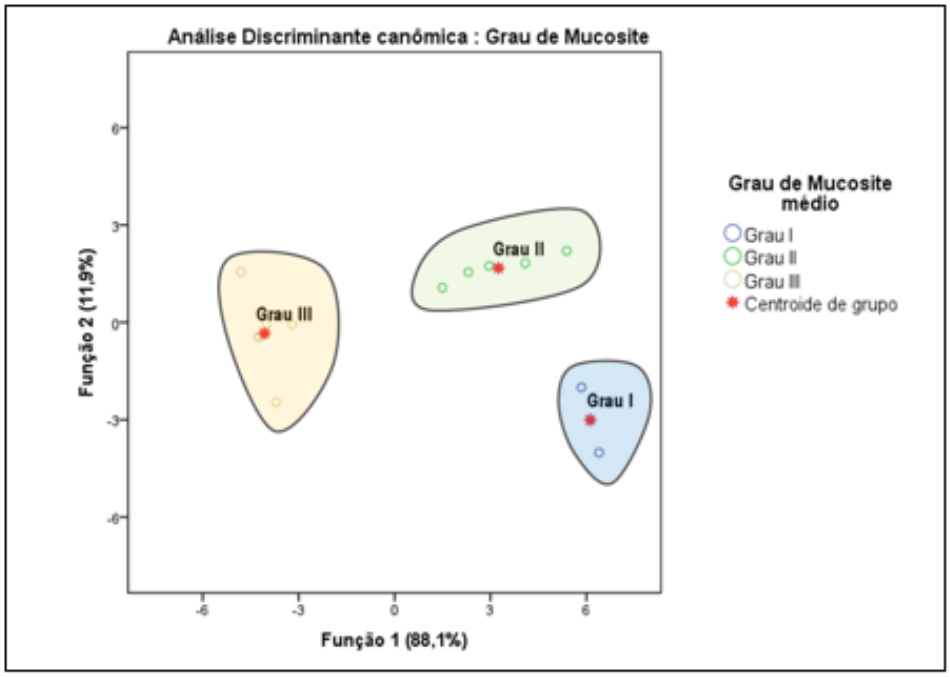
[1] Porcentagem de casos corretamente classificados por grau de mucosite: GI= Grau I; GII= Grau II; GIII= Grau III

[2]Teste estatístico: Primeira função discriminante canônica (FC1) com P < 0,05 no teste de Lambda de Wilks foram considerados significativos.

[3]Principais características por grupo de variáveis: Dose RT= Dosagem da radioterapia; rs= SNPs

Foi realizada a plotagem bidimensional representando a classificação segundo o grau de mucosite utilizando o modelo com mix de variáveis (Figura 8). Os eixos X e Y representam as funções canônicas discriminantes, evidenciando o quanto cada função discriminou seus dados. Os graus de mucosite conseguiram ser diferenciados a partir das variáveis utilizadas no modelo (mix de variáveis), uma explicando 88,1% das diferenças e outra 11,9%.

Plotagem bidimensional representando classificação segundo grau de mucosite utilizando modelo com mix de variáveis (Genéticas, Clínicas, Epidemiológicas)




**Nota:** Mix de variáveis = Dose de radioterapia, rs905841621, rs3093665, rs3093558, rs9282875, rs3093547, idade, estadiamento.

**Figura 8: Plotagem bidimensional representando classificação segundo grau de mucosite utilizando modelo com mix de variáveis**

# 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos muito se tem avançado na compreensão das vias moleculares associadas à fisiopatologia das doenças, bem como dos tratamentos e seus efeitos adversos. Na oncologia não é diferente. Vias de sinalização foram descritas e a personalização da abordagem diagnóstica e terapêutica tem sido um avanço. Nosso estudo, até onde sabemos, é o primeiro a avaliar polimorfismos genéticos em todo o gene do TNF-αR, relacionando com mucosite.

O tratamento do CCP baseado em CRT representa possibilidade de cura de determinadas doenças que anteriormente não poderiam ter abordagens cirúrgicas curativas, além de oferecer chance de preservação de órgãos em uma região anatômica muito sensível a essas alterações (PIGNON et al., 2009). Uma das toxicidades mais comuns e debilitantes, com potencial para comprometer os resultados terapêuticos relacionados a essa estratégia, é a mucosite (MURPHY et al., 2007).

A mucosite é um efeito secundário comum e frequentemente debilitante, que envolve as membranas mucosas que revestem o trato gastrointestinal, particularmente as regiões da cavidade oral e orofaringe. Pode levar a uma série de manifestações clínicas, incluindo eritema, ulceração, dor e dificuldade em deglutir (PETERSON et al., 2012). Mucosite pode também aumentar o risco de infecção e outras complicações (CINAUSERO et al., 2017).

Historicamente, a mucosite era vista exclusivamente como resultado de uma ação direta da RT ou da QT sobre as células da camada epitelial basal. No entanto, este quadro mais simples, apesar de relevante, não conseguia explicar as interações complexas que começaram a ser descritas na camada submucosa. O conceito de que a lesão da mucosa é um processo biológico e multifatorial é relativamente novo.

Avanços recentes na biologia molecular e celular forneceram alvos para o estudo e possíveis intervenções baseadas em mecanismos para prevenir e tratar a mucosite. Esse conhecimento vem de encontro ao que é observado na rotina dos consultórios de oncologia. Tratamentos semelhantes em relação à dose de RT, planejamento tridimensional, dose e esquemas de QT, produzem em determinados indivíduos, efeitos adversos com intensidades distintas. Fatores tradicionalmente estudados relacionados aos pacientes com mucosite eram gênero, índice de massa corporal, idade e comorbidades (ELTING et al., 2007). No entanto, aparentemente

somente esses parâmetros não eram suficientes para explicar essa variedade de apresentação dos sintomas. Sendo assim, outros fatores relacionados à biologia molecular, como polimorfismos genéticos em determinadas vias, poderiam ter influência em desfechos clínicos.

Os polimorfismos genéticos podem influenciar a expressão genética ao afetar vários elementos reguladores no genoma. Entre os polimorfismos genéticos, os SNPs são o tipo mais comum de variação genética no genoma humano (KRUGLYAK L. et al., 2001), envolvendo a troca de um único nucleotídeo. Recentemente, alguns estudos exploraram a relação entre os SNPs e a suscetibilidade à mucosite em pacientes com CCP.

Normando et al., avaliaram vários biomarcadores em uma revisão sistemática, quanto à sua associação com o desenvolvimento de mucosite, como o fator de crescimento epidérmico, a proteína C-reativa, SNPs, a taxa de sedimentação de eritrócitos, fatores de crescimento, marcadores inflamatórios de fase aguda, citocinas e antioxidantes plasmáticos. Foi realizada ainda uma meta-análise que mostrou uma expressão de polimorfismos nos genes XRCC1, XRCC3 e RAD51, todos genes de reparo de dano do DNA, bem como uma expressão de biomarcadores proteicos, em doentes com um risco acrescido de desenvolver mucosite (NORMANDO et al., 2017).

Diferentemente das vias de reparo de dano ao DNA, as vias relacionadas às citocinas pró-inflamatórias foram pouco estudadas como possíveis origens de SNPs ligados à maior intensidade de mucosite, apesar de desempenharem um papel decisivo no desenvolvimento desse efeito adverso. Bossi P. et al mediram os níveis de treze citocinas inflamatórias na saliva de 55 pacientes com CCP localmente avançado submetidos à CRT. Os valores de base, pré-tratamento não foram preditores de intensidade da mucosite. No entanto os níveis das IL-6, IL-1B e TNF-α aumentaram durante o tratamento, principalmente em pacientes com mucosite graus III e IV. Em análise univariada foi evidenciado aumento significativo de IL-6, IL-1β e TNF-α na terceira semana de tratamento (BOSSI et al., 2016). Sendo assim estudos que envolvam polimorfismos genéticos em vias dessas citocinas podem estabelecer uma assinatura genética relacionada à mucosite grave.

TNF-α é produzida principalmente pelos macrófagos que estão recrutados e ativados em maior número no microambiente inflamatório (PINTO AT et al., 2016). É uma citocina que possui um papel que vai além do dano celular direto no processo biológico da mucosite. TNF-α atua indiretamente na amplificação da injúria iniciada

pelo estresse oxidativo e geração de ROS causada pela RT e ou QT. TNF-α funciona como ativador de vias como ceramida e caspase. Além disso tem capacidade de ativar, numa alça de *feedback*, o principal fator de transcrição envolvido na produção das citocinas inflamatórias, o NF-kB, gerando um aumento ainda maior na produção de citocinas inflamatórias, condição também conhecida como *storm* de citocinas (SONIS et al., 2004).

Em nossa revisão sistemática (CAVALIERI R et al., 2024) identificamos apenas três estudos que avaliaram SNPs na via do TNF, todos do mesmo grupo, proveniente da Polônia (BRZOZOWSKA, A. et al, 2018; MLAK R. et al., 2020; POWRÓZEK et al., 2020) Duas publicações avaliaram SNPs pontuais no gene do TNFR1 e um SNP no gene que codifica a própria citocina. Nenhum dos estudos avaliou nenhum dos dois genes de forma ampla.

Brzozowska et al., um grupo polonês, foram os primeiros a estudarem demonstraram que a presença do alelo T no gene TNFRSF1A está associada a um risco acrescido de manifestação de mucosite grau 3 em doentes com CCP submetidos a RT. O estudo concluiu que os doentes com genótipo TT ou GT apresentavam um risco mais elevado de manifestação de OM de grau 3 na quinta semana de CRT em comparação com os portadores de GG. Os resultados indicam uma associação entre o SNP do gene TNFRSF1A (rs4149570) e o risco de OM mais grave relacionada com a RT em doentes com CCP (BRZOZOWSKA, A. et al., 2018).

No seu trabalho, Mlak et al., mostraram que o genótipo CC do gene TNFRSF1A está associado a um curso mais grave da OM. O SNP identificado neste estudo está localizado na região reguladora do gene TNFRSF1 A. Especificamente, o SNP (rs767455) que se verificou está envolvido na regulação da expressão da proteína TNFR1 e que pode potencialmente modular o risco de OM em doentes com CCP tratados com RT, sendo um fator de prognóstico independente de uma fraca sobrevivência global em doentes com CCP submetidos a RT de intensidade modulada. O genótipo TT, em contraste, teve um efeito protetor inverso (ML'AK R. et al., 2020). Os autores sugeriram que são necessários mais estudos para confirmar estes resultados.

Em nosso estudo, pela primeira vez o gene do TNF-α foi avaliado de forma ampla, em toda sua extensão. Pacientes com CCP submetidos à CRT foram avaliados semanalmente e divididos em dois grupos, aqueles que evoluíram com mucosite graus I e II, sem maiores repercussões clínicas para a evolução do tratamento e

aqueles que apresentaram mucosite graus III e IV, condição com grande morbidade, que pode causar interrupção do tratamento, até recuperação dos tecidos. Todos os pacientes desse grupo apresentaram um grupo de SNPs por indivíduo.

Para os SNPs que encontramos em nossos pacientes, fizemos uma revisão na literatura utilizando o UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/) em busca de publicações que tivessem relacionado aqueles SNPs com alguma condição clínica inflamatória ou autoimune, especialmente mucosite. Não encontramos estudos que tenham associado nenhum SNP encontrado no nosso grupo, com mucosite em paciente com CCP. No entanto, alguns estudos correlacionam alguns desses SNPs com outras condições inflamatórias.

Hildebrandt M et al., avaliaram variações genéticas em 59 SNPs em relação ao desenvolvimento de esofagite e pneumonite em pacientes submetidos à RT em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células. Pacientes com o SNP rs179924, presente em nossa população, tiveram duas vezes mais chance de desenvolver esofagite grau > 2 (HR:1.97, 95% CI:1.10-3.50) (HILDEBRANDT M. et al., 2010). Na nossa análise, esse SNP apareceu nos dois grupos em relação à intensidade da mucosite.

Um grupo chinês estudou a associação de polimorfismos genéticos no gene do TNF-α e desenvolvimento de depressão grave. O SNP rs179924, ligado a uma maior transcrição do TNF-α, está associado a alterações estruturais no córtex occipital, que podem estar relacionados a alterações presentes em quadros depressivos graves (ZHOU R. et al, 2018).

Polimorfismos genéticos no gene do TNF-α também foram estudados em relação à quadros reumatológicos. Zhu et Al., confirmaram associação significativa entre a presença do SNP rs179924 e espondilite anquilosante (ZHU X. et al, 2007).

SNPs encontrados em nossa coorte também foram avaliados em relação ao diabetes. Um estudo incluindo pacientes do Reino Unido e Irlanda avaliou SNPs que foram encontrados em nossa análise (rs3093665), buscando associação com diabetes tipo 2. Nesse caso, o estudo foi negativo, não havendo associação com nenhum dos 11 SNPs estudados.

Outra condição que vem sendo estudada em relação aos polimorfismos em genes das vias de citocinas inflamatórias, são as doenças intestinais inflamatórias. Uma publicação incluindo pacientes da Nova Zelandia estudou 3 SNPs da região promotora do TNF-α e seu papel no aumento do risco dessas doenças, entre eles o

rs1799724. Carreadores da variante TNF -857C->T não apresentaram alteração do risco global (FERGUSON LR, et al., 2008).

Grande parte desses estudos, que correlacionaram poliforfismos genéticos em vias de citocinas inflamatórias, incluindo do TNF-α, incluíram SNPs selecionados na região promotora do gene.

Em relação à terapia da mucosite instalada, o conhecimento da biologia molecular relacionada à mucosite abre a possibilidade de abordagens terapêuticas específicas.

Um dos primeiros medicamentos utilizados em mucosite foi a amifostina, um eliminador de radicais livres. Ela tem sido utilizada, com resultados conflitantes (GALITIS-NICOLATOU O. et al., 2013).

N-acetil sisteína também é uma substância com propriedades antioxidantes, que atua suprimindo a ativação do NF-KB induzida pelo TNF-α, apesar desse mecanismo não ser amplamente conhecido, podendo ocorrer por supressão de determinadas quinases (OKA S., 2000).

A palifermina é uma droga aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a mucosite oral. Ela atua no receptor do fator de crescimento de queratinócitos, estimulando a reepitelização dos tecidos, auxiliando na recuperação da mucosa afetada (SPIELBERG R. et al., 2004).

Anticorpos monoclonais tem potencial de serem desenvolvidos para tratamento de condições inflamatórias como a mucosite. O Infliximabe é um anticorpo monoclonal que se liga a uma proteína no corpo do TNF-α, inibindo sua ligação com seus respectivos receptores, consequentemente reduzindo sua função. Apesar de ainda não indicação formal em bula, essa droga já foi avaliada em estudos menores com resultados positivos (MELSHEIMER et al., 2019). Essa classe de medicação, assim como possíveis outras drogas alvo, com destinos específicos nas vias descritas, representam um potencial avanço nas condições inflamatórias em geral.

Mesmo com o desenvolvimento de medicações para possíveis tratamentos da mucosite, na rotina dos serviços oncológicos, a prevenção, as terapias de suporte e a intervenção precoce, representam as principais estratégias de abordagem da mucosite. Considerando isso, estudos que têm como objetivo traçar uma assinatura genética, identificar biomarcadores, possuem a capacidade de identificar indivíduos com maior pré-disposição para desenvolver esse desfecho clínico. A possível identificação precoce através da análise de aspectos moleculares de pacientes que

têm maior chance de desenvolvimento da mucosite, bem como da intensidade da mesma, representa a chance de uma nova abordagem em relação a essa complicação tão frequente.

O conhecimento das etapas prévias ao quadro clínico instalado, da relação de SNPs em genes relacionados às vias biológicas, do padrão de variação das citocinas, permite que novos tratamentos alvo sejam desenvolvidos para atuar em momentos precoces, inibindo moléculas ou vias, que antes não se tinha conhecimento, abrindo a possibilidade de novas terapias mais personalizadas, além da implementação precoce de medidas como suporte nutricional, medicações. Abordagens preventivas podem ser aplicadas de diferentes maneiras de acordo com o conhecimento prévio se determinado paciente tem maior chance de desenvolver um efeito adverso grave ou não.

# 6. CONCLUSÕES

Nosso estudo evidenciou SNPs que ainda não haviam sido descritos em estudos prévios avaliando o gene do TNF-αR, em pacientes com CCP submetidos à CRT, que desenvolveram mucosite grau III e IV. O SNP mais comumente encontrado na população em geral, foi rs769177. Proporcionalmente encontramos mais polimorfismos no grupo de pacientes que desenvolveram mucosite com maior intensidade. Análise discriminante canônica agrupando todas as variáveis mostrou uma relação significativa entre os SNPs rs905841621, rs3093665, rs9282875, rs3093547 e o grupo de doentes com mucosite de grau III e IV (p 0,006). Na população estudada, foram identificados novos SNPs com potencial relevância para a mucosite de alto grau. São necessários mais estudos que avaliem os SNP nas vias das citocinas pró-inflamatórias para estabelecer o seu potencial papel como biomarcadores no CCP.

Mais estudos são necessários, para identificar preditores biológicos de condições inflamatórias mais intensas, como a mucosite de alto grau, abrindo novas frentes na abordagem dessa condição.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:


Adelstein DJ, et al. (2003). An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 21(1):92-98. doi:10.1200/JCO.2003.01.008. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12506176/. Acesso em: 30 mar. 2019.

Anderson, G., et al. (2021). An Updated Review on Head and Neck Cancer Treatment with Radiation Therapy. Cancers (Besel)., Sep 30; 13(19):4912. doi: 10.3390/cancers13194912. PMID: 34638398; PMCID: PMC8508236. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34638398/. Acesso em: 04 mar. 2023.

Armstrong JA, McCaffrey R. (2006). The Effects of Mucositis on Quality of Life in Patients with head and Neck Cancer. Clin J Oncol Nurs. 10(1):53-56. doi:10.1188/06.CJON.53-56. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16482728/. Acesso em: 05 nov. 2019.

Bossi P, et al. (2016). Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol*. 96(5):959-966. doi:10.1016/j.ijrobp.2016.08.047. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27745982/. Acesso em: 14 jun. 2019.

Bowen JM, Keefe DMK. (2008). New Pathways for Alimentary Mucositis. J Oncol. doi: 10.1155/2008/907892. Epub 2008 Sep 23. PMID: 19259334; PMCID: PMC2648637. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19259334/. Acesso em: 16 jul 2020.

Brierley, J. et al. (2016). TNM Classification of Malignant Tumors, Eighth Edition. ISBN: 978-1-119-26356-2.

Brzozowska, A., et al. (2018). Polymorphism of Promoter Region of TNFRSF1A Gene (−610 T > G) as a Novel Predictive Factor for Radiotherapy Induced Oral Mucositis in HNC Patients. Pathol. Oncol. Res. 24, 135–143. doi: 10.1007/s12253-017-0227-1. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28401452; PMCID: PMC5736772. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28401452/. Acesso em: 30 set. 2020.

Cavalieri R., et al. (2024). Single Nucleotide Polymorphisms as Biomarker Predictors of Oral Mucositis Severity in Head and Neck Cancer Patients Submitted to Combined Radiation Therapy and Chemotherapy: A Systematic Review. Cancers. 16, 949. https://doi.org/10.3390/cancers16050949. Acesso em: 03 fev. 2024.

Chasman D, Adams RM. (2001). Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. 11Edited by F. Cohen. *J Mol Biol*.307(2):683-706. doi:10.1006/jmbi.2001.4510. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11254390/. Acesso em: 18 mar. 2023.

Cox JD, et al. (1995). Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and The European Organization for Research and Treatment of Cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 31 (5): 1341 – 6. doi: 10.1016/0360-3016(95)00060-C. PMID: 7713792. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7713792. Acesso em: 28 fev. 2020.

Koboldt DC, et al. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. Bioinformatics. Sep 1; 25(17): 2283–2285. doi: 10.1093/bioinformatics/btp373. Epub 2009 Jun 19. PMCID: PMC2734323. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19542151/. Acesso em: 29 mai. 2020.

Elting LS, et al. (2007). Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 68(4), 1110–1120. https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2007.01.053. Acesso em: 23 jan. 2020.

Fanning SR, et al. (2006). Severe mucositis is associated with reduced survival after autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. 374-381. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06323.x. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16995885/. Acesso em: 23 jan. 2020.

Fergunson LR, et. al. (2008). Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. World J Gastroenterol Volume 14 Number 29. doi: 10.3748/wjg.14.4652. PMID: 18698679; PMCID: PMC2738789. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18698679/. Acesso em: 18 fev. 2021.

Fitzmaurice C, et al. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncol*. 3(4):524. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27918777/. Acesso em: 26 jun. 2021.

Galitis-Nicolatou O, et al. (2013). Systematic review of amifostine for the management of oral mucositis in cancer patients. Support Care Cancer. 21(1):357-64. doi: 10.1007/s00520-012-1613-6. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23052919/. Acesso em: 16 jul. 2022.

Hildebrandt M, et al. (2010). Genetic Variants in Inflammation-Related Genes Are Associated with Radiation-Induced Toxicity Following Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. August 2010, Vol. 5, Issue 8. PLoS One. 5(8):e12402. doi: 10.1371/journal.pone.0012402. PMID: 20811626; PMCID: PMC2928273. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811626/. Acesso em: 11 dez. 2022.

Ikuta T, et al. (2015). Gene polymorphism of β-defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*.103(1):66-74. doi:10.1007/s10266-013-0139-9. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24276427. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24276427/. Acesso em: 19 mar. 2023.

Ferlay J, et al. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. GLOBOCAN v1.0. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25220842/. Acesso em: 12 nov. 2023.

Kim D; et al. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods. 12(4):357-60. doi: 10.1038/nmeth.3317. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25751142; PMCID: PMC4655817. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25751142/. Acesso em: 04 mai. 2020.

Kinane DF, Hart TC.( 2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. (6):430-449. doi: 10.1177/154411130301400605. PMID: 14656898. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656898. Acesso em: 13 jul. 2017.

Kruglyak, L.; Nickerson, D.A. (2001). Variation is the spice of life. Nat. Genet., 234 – 236. doi: 10.1038/85776. PMID: 11242096. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11242096/. Acesso em: 06 nov. 2022.

LI H, et al. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. BIOINFORMATICS, v. 25, n. 16, p. 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19505943; PMCID: PMC2723002. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19505943/. Acesso em: 10 ago. 2023.

Liberatti A, et al. (2009). The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. J Clin Epidemiol. 62(10):e1-34. doi: 10.1016/j.jclinepi.2009.06.006. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19631507/. Acesso em: 03 ago. 2023.

Luchini C, et al. (2017). Assessing the quality of studies in meta-analyses: Advantages and limitations of the Newcastle Ottawa Scale. World J Meta-Anal. 5, 4.

Mlak R, et al. T. (2020). Polymorphism of TNFRSF1 A may act as a predictor of severe radiation-induced oral mucositis and a prognosis factor in patients with head and neck cancer. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 130, 283–291.e2. doi: 10.1016/j.oooo.2020.05.010. Epub 2020 May 26. PMID: 32561252. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/325.61252/. Acesso em: 05 out. 2023.

Mlak R; et al. (2020). The relationship between TNF-α gene promoter polymorphism (−1211 T>C), the plasma concentration of TNF-α, and risk of oral mucositis and shortening of overall survival in patients subjected to intensity-modulated radiation therapy due to head and neck cancer. Support. Care Cancer. 531–540. doi: 10.1007/s00520-019-04838-6. Epub 2019 May 10. PMID: 31076897; PMCID: PMC6954128. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31076897/. Acesso em: 03 mar. 2024.

Mody, MD, et al. (2021). Head and neck cancer. *Lancet. 398*, 2289–2299. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01550-6. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34562395. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34562395/. Acesso em: 09 jan. 2023.

Murphy BA, et al. (2007). Quality of life research in head and neck cancer: A review of the current state of the science. Crit. Rev. Oncol./Hematol. 251–267. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.005. Epub 2007 Apr 3. PMID: 17408963. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17408963/. Acesso em: 05 out. 2021.

Nguyen-tan PF, et al. (2014). Randomized Phase III Trial to Test Accelerated Versus Standard Fractionation in Combination With Concurrent Cisplatin for Head and Neck Carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 Trial : Long-Term Report of Efficacy and Toxicity.32(34). doi:10.1200/JCO.2014.55.3925. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25366680/. Acesso em: 02 ago. 2019.

Nomura M, et al. (2013). Irsogladine maleate reduces the incidence of fluorouracil-based chemotherapy-induced oral mucositis.2-6. doi:10.1093/annonc/mds584. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152361/. Acesso em: 02 abr. 2019.

Normando AGC, et al. (2017). Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: A systematic review and meta-analysis. Support. Care Cancer.25, 2969–2988. doi: 10.1007/s00520-017-3783-8. Epub 2017 Jun 16. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28623401/. Acesso em:05 abr. 2020.

Oka S, et al. (2000). N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-KB activation through inhibition of IB kinases. FEBS Letters. 472 196-202. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01464-2. PMID: 10788610. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10788610/. Acesso em: 04 jun. 2022.

Peterson DE, Keefe DM S. (2012). New frontiers in mucositis Am Soc Clin Oncol Educ Book. 545 – 551. doi: 10.14694/EdBook_AM.2012.32.46. PMID: 24451793. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24451793/. Acesso em: 02 fev. 2020.

Pignon J, et al. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17 , 346 patients. Radiotherapy and Oncology, 92(1), 4–14. doi: 10.1016/j.radonc.2009.04.014. Epub 2009 May 14. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19446902/. Acesso em: 02 fev. 2020.

Pinto AT, et al. (2022). Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. Scientific Reports, 6:18765, 2016. doi: 10.1038/srep18765. Erratum in: Sci Rep. 21;12(1):4774. PMID: 26735768; PMCID: PMC4702523. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26735768/. Acesso em: 06 mar. 2022.

Platek ME, et al.(2012). Quantification of the effect of treatment duration on local-regional failure after definitive concurrent chemotherapy and intensity-modulated radiation therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. Head & Neck. doi: 10.1002/hed.23024. Epub May 22. PMID: 22619040; PMCID: PMC5061340. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22619040/. Acesso em: 09 jun. 2020.

Russi EG, et al. (2014). Local and systemic pathogenesis and consequences of regimen-induced inflammatory responses in patients with head and neck cancer receiving chemoradiation. *Mediators Inflamm*. doi:10.1155/2014/518261. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24757285/. Acesso em: 09 mai. 2019.

Singh V; Singh AK. (2020). Oral Mucositis. Natl J Maxillofac Surg. 11(2): 159 – 168. doi: 10.4103/njms.NJMS_10_20. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33897175; PMCID: PMC8051654. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33897175/. Acesso em: 07 mai. 2022.

Sonis S, et al. (2007). Gene expression changes in peripheral blood cells provide insight into the biological mechanisms associated with regimen-related toxicities in patients being treated for head and neck cancers. Oral Oncology.43, 289–300. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.03.014. Epub 2006 Aug 22. PMID: 16920386. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16920386/. Acesso em 05 jul. 2019.

Sonis ST, et al. (2004). Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury: Cancer. Vol. 4, April, 277 – 284. doi:10.1002/cncr.20162. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15108222/. Acesso em: 17 set. 2019.

Spielberger R, et al. (2004). Palifermin for Oral Mucositis after Intensive Therapy for Hematologic Cancers. N Engl J Med. 351:2590-8. doi: 10.1056/NEJMoa040125. PMID: 15602019. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15602019/. Acesso em: 19 set. 2019.

Sung, H, et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Ca Cancer J Clin. 71:209-249. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/ Acesso em: 24 fev. 2024.

Takashiba S, Naruishi K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 40(1):94-106. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00142.x. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16398687/. Acesso em: 02 jan. 2024.

Villa A, Sonis ST, (2015). Mucositis. Current Opinion in Oncology, 27(3), 159–164. https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000180. Acesso em: 20 nov. 2022.

Wolf, G., et al. (1991). Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. New England Journal of Medicine, 324(24), 1685–1690. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2034244/. Acesso em: 08 nov. 2020.

Ye S. (2000). Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol*. (7):623-629. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102751. Acesso em: 13 jul. 2019.

Zhou R, et al. (2018). Effects of tumor necrosis factor-α polymorphism on the brain structural changes of the patients with major depressive disorder. Translational Psychiatry. 8:217. doi: 10.1038/s41398-018-0256-x. PMID: 30310056; PMCID: PMC6181976. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30310056/. Acesso em: 19 jul. 2019.

Zhu X, et al. (2007). A novel gene variation of TNFa associated with ankylosing spondylitis: a reconfirmed study. Ann Rheum Dis. 1419–1422. doi: 10.1136/ard.2006.068528. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17472990/. Acesso em: 30 mai. 2021.

# ANEXO 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### Associação da mucosite com polimorfismos genéticos em citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com radioterapia e quimioterapia

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar de uma pesquisa com o título **"Associação da mucosite com polimorfismos genéticos em citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com radioterapia e quimioterapia."** Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências de sua participação. Após receber todas as informações, e depois que todas as dúvidas tenham sido esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar. Garantimos que sua participação na pesquisa não influenciará o tratamento realizado pelo seu médico assistente, o qual continuará com toda autonomia para definir, juntamente com você, o seu tratamento.

O motivo que nos leva a estudar a associação entre alterações genéticas e efeitos colaterais no tratamento combinado com radioterapia e quimioterapia em pacientes com tumores de cabeça e pescoço é a possibilidade de identificar pacientes, que por terem essas alterações, têm possivelmente maior chance de desenvolver toxicidade relacionada à terapia.

O conhecimento adquirido com essa pesquisa através da possível comprovação da associação entre alterações genéticas e efeitos colaterais, possibilitará com que medidas preventivas e terapêuticas específicas sejam implementadas de forma precoce, minimizando os efeitos colaterais.

O objetivo do presente estudo é avaliar a associação entre a alteração genética definida como polimorfismos genéticos localizadas em citocinas pro-inflamatórias e mucosite em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à tratamento combinado com radioterapia e quimioterapia.

Durante o tratamento combinado você será submetido por uma vez a coleta de 3 ml de sangue venoso durante o tratamento combinado com rádio e qiomioterapia. A coleta será feita através de punção de veia periférica.

Serão realizados dois questionários previamente ao início do tratamento combinado: Um sobre sua qualidade de vida antes do tratamento, outro sobre sintomas de cansaço. Ao final da terapia os dois questionários são repetidos, bem como nas consultas de seguimento 6 e

12 meses após. Avaliaremos ainda, semanalmente durante o tratamento, através de visualização da cavidade oral, o desenvolvimento de mucosite.

Existe um desconforto e risco mínimo para você se submeter à coleta do sangue. Hematoma pode ocorrer durante ou após a realização da punção venosa. Nos casos em que o hematoma é visualizado pelo profissional durante a coleta o torniquete e a agulha são retirados imediatamente e a compressão local é realizada por um período de dois minutos, sendo indicado o uso de compressas frias para atenuar a dor. Infecção é rara, mas deve ser considerada. Os principais cuidados para evitar o processo infeccioso no local da punção venosa é a correta assepsia do local. Dor de pequena intensidade é normal mediante a punção venosa.

No entanto o procedimento se justifica pois é através dele que é possível a realização da análise genética citada anteriormente.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no OncoBeda.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional em caso de haver gastos de tempo. No caso de você sofrer algum dano decorrente dessa pesquisa, (ex. flebite), será realizado tratamento de suporte em nossa instituição

**Declaração do(a) participante ou do responsável pelo(a):**

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O(a) pesquisador(a) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o pesquisador no telefone (__) _____ _____.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de

consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome participante _____

Assinatura participante _____

Data _____/ _____/_____

Nome pesquisador _____

Assinatura pesquisador _____

Data _____ / _____ / _____

# ANEXO 2: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE MEDICINA DE CAMPOS/FUNDAÇÃO BENEDITO PEREIRA NUNES

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Associação da mucosite com polimorfismos genéticos em citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com radioterapia e quimioterapia

**Pesquisador:** RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 55643621.3.0000.5244

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO -

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.398.103

**Apresentação do Projeto:**

Projeto apresenta delineamento adequado e capaz de responder os objetivos da pesquisa. Trata de estudo transversal, multicêntrico. A amostra será composta por 150 pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço submetidos à tratamento combinado com RT e QT. Será avaliada o grau de mucosite durante o tratamento combinado com RT e QT, e coletada amostra de sangue como fonte de DNA genômico e avaliados os polimorfismos genéticos em IL6, IL-1, TNF.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos em citocinas pró-inflamatórias e mucosite em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à tratamento combinado RT e QT

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos e se referem a punção venosa periférica para coleta sanguínea. A possível identificação precoce através da análise de aspectos moleculares de pacientes que têm maior chance de desenvolvimento da mucosite, bem como da intensidade da mesma, representa a chance de uma nova abordagem em relação a essa complicação tão frequente.

**Endereço:** Avenida Dr. Alberto Torres, 217
**Bairro:** Centro **CEP:** 28.035-580
**UF:** RJ **Município:** CAMPOS DOS GOYTACAZES
**Telefone:** (22)2101-2964 **Fax:** (22)2101-2929 **E-mail:** cepfmc@fmc.br

FACULDADE DE MEDICINA DE CAMPOS/FUNDAÇÃO BENEDITO PEREIRA NUNES

Continuação do Parecer: 5.398.103

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nenhum comentário ou considerações a fazer.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto de pesquisa apresentou todos os requisitos exigidos e de acordo com a Resolução CNS nº 466/12 e novas normatizações da Plataforma Brasil.

**Recomendações:**

Corrigir o "TERMO DE RESPONSABILIDADE DA EQUIPE DE PESQUISA" que está referenciando ao "Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Fundação São Francisco Xavier – Hospital Márcio Cunha (CEP FSFX-HMC)" e deverá ser ao "Faculdade de Medicina de Campos / Fundação Benedito Pereira Nunes".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Como resultado desta análise e com base na Resolução CNS nº 466/12, o projeto de pesquisa foi aprovado por seus próprios fundamentos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|---|---|---|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1041338.pdf | 03/02/2022 17:14:41 | | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 03/02/2022 17:13:24 | RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_.pdf | 17/11/2021 01:05:00 | RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_de_Responsabilidade_.pdf | 17/11/2021 01:04:07 | RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 17/11/2021 00:15:23 | RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO | Aceito |
| Declaração de concordância | Termo_uenf_oncobeda.pdf | 17/11/2021 00:10:30 | RONALDO CAVALIERI VARGES FILHO | Aceito |

FACULDADE DE MEDICINA DE CAMPOS/FUNDAÇÃO BENEDITO PEREIRA NUNES

Continuação do Parecer: 5.398.103

**Situação do Parecer:**
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**
Não

CAMPOS DOS GOYTACAZES, 09 de Maio de 2022

**Assinado por:**
**ISRAEL NUNES ALECRIN**
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Dr. Alberto Torres, 217
**Bairro:** Centro **CEP:** 28.035-580
**UF:** RJ **Município:** CAMPOS DOS GOYTACAZES
**Telefone:** (22)2101-2964 **Fax:** (22)2101-2929 **E-mail:** cepfmc@fmc.br

**ANEXO 3: Publicação do artigo intitulado "Single Nucleotide Polymorphisms as Biomarker Predictors of Oral Mucositis Severity in Head and Neck Cancer Patients Submitted to Combined Radiation Therapy and Chemotherapy: A Systematic Review".**

*cancers*

MDPI

*Review*

# Single Nucleotide Polymorphisms as Biomarker Predictors of Oral Mucositis Severity in Head and Neck Cancer Patients Submitted to Combined Radiation Therapy and Chemotherapy: A Systematic Review

**Ronaldo Cavalieri [1,2], Harley Francisco de Oliveira [3], Thais Louvain de Souza [4] and Milton Masahiko Kanashiro [1,*]**

[1] Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; ronaldocavalieri@gmail.com
[2] Centro de Radioterapia, Grupo OncoBeda, Campos dos Goytacazes 28010-140, Brazil
[3] Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14015-010, Brazil; harley@fmrp.usp.br
[4] Faculdade de Medicina de Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro 28035-581, Brazil; thaislsouza@gmail.com
* Correspondence: kmilton@uenf.br

**Simple Summary:** Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are the most common type of genetic variation found in an individual's DNA sequences. SNPs can occur in both coding and non-coding regions of the genome and can affect gene expression, protein function, and disease susceptibility. In this systematic review, we evaluate the potential of SNPs as biomarkers in the assessment of oral mucositis (OM) severity in head and neck cancer (HNC) patients treated with concomitant chemoradiation (CRT). This systematic review demonstrates that SNPs in different biological pathways have the potential to be biomarkers and to function as predictors of patients who will develop severe mucositis. The most studied biological pathway was that involving DNA damage repair genes. However, considering the involvement of cytokines and inflammatory pathways in the pathophysiology of mucositis, we believe that this is a promising area in the study of the prediction of this condition. We conclude that SNPs can be used as possible biomarkers for the assessment of OM intensity in HNC patients, and further research is needed to explore the potential of SNPs in personalized medicine for HNC treatment.

**Abstract:** Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are the most common type of genetic variation found in an individual's DNA sequences. SNPs can occur in both coding and non-coding regions of the genome and can affect gene expression, protein function, and disease susceptibility. In this systematic review, we evaluate the potential of SNPs as biomarkers in the assessment of oral mucositis (OM) severity in head and neck cancer (HNC) patients treated with concomitant chemoradiation (CRT). The study selection process involved screening 66 articles from different platforms, and after removing duplicates and excluding articles that did not meet the eligibility criteria, 23 articles were included for full-text evaluation. Among them, genes from several pathways were analyzed. The DNA damage repair pathways had the highest number of genes studied. The most frequently analyzed gene was *XRCC1*. The proinflammatory cytokine pathways evaluated were TNF, with three articles, and NF-κB, with one article. Most included studies showed a potential association between certain SNPs and high-grade mucositis. We conclude that SNPs can be used as possible biomarkers for the assessment of OM intensity in HNC patients, and further research is needed to explore the potential of SNPs in personalized medicine for HNC treatment.

**Keywords:** head and neck cancer; mucositis; chemoradiotherapy; SNPs

check for updates

**Citation:** Cavalieri, R.; de Oliveira, H.F.; Louvain de Souza, T.; Kanashiro, M.M. Single Nucleotide Polymorphisms as Biomarker Predictors of Oral Mucositis Severity in Head and Neck Cancer Patients Submitted to Combined Radiation Therapy and Chemotherapy: A Systematic Review. *Cancers* **2024**, *16*, 949. https://doi.org/10.3390/cancers16050949

Academic Editors: J. Chad Brenner, Norifumi Nakamura and Hajime Suzuki

Received: 27 December 2023
Revised: 8 February 2024
Accepted: 20 February 2024
Published: 27 February 2024

**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

Head and neck cancer (HNC) represents a heterogeneous group of malignancies located in an anatomical region containing delicate structures with close relationships to each other and involved in critical functions such as feeding and breathing. In addition, the natural history of the disease and the adverse effects of treatment can directly impact the patient's appearance, verbal expression, and social interaction [1]. It originates from epithelial or glandular tissue lining the aero-digestive tract, and it can involve the oral cavity, pharynx, nasal cavity, larynx, thyroid, and salivary glands. HNC is a relatively common cancer worldwide, with approximately 950,000 new cases and 470,000 deaths per year across all subsites, and the global incidence is estimated to increase by 34% by 2030 [2]. Until the early 1990s, local curative treatment was primarily based on surgery with or without postoperative radiotherapy (RT). Later on, several publications started to demonstrate the possibility of organ preservation without loss of overall survival in selected groups of patients treated with CRT, making combined treatment a viable option [3,4]. However, conservative treatment with concurrent chemotherapy (CT) has altered and intensified some of the already known toxicity patterns of RT [5].

Mucositis is a frequent and acute complication, occurring regularly in patients receiving CRT. The patient may develop, to varying degrees, dysphagia, odynophagia, dehydration, and weight loss, and it is often necessary to temporarily interrupt RT or reduce the dose of CT, affecting outcomes and increasing frequency, duration, and costs of hospitalization and antibiotic therapy [5]. Worsening severity of mucositis is related to declining levels of quality of life [6]. Classically, it was described exclusively as a direct and local effect of radiation damage to the DNA of basal layer cells, influencing their multiplication and replacement of mucosal surface cells. Radiation-induced mucositis was classically recognized as an "outside-in" process. The concept of mucosal injury as a biological and multifactorial process is relatively new [6,7].

In 2004, Sonis et al. published a study describing aspects of the development of mucositis as a dynamic process involving the activation of different pathways, described in a model of distinct phases [7]. The complexity of its pathogenesis, with description of distinct biological pathways and associated systemic factors, has been increasingly explored [8].

Previous data have reported a possible association between genetic polymorphisms in different pathways and the development of mucositis, acting as potential biomarkers of severity [9]. The most common type of polymorphism is one involving a single nucleotide, called single nucleotide polymorphism (SNP) [10].

The early identification, through the analysis of molecular aspects, of patients who are possibly more likely to develop mucositis, as well as its intensity, represents a promising area and the possibility of a new approach to this frequent complication. Individuals identified early on with a greater probability of developing this debilitating toxicity can be approached differently with the preemptive implementation of preventive measures and aggressive supportive care before and during radiotherapy. The purpose of this systematic review is to identify studies that evaluated SNPs in different pathways as predictive biomarkers of mucositis intensity in head and neck cancer patients submitted to combined radiotherapy and chemotherapy.

## 2. Methods

This systematic review was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist [11] and registered as 10.17605/OSF.IO/VQJPA.

### *2.1. Eligibility Criteria*

Articles were included that addressed the relationship between SNPs in different biological pathways as biomarkers of the severity of oral mucositis (OM) in HNC patients receiving RT or CRT. The treatments had to be curative and RT could be used as a radical or postoperative treatment.

Articles were excluded because of the following reasons: evaluated patients with other types of cancer; HNC treatment without CRT; no correlation of the SNP with the severity of mucositis; reviews, letters, personal opinions, book chapters, and conference abstracts; association between biomarkers and OM in experimental studies (clinical trials, in vitro or in vivo animal studies); and language restrictions.

### *2.2. Information Sources and Search Strategies*

An exhaustive search was carried out in the main databases used as research tools—PubMed, LILACS, Science Direct, and Cochrane. A search was also carried out on Google Scholar in order to detect any publications in addition to those already listed. Search strategies included the use of the following terms: "head and neck cancer OR head and neck carcinoma" AND "radiation therapy OR radiotherapy OR chemotherapy OR chemoradiation" AND "mucositis OR oral mucositis" AND "single nucleotide polymorphisms OR SNPs OR SNP OR gene polymorphism".

Articles published between January 2009 and September 2022 were included for analysis. All duplicate articles were removed. In addition, the references of the included articles were reviewed to detect publications that were not identified in the search process.

### *2.3. Study Selection and Data Collection Process*

In the first phase, the articles were listed in the databases and all the titles and abstracts were reviewed by two independent authors (RC and HO), who made the primary selection. The second phase consisted of reading the full text and retrieving those that met the inclusion criteria. This stage was also carried out by the same two authors (RC and HO). In the event of disagreement, a third author (MK) decided whether or not to include the reference. The references of the articles were reviewed by the first author (RC).

For all the articles included, the following information was recorded: authors, year of publication, country, number of patients, RT dose, treatment modalities, pathways of the polymorphisms studied, type of study, and main conclusions.

### *2.4. Study Risk of Bias and Quality Assessment*

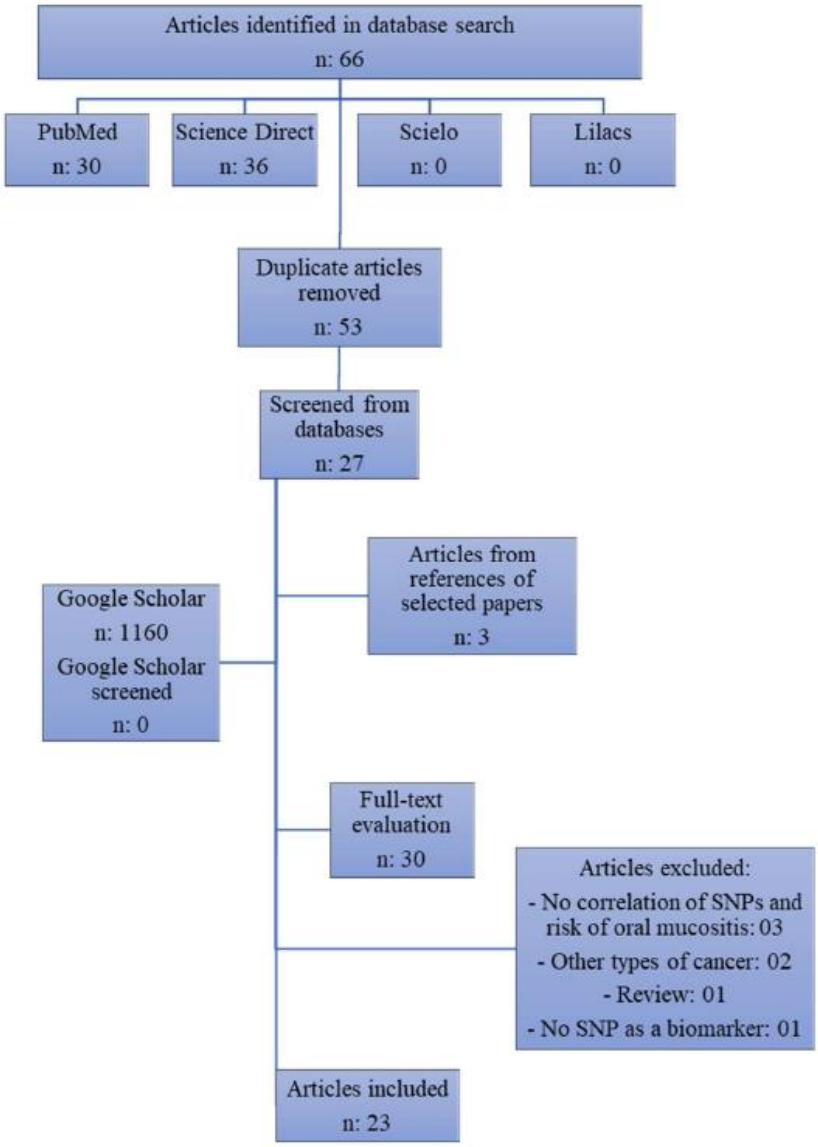
The quality and possible sources of bias of the selected studies were assessed using the Newcastle Ottawa Scale (NOS) tool, specific to observational studies. Three quality parameters (selection, comparability, and results), divided into eight specific items, were assessed. Each item on the scale was scored out of one point, except comparability, which was scored out of two points. The maximum for each study was nine, and references with less than five points were identified as representing a considerable risk of bias [12].

Two authors independently verified the parameters (RC and TL). A third author (HO) decided in case of disagreement.

## 3. Results

### *3.1. Study Selection*

After the terms were restricted, we found a total of 66 articles on different platforms. Duplicated articles were removed, leaving 53 articles. The titles and abstracts of all of them were subsequently analyzed comprehensively. Twenty-seven articles were selected for full-text review. Three additional articles were found from the references of the selected articles. Finally, 23 articles were selected for final analysis (Scheme 1 From PRISMA, http://www.prisma-statement.org/?AspxAutoDetectCookieSupport=1 (accessed on 30 October 2023)).




**Scheme 1.** Flow diagram of the study selection.

### 3.2. Study Characteristics

The countries where the studies were conducted were China (10), Poland (04), India (03), Japan (01), Belgium (01), Italy (01), Spain (01), France (01), and the USA (01).

All articles were published in English, between 2009 and 2021.

The total of individuals from the published articles was 4977. Genome-wide association studies contributed to most of them. Sample size ranged from 24 to 1467 patients with HNC. All patients received RT with or without CT. Two articles included surgery as an option.

All articles used genomic DNA extracted from blood samples, except one that used tumor samples stored in liquid nitrogen from diagnostic biopsies.

Table 1 summarizes the main characteristics and findings of the selected articles.

**Table 1.** Main characteristics and findings of the selected articles.

| Author | Country | Year | Primary Sites | Possible Treatments | Number of Patients (n) | Dose (Gy) | Genes Accessed by the Studies | Sample | Type of Study | Main Conclusions | Mucositis as One of the Primary End Points |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Werbrouk et al. [13] | Belgium | 2009 | Head and Neck | RT/RT + CT/Surgery + RT | 88 | 66–70 | DNA DSB repair genes *XRCC3, Rad51, Lig4, Ku70, Ku80* | Blood | Cohort | - Association was found between the presence of the XRCC3c.562-14 A>G (rs1415120657) polymorphism and the risk of severe acute mucositis (adjusted OR = 1.96; $p = 0.178$).<br>- One variant allele of Rad51c.-3392 was associated with a small increase in the risk for severe mucositis after RT (adjusted OR = 1.21; $p = 0.728$).<br>- A negative but not significant association was found for Ku70c.-1310 SNP. | Yes |
| Patresi et al. [14] | Italy | 2011 | Head and Neck | RT/RT + CT | 101 | 54–70 | XRCC1 c.1196A>G, XRCC3 c.722C>T, RAD51 (c.-3429G>C, c.-3392G>T), and GSTP1 c.313A>G. | Blood | Cohort | - Risk of mucositis was increased in patients with XRCC1-399Gln allele genotypes both in the chemoradiotherapy ($p = 0.035$, HR = 1.72, CI = 1.03–2.86) and radiotherapy alone ($p = 0.049$, HR = 2.50, CI = 0.97–6.47) groups. | Yes |
| Li H et al. [15] | China | 2013 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 114 | 66–70 | XRCC1 (194Arg/Trp and 399Arg/Gln) | Blood | Cohort | - XRCC1 399Arg/Gln was associated with higher incidence of grade 3 oral mucosa toxicity, OR = 2.11 (95% CI: 0.951–4.66), $p = 0.065$. | Yes |
| Venkatesh et al. [16] | India | 2014 | Head and Neck | RT + CT | 183 | 60–70 | ATM, XRCC1, XRCC3, XRCC4, Ku70, Ku80, LIG4, OGG1, NBN, RAD51, TGFb1, SOD2, CAT, GST | Blood | Cohort | - There was no association of NBN (rs1805794) polymorphism in univariate and multivariate analysis with severe mucositis. | Yes |
| Yu J et al. [17] | China | 2016 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 188 | 66–70 | 7 SNPS Wnt/β-Catenin | Blood | Cohort | - APC rs454886 polymorphism (minor A allele) was associated with acute grade 3–4 radiation-induced oral mucositis in additive ($p = 0.045$) and recessive models ($p = 0.038$) after adjustment for BMI. | Yes |

**Table 1.** *Cont.*

| Author | Country | Year | Primary Sites | Possible Treatments | Number of Patients (n) | Dose (Gy) | Genes Accessed by the Studies | Sample | Type of Study | Main Conclusions | Mucositis as One of the Primary End Points |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Guo Z et al. [18] | China | 2017 | Nasopharynx | RT + CT | 505 | 68–72 | lncRNA *GAS5* | Blood | Cohort | - Slight relationship was found in the discovery stage between severe oral mucositis and rs2067079, as well as rs6790 ($p = 0.049$). - Patients of rs2067079 TT genotype receiving DP for IC regimen (TT vs. CC, OR = 3.031, $p = 0.047$) or CCRT regimen (TT vs. CC, OR = 21.882, $p = 0.043$) were subjected to high risk of oral mucositis. | Yes |
| Chen H et al. [19] | China | 2017 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 114 | 70–76 | Base repair XRCC1 Codon 399 SNP | Blood | Cohort | - The injury degree of acute radiation oral mucositis showed no significant difference ($p = 0.449$, 95% CI: 0.691–2.304). | Yes |
| Guo C et al. [20] | China | 2017 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 154 | 66–70 | 3 SNPS Cell cycle/5 SNPS NF-κB | Blood | Cohort | - CCND1 rs9344 was related to grade 3–4 acute radiation-induced oral mucositis in recessive model among patients <51 years old. | Yes |
| Le Z et al. [21] | China | 2017 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 24 | 66–70.4 | Genome-wide screening | Blood | Cohort | - The SNP rs11081899-A in ZN24 was significantly associated with an enhanced risk of severe mucositis (OR = 14.631, 95% CI = 2.61–105.46, $p = 1.2 \times 10^{-4}$). | |
| Ma W et al. [22] | China | 2017 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 180 | 66–77 | Angiogenesis-related genes 3 SNPS EDN1/3 SNPS EDNRA/2 SNPS VEGF | Blood | Cohort | - GT genotype in EDN1 rs1800541 was significantly associated with an elevated risk of developing grade 3+ oral mucositis ($p = 0.038$). | Yes |
| Reyes-Gibbi C [23] | USA | 2017 | Head and Neck | RT/RT + CT/Surgery + RT | NI | NI | Informative gene network analysis | x | X | - SNP in RB1 (rs2227311, $p$-value = 0.034, OR = 0.67) showed a protective effect for oral mucositis. | Yes |
| Borchiellini et al. [24] | France | 2017 | Head and Neck | RT/RT + CT | 122 | 60–70 | ERCC1/ERCC2/XRCC1/M2M | Diagnostic biopsy | Cohort | - G allele of MDM2 309 (genotypes TG or GG) or the Thr allele of ERCC1 251 (genotypes Lys/Thr and Thr/Thr) were associated with a higher risk of acute G3-4 DMEX. | No |
| Nanda S et al. [25] | India | 2018 | Oral cavity, pharynx, larynx | RT + CT | 101 | 66–70 | Base repair XRCC1 Arg194Trp | Blood | Cohort | - Polymorphic variant had higher grade > 2 oral mucositis, 35.8% vs. 16.0% (OR: 2.91; 95% CI 1.13–7.46; $p = 0.023$). | Yes |

**Table 1.** *Cont.*

| Author | Country | Year | Primary Sites | Possible Treatments | Number of Patients (n) | Dose (Gy) | Genes Accessed by the Studies | Sample | Type of Study | Main Conclusions | Mucositis as One of the Primary End Points |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Brzozowska et al. [26] | Poland | 2018 | Head and Neck | RT/RT + CT/Surgery + RT | 65 | 60–70 | GHRL | Blood | Cohort | - AA genotype was associated with 7-fold decrease in the risk of occurrence of intensified oral mucositis (grades 2 and 3) in the sixth week of RT. | Yes |
| Brzozowska et al. [27] | Poland | 2018 | Head and Neck | RT/RT + CT | 58 | 66–70 | TNFRSF1A | Blood | Cohort | - TT or GT genotype demonstrated higher risk of manifestation of grade 3 mucositis toxicity in 5th week of RT ($p = 0.041$; OR = 9.240; 95% CI: 1.101–77.581) compared to GG carriers. | Yes |
| Duran G et al. [28] | Spain | 2019 | Oral cavity, pharynx, larynx, unknown primary | RT + CT | 110 | 50–76 | ABCC1 | Blood | Cohort | - For rs1045642, patients with the variant T/T genotype showed higher acute mucositis than C/C or C/T genotype patients (47.1% vs. 24.1%; OR: 3.42; 95% CI: 1.04–11.21; $p = 0.042$ in a recessive model). | Yes |
| Yang Z et al. [29] | China | 2019 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 468 | 66–70 | Autophagy genes (*ATG*) | Blood | Cohort | - *ATG10* rs10514231 and *ATG16L2* rs10898880 were significantly associated with the occurrence of grade 3–4 oral mucositis. | Yes |
| Gupta A et al. [30] | India | 2019 | Oropharynx | RT/RT + CT | 179 | 66 | XRCC1/XRCC3/XRCC4/ XRCC6/ERCC4/Lig4/ATM | Blood | Cohort | - Homozygous AA genotype of XRCC1 (rs25487) and certain clinical characteristics are likely to develop severe acute mucositis ($p = 0.024$). | Yes |
| Mlak R et al. [31] | Poland | 2020 | Head and Neck | RT/RT + CT | 60 | 54–70 | (_135 T>C, rs767455) of TNFRSF1 A | Blood | Cohort | - SNP (_135 T>C) of the TNFRSF1 A gene may act as a predictor of OM occurrence in patients with HNC treated with IMRT. | Yes |
| Mlak R et al. [32] | Poland | 2020 | Head and Neck | RT/RT + CT | 62 | 66–70 | TNFα rs1799964 (-1211 T>C) | Blood | Cohort | - CC genotype was related to over 7-fold (OR = 7.33, 95% CI 1.120–44.96, $p = 0.031$) and 23-fold (OR = 23.15, 95% CI 1.24– 432.14, $p = 0.035$) higher risk of 3rd-degree OM development after the 5th and 7th week of RTH, respectively. | Yes |

**Table 1.** *Cont.*

| Author | Country | Year | Primary Sites | Possible Treatments | Number of Patients (n) | Dose (Gy) | Genes Accessed by the Studies | Sample | Type of Study | Main Conclusions | Mucositis as One of the Primary End Points |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Yang D et al. [33] | China | 2020 | Nasopharynx | RT/RT + CT | 1467 | 68–76 | Genome-wide association study | Blood | Cohort | - The SNP rs117157809 located in *TNKS* gene was associated with increased risk of oral mucositis (95% CI 2.10–6.57; $p = 6.33 \times 10^{-6}$). | Yes |
| Raturi V et al. [34] | Japan | 2020 | Larynx | RT + CT | 134 | 70 | XRCC1 Arg194Trp | Blood | Cohort | - XRCC-1 Arg194Trp polymorphism is significantly associated with oral mucositis ($p = 0.01$). | Yes |
| Quinghua L et al. [35] | China | 2021 | Head and Neck | RT/RT + CT | 500 | NI | Genome-wide association study | Blood | Cohort | - SNP rs1265081 in *CCHCR1* gene (allele A vs. C: OR = 1.41, 95% CIs = 1.08–1.86, $p = 0.012$) and rs3135001 (allele T vs. allele C: OR = 0.53, 95% CIs = 0.35–0.79, $p = 0.002$) were significantly associated with the occurrence of grade 3–4 oral mucositis. | |

### 3.3. Synthesis of Results

#### 3.3.1. Mucositis SNP-Associated Non-Proinflammatory Mediator-Regulated Genes

Among the 23 included articles, genes from several pathways were analyzed.

Eight studies assessed the relationship between acute toxicities and polymorphisms in genes related to DNA damage repair (Figure 1). The most frequently analyzed gene was XRCC1 (Figures 1 and 2). The DNA damage repair pathways had the highest number of genes studied (Figure 3). One article found no substantial association between SNPs in DNA repair genes and mucositis [13].

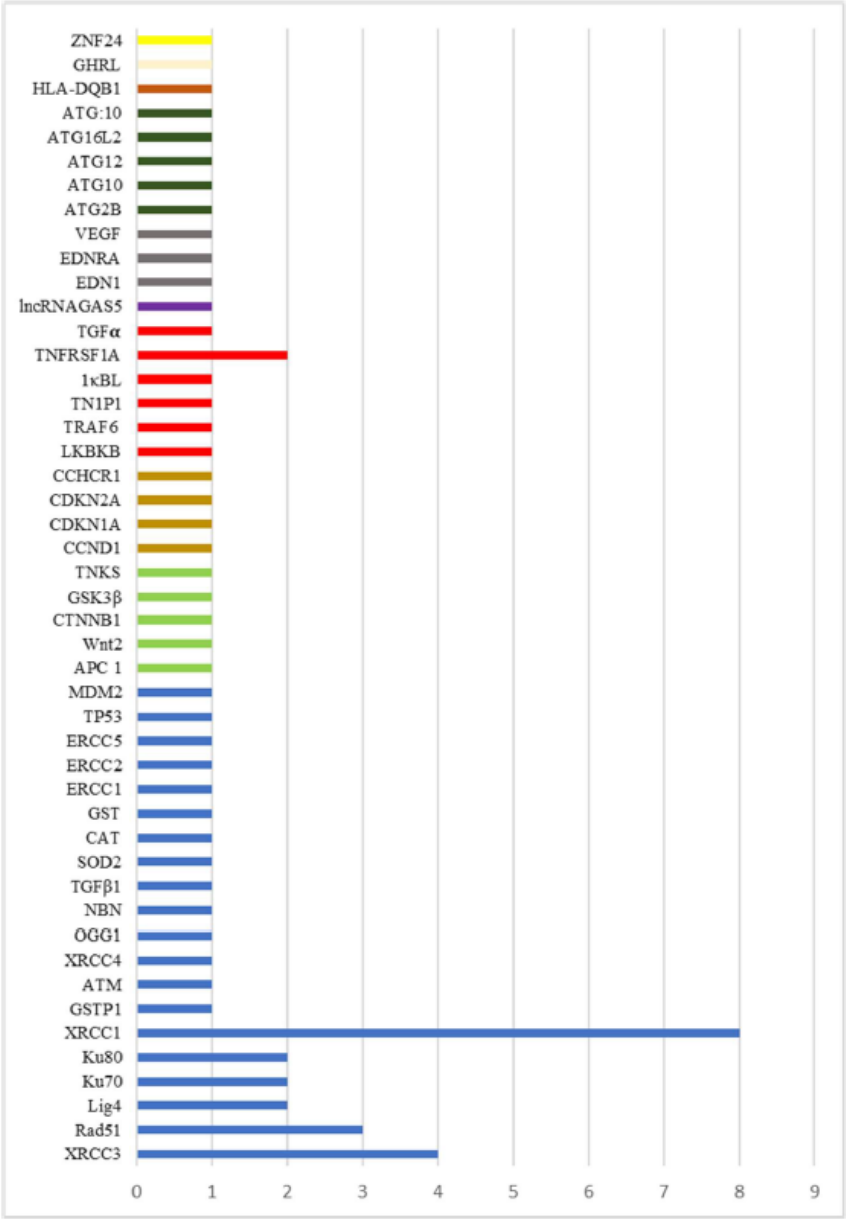



**Figure 1.** Frequency of genes in the included articles separated by colors. Blue: DNA repair genes. Green: Wnt/β-catenin. Brown: cell cycle. Red: inflammatory.

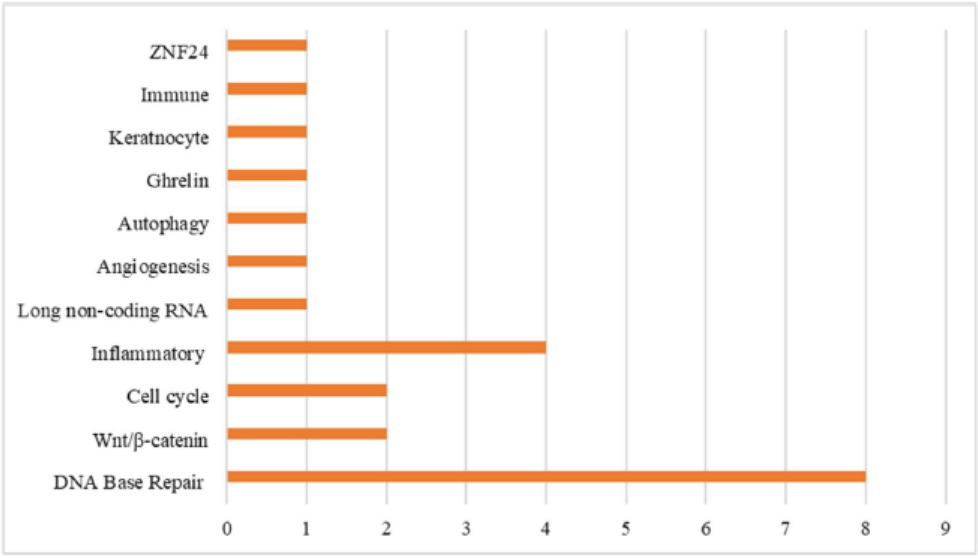



**Figure 2.** Frequency of different pathways in the included articles.

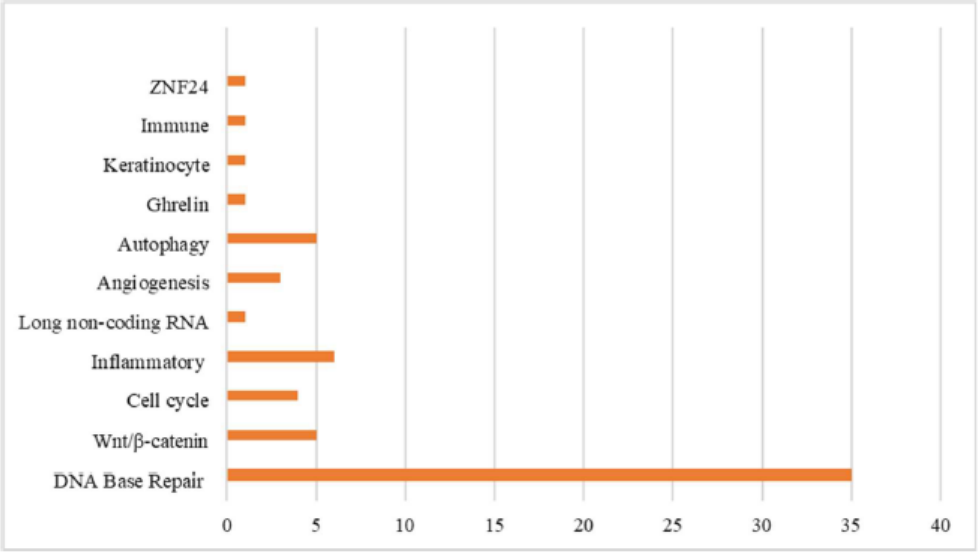



**Figure 3.** Number of genes studied in each pathway.

Three groups analyzed and established the relationship of an SNP at codon 399 of the *XRCC1* gene [23,30,34]. Chen et al. observed no significant difference in the severity of acute OM damage during RT between patients with different genotypes [19]. However, in one article there was a significant correlation ($p = 0.011$) [24] and in another a marginal correlation ($p = 0.065$) [15].

Three articles published results on the relationship between the Arg194Trp polymorphism in the *XRCC1* gene and clinical outcomes in patients with head and neck tumors. Li et al. showed the polymorphism was associated with a decreased incidence of grade 3 acute OM compared with the Arg/Arg allele, but with no statistical significance [15]. The other two articles concluded that the presence of SNP was significantly related to mucositis, $p = 0.023$ [25] and $p = 0.01$ [34].

Seven SNPs of four genes of the Wnt/β-catenin pathway were investigated. The rs454886 polymorphism of the adenomatous polyposis coli gene was correlated with grade 3–4 OM ($p = 0.045$) [17].

Additional studies have found a relationship between mucositis and SNPs in non-coding RNA pathways, in genes encoding ghrelin [26], in the *ABCC1* gene pathway [28], and in autophagy-related genes [29].

Four studies performed a genome-wide association analysis. They were included as they found a link between the occurrence of different polymorphisms and the potential risk of developing mucositis. One study was on the *CCHCR1* gene [35], the others on the *TNKSK* [33], *ZNF24* [21], and *RB1* [23] pathways.

#### 3.3.2. Mucositis SNP-Associated Proinflammatory Mediator-Regulated Genes

Previous data have established the association of inflammatory cytokines and their pathways in the development, maintenance, and intensity of acute mucositis. Clinical inflammatory conditions are preceded by increased levels of these cytokines. Four articles evaluated the relationship between SNPs in inflammatory cytokine pathways and mucositis (Figure 2).

The cytokine pathways evaluated were TNF, with three articles, and NF-κB, with one article. The TNF receptor, TNFR1, when activated, regulates an apoptotic pathway and may be involved in the development of mucositis. Two articles assessed SNPs in the promoter region of the gene encoding the receptor protein, TNFRSF1A, and showed a significant increase in the likelihood of grade 3 mucositis in the last weeks of RT in CC, TT, or GT genotype carriers [27,31]. The other article addressing the TNF pathway assessed the relationship between the SNP (-1211 T>C, rs1799964) in the *TNF-α* gene itself and the occurrence and intensity of OM [32].

Guo et al. chose five SNPs in the NF-κB pathway to determine whether they related to the likelihood of acute toxicity. There was no relationship between the polymorphisms and mucositis. However, in the same article, the authors also evaluated SNPs in cyclins, cell cycle regulatory proteins. CCND1 rs9344 was associated with grade 3–4 radiation-induced acute OM [20].

### *3.4. Study Risk of Bias and Quality Assessment*

All the references were individually assessed using the NOS tool, with a maximum score of nine. A total of 9 articles (39.1%) obtained a score of six, 11 (47.8%) a score of five. Three (13%) articles scored four, and only these were considered to be of fair quality (Supplementary Table S1).

## 4. Discussion

In recent years, much progress has been made in understanding the molecular pathways associated with the pathophysiology of diseases, as well as treatments and their adverse effects. In oncology, it is no different; several signaling pathways have been described, and the personalization of the diagnostic and therapeutic approach is a remarkable advance. The treatment of HNC based on RT combined with CT represents a possible cure for certain diseases that previously did not have curative surgical approaches, in addition to offering a chance of organ preservation in an anatomical region very sensitive to these changes [4]. One of the most common and debilitating toxicities, with the potential to compromise therapeutic outcomes related to this strategy, is mucositis [6].

Mucositis is a common and often debilitating side effect of cancer treatment that involves damage to the mucous membranes lining the gastrointestinal tract, particularly in the oral and oropharyngeal regions. It can be caused by CT, radiation therapy, or a combination of both, and can lead to a range of clinical and symptomatic manifestations, including erythema, ulceration, pain, and difficulty eating and drinking [36]. Mucositis can also increase the risk of infection and other complications [37]

Historically, mucositis was seen as a result of a direct action of RT or CT on the cells of the basal epithelial layer. However, this simple picture could not explain the complex interactions that started to be described in the submucosal layer. The concept that mucosal injury is a biological and multifactorial process is relatively new [6,7].

In 2004, Sonis et al. published a study describing the aspects of mucositis development as a dynamic process divided into phases, initially involving the generation of free radicals by direct action of RT and/or CT [7]. Their research showed that local damage triggers an inflammatory response, activating several biological pathways, including nuclear factor kappa-B (NF-kB). This transcription factor, which can also be directly activated by RT and/or CT, induces gene expression of proinflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), and tumor necrosis factor α (TNF-α), which are apparently increased in mucositis. TNF-α may engage in a positive feedback mechanism with NF-kB, increasing its concentration, and eventually producing a massive release of cytokines (proinflammatory cytokine storm), amplifying the process. The clinical condition then develops with the onset of disease-related signs and symptoms, such as ulcers. At this point, the patient is more susceptible to infections, which can prolong mucositis as the activation of macrophages can release more inflammatory cytokines [7].

Recent advances in molecular and cell biology have provided targets for mechanism-based interventions to prevent and treat mucositis. Normando et al. evaluated several biomarkers for their association with the development of OM, including epidermal growth factor, C-reactive protein, genetic polymorphisms, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), erythrocyte sedimentation rate, growth factors, acute-phase inflammatory markers, cytokines, general proteins, plasma antioxidants, apoptotic proteins, and cells. The meta-analysis showed an expression of polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and RAD51 genes, as well as an expression of protein biomarkers, in patients with an increased risk of developing OM. However, the effectiveness of these biomarkers in predicting mucositis risk and guiding treatment decisions is still under investigation [9].

Genetic polymorphisms can influence gene expression by affecting various regulatory elements within the genome. Among genetic polymorphisms, SNPs are the most common type of genetic variation in the human genome [10]. Several groups have studied the relationship between SNPs and different clinical outcomes. The development of the disease, the different responses to the therapies implemented, and the development of more intense adverse effects to the treatments may be related to the occurrence of specific SNPs. Searching for and establishing this relationship represents an area of study that could alter and personalize approaches to a wide range of conditions in different areas.

Recently, several studies have explored the relationship between SNPs and susceptibility to mucositis in cancer patients. In this systematic review, we analyzed the non-proinflammatory and proinflammatory genes regulated by SNPs in HNC patients undergoing RT and CT.

Proinflammatory cytokines play a decisive role in the development of mucositis [38]. The presence of polymorphisms in genes that code for proinflammatory proteins can lead to alterations, causing an increase in the release of cytokines and intensification of mucositis. Despite the preponderant role of inflammatory cytokines in the development of mucositis, to date few studies have been published demonstrating a relationship between SNPs in these pathways and this adverse effect. In our review, four publications studied SNPs in these pathways.

In the case of TNF, the process of apoptosis is regulated through the TNFR1 receptor. SNPs in the gene that codes for the receptor can alter its expression and function and be linked to adverse events [39]. Brzozowska et al. showed that the presence of the T allele in the TNFRSF1A gene is associated with an increased risk of manifestation of grade 3 OM in patients with HNC undergoing RT. The study found that patients with TT or GT genotypes demonstrated a higher risk of grade 3 OM manifestation at week five of RTH compared to GG carriers. The results indicate an association between the TNFRSF1A gene SNP (rs4149570) and the risk of more severe RT-related OM in patients with HNC [27].

In their work, Mlak et al. (2020) showed that the CC genotype of the TNFRSF1 A gene is associated with a more severe course of OM [31]. The SNP identified in this study is located in the regulatory region of the TNFRSF1 A gene. Specifically, it is the SNP (rs767455) that has been found to be involved in the regulation of TNFR1 protein expression and may potentially modulate the risk of OM in HNC patients treated with RT, and it is an independent prognostic factor of poor overall survival in HNC patients undergoing intensity-modulated radiation therapy. The TT genotype, in contrast, had an inverse protective effect. However, due to the limitations of the study, further research is needed to confirm these results.

Another inflammatory pathway studied was the NFKB transcription factor, which when activated causes up-regulation of genes that result in increased cytokine production. The κB kinase inhibitor gene IKBKB rs12676482 was related to grade 3–4 radiation-induced acute myelosuppression, but not to mucositis [18].

In the studies that have evaluated SNPs in non-inflammatory pathways, the most investigated have been alterations in DNA damage repair genes. DNA damage repair is a mechanism which is related to radiosensitivity in both tumor response and treatment-related adverse effects [40]. Normal tissues depend on this mechanism to recover between RT sessions from damage caused by RT, and alterations in this mechanism can exacerbate toxicities, increasing variability between individuals receiving the same treatment. The included articles evaluated polymorphisms in candidate genes previously related to radiosensitivity. The most common gene studied was XRCC1, which is associated with the ability to detect and repair three of the most common DNA errors: single-strand breaks; double-strand breaks, which have greater biological significance; and base excision repair [40]. The most frequently searched SNP was c1196A>G p.Gln399Arg [15,19,24].

The risk of bias and the quality of the articles were assessed using the NOS tool, which establishes points for pre-established criteria [12]. The articles generally have a similar design, reducing the possibility of bias. In general, the articles were considered to be of good quality and to have a low risk of bias, since most of them scored five or more. In all the publications, the control groups were not patients who had not been exposed to the treatment, but patients with milder toxicities, which is a characteristic of the study design. However, according to the NOS scale, it is not possible to score them in this respect. Another issue that is not specified in most references is the demonstration that the main outcome, mucositis, is not present at the start of the studies. It is understood that mucositis was not present before the start of RT, but when this is not specified, it cannot be scored using the scale.

This systematic review demonstrates that SNPs in different biological pathways have the potential to be biomarkers and to function as predictors of patients who will develop severe mucositis. The most studied biological pathway was that involving DNA damage repair genes. However, considering the involvement of cytokines and inflammatory pathways in the pathophysiology of mucositis, we believe that this is a promising area in the study of the prediction of this condition. As studies collect more robust data on biomarkers in different pathways, we will be closer to developing a more personalized treatment strategy for a clinical condition that is costly for healthcare systems and so debilitating for patients who already have a very challenging type of cancer.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers16050949/s1, Table S1: Risk of bias assessment.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.M.K. and H.F.d.O.; methodology, M.M.K. and R.C.; software, R.C.; validation, R.C., H.F.d.O. and M.M.K.; formal analysis, R.C. and T.L.d.S.; investigation, R.C.; resources, M.M.K.; data curation, M.M.K.; writing—original draft preparation, R.C.; writing—review and editing, R.C., H.F.d.O. and M.M.K.; visualization, R.C.; supervision, M.M.K. and H.F.d.O.; project administration, M.M.K.; funding acquisition, M.M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by FAPERJ (Fundação de 1 Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro E-26/211.221/2021).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Mody, M.; Rocco, J.; Yom, S.; Haddad, R.; Saba, N. Head and neck cancer. *Lancet* **2021**, *398*, 2289–2299. [CrossRef]
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
3. Wolf, G.; Fisher, S.; Hong, W.; Hilman, R.; Spaulding, M.; Laramore, G. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1685–1690. [PubMed]
4. Pignon, J.; Maillard, E.; Bourhis, J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother. Oncol.* **2009**, *92*, 4–14. [CrossRef] [PubMed]
5. Elting, L.S.; Cooksley, C.D.; Chambers, M.S.; Garden, A.S. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *68*, 1110–1120. [CrossRef] [PubMed]
6. Murphy, B.A.; Ridner, S.; Wells, N.; Dietrich, M. Quality of life research in head and neck cancer: A review of the current state of the science. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2007**, *62*, 251–267. [CrossRef]
7. Sonis, S.T. The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 277–284. [CrossRef]
8. Villa, A.; Sonis, S.T. Mucositis. *Curr. Opin. Oncol.* **2015**, *27*, 159–164. [CrossRef]
9. Normando, A.G.C.; Rocha, C.L.; de Toledo, I.P.; de Souza Figueiredo, P.T.; dos Reis, P.E.D.; De Luca Canto, G.; Guerra, E.N.S. Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Support. Care Cancer* **2017**, *25*, 2969–2988. [CrossRef]
10. Kruglyak, L.; Nickerson, D.A. Variation is the spice of life. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 234–236. [CrossRef]
11. Liberati, A.; Altman, D.G.; Tetzlaff, J.; Mulow, C.; Gotzsche, P.C.; Aloamidis, J.P.; Clarke, M.; Devereaux, P.J.; Kleijnen, J.; Moher, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: Explanation and elaboration. *Br. Med. J.* **2009**, *339*, b2700. [CrossRef]
12. Luchini, C.; Stubbs, B.; Solmi, M.; Veronese, N. Assessing the quality of studies in meta-analyses: Advantages and limitations of the Newcastle Ottawa Scale. *World J. Meta-Anal.* **2017**, *5*, 4. [CrossRef]
13. Werbrouck, J.; De Ruyck, K.; Duprez, F.; Veldeman, L.; Claes, K.; Van Eijkeren, M.; Boterberg, T.; Willems, P.; Vral, A.; De Neve, W.; et al. Acute Normal Tissue Reactions in Head-and-Neck Cancer Patients Treated With IMRT: Influence of Dose and Association with Genetic Polymorphisms in DNA DSB Repair Genes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *73*, 1187–1195. [CrossRef]
14. Pratesi, N.; Mangoni, M.; Mancini, I.; Paiar, F.; Simi, L.; Livi, L.; Cassani, S.; Buglione, M.; Grisanti, S.; Almici, C.; et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck câncer. *Radiother. Oncol.* **2011**, *99*, 356–361. [CrossRef]
15. Li, H.; You, Y.; Lin, C.; Zheng, M.; Hong, C.; Chen, J.; Li, D.; Au, W.W.; Chen, Z. XRCC1 codon 399Gln polymorphism is associated with radiotherapy-induced acute dermatitis and mucositis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Radiat. Oncol.* **2013**, 8. [CrossRef]
16. Venkatesh, G.H.; Manjunath, V.B.; Mumbrekar, K.D.; Negi, H.; Fernandes, D.J.; Sharan, K.; Banerjee, S.; Sadashiva, S.R.B. Polymorphisms in Radio-Responsive Genes and Its Association with Acute Toxicity among Head and Neck Cancer Patients. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89079. [CrossRef] [PubMed]
17. Yu, J.; Huang, Y.; Liu, L.; Wang, J.; Yin, J.; Huang, L.; Chen, S.; Li, J.; Yuan, H.; Yang, G.; et al. Genetic polymorphisms of Wnt/β-catenin pathway genes are associated with the efficacy and toxicities of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 82528–82537. [CrossRef]
18. Yu, J.; Huang, Y.; Liu, L.; Wang, J.; Yin, J.; Huang, L.; Chen, S.; Li, J.; Yuan, H.; Yang, G.; et al. Genetic polymorphisms of long non-coding RNA GAS5 predict platinum-based concurrent chemoradiotherapy response in nasopharyngeal carcinoma patients. *Oncotarget* **2017**, *8*, 62286–62297.
19. Chen, H.; Wu, M.; Li, G.; Hua, L.; Chen, S.; Huang, H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphism and acute radiation reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma A cohort study. *Medicine* **2017**, *96*, e8202. [CrossRef]
20. Guo, C.; Huang, Y.; Yu, J.; Liu, L.; Gong, X.; Huang, M.; Jiang, C.; Liao, Y.; Huang, L.; Yang, G.; et al. The impacts of single nucleotide polymorphisms in genes of cell cycle and NF-κB pathways on the efficacy and acute toxicities of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 25334–25344. [CrossRef]
21. Le, Z.; Niu, X.; Chen, Y.; Ou, X.; Zhao, G.; Liu, Q.; Tu, W.; Hu, C.; Kong, L.; Liu, Y. Predictive single nucleotide polymorphism markers for acute oral mucositis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy. *Oncotarget* **2017**, *8*, 63026–63037. [CrossRef]
22. Ma, W.L.; Liu, R.; Huang, L.H.; Zou, C.; Huang, J.; Wang, J.; Chen, S.J.; Meng, X.G.; Yang, J.K.; Li, H.; et al. Impact of polymorphisms in angiogenesis-related genes on clinical outcomes of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2017**, *44*, 539–548. [CrossRef]

23. Reyes-Gibby, C.C.; Melkonian, S.C.; Wang, J.; Yu, R.K.; Shelburne, S.A.; Lu, C.; Gunn, G.B.; Chambers, M.S.; Hanna, E.Y.; Yeung, S.C.J. Identifying novel genes and biological processes relevant to the development of cancer therapy-induced mucositis: An informative gene network analysis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180396. [CrossRef]
24. Borchiellini, D.; Etienne-Grimaldi, M.C.; Bensadoun, R.J.; Benezery, K.; Dassonville, O.; Poissonnet, G.; Llorca, L.; Ebran, N.; Formento, P.; Château, Y.; et al. Candidate apoptotic and DNA repair gene approach confirms involvement of ERCC1, ERCC5, TP53 and MDM2 in radiation-induced toxicity in head and neck cancer. *Oral Oncol.* **2017**, *67*, 70–76. [CrossRef]
25. Nanda, S.S.; Gandhi, A.K.; Rastogi, M.; Khurana, R.; Hadi, R.; Sahni, K.; Mishra, S.P.; Srivastava, A.K.; Bhatt, M.L.B.; Parmar, D. Evaluation of XRCC1 Gene Polymorphism as a Biomarker in Head and Neck Cancer Patients Undergoing Chemoradiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *101*, 593–601. [CrossRef]
26. Brzozowska, A.; Homa-Mlak, I.; Mlak, R.; Gołębiowski, P.; Mazurek, M.; Ciesielka, M.; Małecka-Massalska, T. Polymorphism of regulatory region of GHRL gene (-2531C>T) as a promising predictive factor for radiotherapy-induced oral mucositis in patients with head neck cancer. *Head Neck* **2018**, *40*, 1799–1811. [CrossRef]
27. Brzozowska, A.; Powrózek, T.; Homa-Mlak, I.; Mlak, R.; Ciesielka, M.; Gołębiowski, P.; Małecka-Massalska, T. Polymorphism of Promoter Region of TNFRSF1A Gene (−610 T > G) as a Novel Predictive Factor for Radiotherapy Induced Oral Mucositis in HNC Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2018**, *24*, 135–143. [CrossRef]
28. Duran, G.; Aguín, S.; Cruz, R.; Barros, F.; Giráldez, J.; Bernárdez, B.; López-López, R.; Carracedo, Á.n.g.e.l.; Lamas, M. Association of GSTP1 and ERCC1 polymorphisms with toxicity in locally advanced head and neck cancer platinum-based chemoradiotherapy treatment. *Head Neck* **2019**, *41*, 2704–2715. [CrossRef] [PubMed]
29. Yang, Z.; Liu, Z. Potentially functional variants of autophagy-related genes are associated with the efficacy and toxicity of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2019**, *7*, e1030. [CrossRef] [PubMed]
30. Gupta, A.; Mathew, D.; Ghoshal, S.; Pal, A. XRCC1 (rs25487) polymorphism is associated with severe oral mucositis and poor treatment response after radiotherapy for oropharyngeal carcinoma. *Oral Cancer* **2019**, *3*, 37–47. [CrossRef]
31. Mlak, R.; Powrózek, T.; Brzozowska, A.; Homa-Mlak, I.; Mazurek, M.; Gołębiowski, P.; Korzeb, D.; Rahnama-Hezavah, M.; Małecka-Massalska, T. Polymorphism of TNFRSF1 A may act as a predictor of severe radiation-induced oral mucositis and a prognosis factor in patients with head and neck cancer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2020**, *130*, 283–291.e2. [CrossRef]
32. Mlak, R.; Powrózek, T.; Brzozowska, A.; Homa-Mlak, I.; Mazurek, M.; Gołębiowski, P.; Sobieszek, G.; Małecka-Massalska, T. The relationship between TNF-α gene promoter polymorphism (−1211 T>C), the plasma concentration of TNF-α, and risk of oral mucositis and shortening of overall survival in patients subjected to intensity-modulated radiation therapy due to head and neck cancer. *Support. Care Cancer* **2020**, *28*, 531–540. [PubMed]
33. Yang, D.W.; Wang, T.M.; Zhang, J.B.; Li, X.Z.; He, Y.Q.; Xiao, R.; Xue, W.Q.; Zheng, X.H.; Zhang, P.F.; Zhang, S.D.; et al. Genome-wide association study identifies genetic susceptibility loci and pathways of radiation-induced acute oral mucositis. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 224. [CrossRef] [PubMed]
34. Raturi, V.; Hojo, H.; Bhatt, M.L.B.; Suhel, M.; Wu, C.T.; Bei, Y.; Nakamura, M.; Okumura, M.; Zhang, H.; Parmar, D.; et al. Prospective evaluation of XRCC-1 Arg194Trp polymorphism as bio-predictor for clinical outcome in locally advanced laryngeal cancer undergoing cisplatin-based chemoradiation. *Head Neck* **2020**, *42*, 1045–1056. [CrossRef] [PubMed]
35. Li, Q.; Liang, Y.; Liu, Z.; Yu, C. Associations of GWAS-Indentified risk loci with progression, efficacy and toxicity of radiotherapy of head and neck squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Pharmacogenomics Pers. Med.* **2021**, *14*, 1205–1210.
36. Peterson, D.E.; Keefe, D.M.S. New frontiers in mucositis. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2012**, 545–551. [CrossRef]
37. Cinausero, M.; Aprile, G.; Ermacora, P.; Basile, D.; Vitale, M.; Fanotto, V.; Parisi, G.; Calvetti, L.; Sonis, S. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 354. [CrossRef] [PubMed]
38. Bossi, P.; Bergamini, C.; Miceli, R.; Cova, A.; Orlandi, E.; Resteghini, C.; Locati, L.; Alfieri, S.; Imbimbo, M.; Granata, R.; et al. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated with Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *96*, 959–966. [CrossRef] [PubMed]
39. Kalliolias, G.D.; Ivashkiv, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 49–62. [CrossRef]
40. Huang, R.; Zhou, P. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 60. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.