

O Impacto do Polimorfismo rs20417 do Gene COX-2 no Câncer Oral

The Impact of the rs20417 COX-2 Gene Polymorphism on Oral Cancer

Rayana Soares de Andrade^a; Suene Moçato Siguematsu Abrão^a; Regina Célia Poli-Frederico^{*a}

^aUniversidade Anhanguera Unopar, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. PR, Brasil.

*E-mail: regina.frederico@cogna.com.br

Resumo

O câncer oral é uma doença crônica multifatorial que evolui a partir de fatores intrínsecos e extrínsecos. A relação entre a Cox-2 e os tumores malignos está estabelecida, porém há poucas evidências científicas que esclareçam totalmente a associação de variantes no gene COX-2 no desenvolvimento do câncer bucal. O objetivo desse estudo foi investigar a associação da variação genética -765G-C em COX-2 e o desenvolvimento de câncer bucal. Para tanto, foi coletada amostra de sangue periférico e extração de DNA de leucócitos em 48 pacientes portadores de lesões malignas bucais (carcinoma de células escamosas – CEC) e em 20 pacientes não portadores de câncer oral como grupo controle. Todos os participantes responderam questionário sobre hábitos alimentares, estilo de vida, local de nascimento, origem étnica dos pais, idade, ocupação e histórico familiar de câncer. A associação da variante G/C no gene COX-2 na região -765 foi determinada por meio da técnica PCR-RFLP. O resultado do presente estudo mostrou associação estatisticamente significativa entre o gênero, o tabagismo, as frequências genotípicas e alélicas do gene COX-2 e a presença de câncer de boca, principalmente em indivíduos do gênero masculino, portadores do genótipo GG e do alelo G. Por esse estudo conclui-se que a variante genética de COX-2 pode predispor o desenvolvimento de câncer bucal, principalmente se associado a fatores extrínsecos deletérios.

Palavras-chave: Polimorfismo Genético. Câncer de Boca. Cyclooxygenase

Abstract

Oral cancer is a multifactorial chronic disease that evolves from intrinsic and extrinsic factors. The relationship between Cox-2 and malignant tumors is established, but there is little scientific evidence that fully clarifies the association of variants in the COX-2 gene in the development of oral cancer. The objective of this study was to investigate the association of the -765G-C genetic variation in COX-2 and the development of oral cancer. To this end, a peripheral blood sample and DNA extraction from leukocytes were collected in 48 patients with oral malignant lesions (squamous cell carcinoma – SCC) and in 20 patients without oral cancer as a control group. All participants completed a questionnaire about eating habits, lifestyle, place of birth, ethnic origin of parents, age, occupation and family history of cancer. The association of the G/C variant in the COX-2 gene in the -765 region was determined using the PCR-RFLP technique. The results of the present study showed a statistically significant association between gender, smoking, genotypic and allelic frequencies of the COX-2 gene and the presence of oral cancer, mainly in males, carriers of the GG genotype and G allele. This study concludes that the genetic variant of COX-2 may predispose to the development of oral cancer, especially if associated with harmful extrinsic factors.

Keywords: Genetic Polymorphism. Oral Cancer. Cyclooxygenase 2

1 Introdução

A sexta principal causa de mortalidade por câncer em todo o mundo é o câncer oral (Motlokwa et al., 2022; Lu et al., 2022). Existem evidências de que os fatores de risco genéticos, epigenéticos e epidemiológicos, como tabagismo, consumo de álcool, etnia, predisposição genética e familiar, imunossupressão, vírus e radiação, estão associados ao câncer oral (Chang et al., 2019; Su et al., 2018, 2019, 2021; Yang et al., 2008).

A enzima ciclooxigenase (COX) transforma o ácido araquidônico em prostaglandinas em duas etapas catalíticas. Primeiro, adiciona oxigênio ao ácido araquidônico para formar prostaglandina G₂ instável (PGG₂); então, reduz o PGG₂ para prostaglandina H₂ (PGH₂), que pode então ser convertido em vários prostanóides, como prostaciclina,

prostaglandina D₂, ou tromboxano A₂ por meio de sintases específicas (Mendes; Carvalho; van der Waal, 2009). Um nível aumentado de expressão de COX-2 tem sido associado à carcinogênese (Hamakawa et al., 2008).

Estudos demonstraram que a cox-2 contribui na tumorigênese e em vários mecanismos celulares como a inibição da apoptose, aumento da angiogênese, aumento da capacidade de invasão, modulação inflamatória/imunossupressora e estímulo de células proliferativas (Mauro et al., 2010; Wang et al., 2014).

A superexpressão da proteína ciclooxigenase-2 (cox-2) tem sido observada em uma grande variedade de neoplasias (Mauro et al., 2010). Porém, em relação ao câncer bucal, ainda há poucas evidências científicas que associem os polimorfismos desse gene ao desenvolvimento de lesões

malignas intraorais. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo de determinar a associação entre o polimorfismo COX-2 -765G-C e a predisposição ao câncer oral.

2 Material e Métodos

2.1 Participantes de coleta de dados

Este estudo caso-controle foi realizado a partir de 68 amostras de conveniência, em que o sangue periférico e fragmentos de lesões neoplásicas bucais (CEC), primárias e não tratadas, foram coletados e o DNA extraído. Estes pacientes eram apresentaram câncer oral localizado na língua, orofaringe, trígono retromolar, mucosa, soalho, palato e lábio interno. As 48 amostras foram coletadas de pacientes com câncer de boca, constituindo o grupo experimental e as demais 20 amostras foram coletadas de pacientes não portadores de câncer bucal, constituindo o grupo controle.

A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética dos centros de coleta envolvidos (Hospital Erasto Gaertner de Curitiba, Hospital do Câncer de Londrina e Centro Odontológico Universitário Norte do Paraná) sob o número 037/10 – CAAE No. 0027.0.268.000-10. Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2 Análise genética

A análise genética seguiu o protocolo utilizado no estudo de Lin et al. (2008), com a aplicação da técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) para genotipagem no gene COX-2 (rs20417) -765G>C. O volume total de reagentes foi 10 µL que continham: 1 µl tampão 10X (25 mM TAPS (pH 9,3), 0,3 µl MgCl₂, 0,1µl dNTPs 200 mM, 0,1 µl do iniciador Reverse 5'CTCCTTGTTCCTGGAAAGAGACG-3', 0,1 µl do iniciador Foward 5'-ATTCTGGCCATCGCCGCTTC-3, 0,2 µl de TaqDNA polimerase (5 U / lI; Supertherm; Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, EUA), 8,2 µl água ultra-pura. Em cada PCR, foi utilizado um controle negativo (CN) sem DNA genômico para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação; e um controle positivo (CP) que consistiu em uma amostra previamente otimizada para a reação.

As reações de PCR foram conduzidas no termociclador da marca Labnet para a amplificação da região gênica de interesse de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 59 °C por 1 minuto e amplificação de 72 °C por 1 minuto. O final da amplificação foi a 72 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento a 4 °C.

A técnica RFLP foi aplicada para detecção do polimorfismo -765G > C do gene COX-2, utilizando BstUI como endonucleases de restrição específica. Os reagentes utilizados foram: 2 µl Tp Buffer 4, 0,7 µl de enzima de restrição BstUI, 2,3 µl de água ultra-pura, 1,0 µl produto da PCR. Essa mistura foi distribuída em microtubos de 0,2 ml com o produto da

PCR de cada amostra. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 8 horas.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, a 120 Volts por 45 minutos em temperatura ambiente, submerso em tampão de eletroforese (TBE 1X) com marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen).

A determinação do genótipo foi realizada a partir da análise do perfil de restrição, na qual as bandas de fragmentos de tamanho 134 e 23 bp indicaram a presença do genótipo homozigoto -765GG; os fragmentos de tamanho 157bp, o genótipo homozigoto -765CC, e os fragmentos de 765, 157, 134 e 23pb para presença do genótipo heterozigoto -765GC.

2.3 Análise estatística

Análises univariadas foram utilizadas para comparar prevalência genotípica e o perfil clínico dos pacientes. O teste do qui-quadrado foi aplicado para analisar as variáveis categóricas que foram distribuídas em frequências relativa e absoluta. Para as variáveis numéricas e a descrição foi feita na média e desvio padrão. A razão de chances foi calculada utilizando o intervalo de confiança de 95%. Foi considerado o valor de p<0,05 para significância estatística.

3 Resultados e Discussão

A amostra do estudo foi composta por 68 indivíduos com média de idade de 61,85 ± 10,9 anos. As principais características da amostra estão dispostas no Quadro 1, mostrando que 64% dos participantes do estudo eram do sexo masculino, 91,3% de cor branca, 61,6% fumantes, 63% eram portadores de câncer oral, e a frequência genotípica GG foi a mais prevalente (64,4%).

Quadro 1 - Caracterização das variáveis da população de estudo (n=73)

| Características | Nº | % |
|--------------------------|----|------|
| Sexo | | |
| Masculino | 47 | 64,4 |
| Feminino | 26 | 35,6 |
| Raça/cor da pele* | | |
| Branca | 42 | 91,3 |
| Outra* | 4 | 8,6 |
| Tabagismo | | |
| Fumante | 45 | 61,6 |
| Não Fumante | 28 | 38,4 |
| Câncer Oral | | |
| Presente | 46 | 63,0 |
| Ausente | 27 | 37,0 |
| Genótipo | | |
| GG | 47 | 64,4 |
| CC | 6 | 8,2 |
| CG | 19 | 26,0 |

* Outra = parda, preta, indígena ou amarela.

Fonte: dados da pesquisa.

O resultado do presente estudo mostrou associação

estatisticamente significativa entre o gênero, o tabagismo e as frequências genotípica e alélica do gene COX-2 e a presença de câncer de boca. Foi observado que 87% dos indivíduos do gênero masculino, 97,8% eram tabagistas e 84,8% dos portadores do genótipo GG e do alelo G tinham câncer de boca (Quadro 2). Adicionalmente, portadores do genótipo GG apresentaram 15,44 vezes mais chances de terem o câncer de boca (IC95%: 4,68-50,85; p=0,001) em relação aos que apresentaram o genótipo CC e GC. Os indivíduos do gênero masculino mostraram 19,05 vezes (IC95%: 5,65-64,22; p = 0,001) mais chances de apresentarem câncer de boca do que o gênero feminino.

Quadro 2 – Associação entre a frequência genotípica e alélica do polimorfismo -765>C no gene COX-2, sexo, gênero e tabagismo na população estudada

| Características | Câncer Oral | |
|------------------|-------------|--------------|
| | Ausente (%) | Presente (%) |
| Sexo | | |
| Masculino | 7 (25,9) | 40 (87) |
| Feminino | 20 (74,1) | 6 (13) |
| Tabagismo | | |
| Fumante | 0 (0) | 45 (97,8) |
| Não Fumante | 27 (100) | 1 (2,2) |
| Genótipo | | |
| CC | 0 | 6 (13) |
| GG | 8 (29,6) | 39 (84,8) |
| CG | 19 (70,4) | 0 (0) |
| Alelo | | |
| C | 19 (35,2) | 12 (13,3) |
| G | 35 (64,8) | 78 (86,7) |

Fonte: dados da pesquisa.

A enzima COX-2 é responsável pela conversão do ácido aracônico em prostaglandina. Sua ação é induzível por inúmeros mediadores presentes no processo inflamatório. Estudos evidenciaram significativo aumento da expressão da COX-2 em vários tipos de neoplasia, sobretudo as epiteliais, incluindo o câncer oral. O polimorfismo de único nucleotídeo com a troca de uma guanina por uma citosina na posição -765 do gene COX2 tem sido descrito como fator de aumento de risco da ocorrência de câncer oral (Lin et al., 2008), pois a enzima COX2 desempenha uma função importante no desenvolvimento e progressão do câncer de boca nos seres humanos, através da inibição da apoptose, promovendo crescimento do tumor, angiogênese, invasão e metástase (Barrera; Cepeda; Parras, 2024).

Os resultados deste estudo evidenciaram associação do alelo polimórfico G e câncer oral, pois os indivíduos portadores do genótipo GG (IC95%: 4,68-50,85; p=0,001) apresentaram 15,44 vezes mais chances de apresentar câncer de boca do que aqueles que apresentam o genótipo CC, que é considerado um fator de proteção. Ressalta-se que, esse polimorfismo ocorre na região promotora do gene, resultando em um possível aumento da expressão gênica com consequente elevação dos níveis da proteína COX-2 (Szczeplik; Sana; Szczeplik, 2004).

Quanto ao polimorfismo do gene COX2, os resultados deste estudo estão compatíveis com estudos prévios feitos por Lin et al., (2008); Pandey et al., (2008), Amirchaghmaghi; Mohtasham e Mozaffari (2012), assim como na meta-análise realizada por Wang et al. (2014), mostrando que a superexpressão do gene COX-2 pode estar associada com a patogênese do câncer oral e com um pior prognóstico em pacientes com essa neoplasia. No entanto, Sano (2008), sugere que a COX2 local pode ser afetada pela inflamação sistêmica e que o impacto prognóstico da expressão da COX2 depende dos fatores do hospedeiro e das características do tumor.

Neste contexto, em um estudo feito por Cacina et al. (2018), envolvendo um total de 114 casos de carcinoma espinocelular da cavidade oral e 165 indivíduos saudáveis, o polimorfismo -765C no gene COX-2 indica ser um importante fator preditivo e ser um biomarcador prognóstico para o risco de carcinoma espinocelular na cavidade oral.

No Brasil são escassos os estudos de polimorfismos do COX-2 e a ocorrência de tumores envolvendo a cavidade bucal, sendo este trabalho um dos primeiros relatos que comparam a suscetibilidade ao câncer. Nesse contexto, este estudo contribui para a caracterização da associação do polimorfismo do gene COX-2 com o câncer bucal na população brasileira.

Frejborg, Salo e Salem (2020) relatam que alvos terapêuticos promissores para o câncer de cabeça e pescoço e melhores resultados clínicos dos pacientes podem ser encontrados por meio de mais estudos em modelos in vitro e in vivo sobre o papel da COX-2 no câncer oral.

A pesquisa a respeito dos polimorfismos genéticos pode proporcionar avanços significativos futuros, pois possibilitará a identificação dos indivíduos mais suscetíveis ao risco de tumores, permitindo individualização na terapêutica com finalidade de minimizar o risco de mortalidade e mutilação.

4 Conclusão

Conclui-se que o polimorfismo -765G > C do gene COX-2 desempenha um importante papel na predisposição e no desenvolvimento de câncer oral, principalmente em pacientes portadores do genótipo GG. Além disso, foi possível concluir que pacientes portadores desse polimorfismo com estilo de vida pouco saudável são ainda mais suscetíveis a desenvolver câncer oral.

Referências

- AMIRCHAGHMAGHI, M.; MOHTASHAM, N.; MOZAFFARI, P.M. Comparison of COX2 Expression between Oral Squamous Cell Carcinoma, Leukoplakia and Normal Mucosa. *J. Contemp. Dent. Pract.*, v.13, n.2, p.205-209, 2012. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1122.
- BARRERA, S.D.; CEPEDA, L.J.; PARRAS, J.E. The importance of cyclooxygenase in dentistry: a narrative. *Braz. J. Oral Sci.*, v.23, p.e241181, 2024. doi: <https://doi.org/10.20396/bjos.v23i00.8671181>
- CACINA, C. et al. The COX2 genetic variants in oral squamous cell carcinoma in Turkish population. *Cell. Mol. Biol.*

- (Noisy-le-grand), v.64, n.14, p.96-100, 2018. doi: 10.14715/cmb/2018.64.14.16
- CHANG, Y.A. et al. Three-MicroRNA signature as a potential biomarker for the early detection of oral cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, p.758, 2018. doi: 10.3390/ijms19030758.
- FREJBORG, E.; SALO, T.; SALEM, A. Role of Cyclooxygenase-2 in Head and Neck Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.*, v.21, n.23, p.9246, 2020. doi: 10.3390/ijms21239246.
- HAMAKAWA, H. et al. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck.*, v.30, p.800-809, 2008. doi: 10.1002/hed.20830.
- LIN, Y.C. et al. Polymorphisms of COX-2-765G> C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol.*, v.44, n.8, p.798-804, 2008. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.10.006.
- LU, H.J. et al. Preoperative prediction model to evaluate salvage surgery in patients with recurrent or second primary oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, v.131, p.5951, 2022. doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.105951
- MAURO, A. et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in normal and pathological human oral mucosa. *Folia Histochem. Cytobiol.*, v.48, n.4, p.555-563, 2010. doi: 10.2478/v10042-010-0066-3.
- MENDES, R.A.; CARVALHO, J.C.; VAN DER WAAL, I. An overview on the Expression of Cyclooxygenase-2 in Tumors of the Head and Neck. *Oral Oncol.* v.45, p.124-128, 2009. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.03.016.
- MOTLOKWA, P.K. et al. Disparities in oral cancer stage at presentation in a high hiv prevalence setting in Sub-Saharan Africa. *JCO Glob Oncol.*, v.8, p.e2100439, 2022. doi: 10.1200/GO.21.00439.
- PANDEY, M. et al. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.37, n.4, p.379-383, 2008. doi: 10.1016/j.ijom.2008.01.004.
- SU, S.C. et al. Impact of HOTAIR Gene Polymorphism and Environmental Risk on Oral Cancer. *J. Dent. Res.*, v.97, p.717-724, 2018. doi: 10.1177/0022034517749451.
- SU, C.W. et al. Loss of TIMP3 by promoter methylation of Sp1 binding site promotes oral cancer metastasis. *Cell. Death Dis.*, v.10, p.793, 2019. doi: 10.1038/s41419-019-2016-0.
- SU, S.C. et al. Oral microbial dysbiosis and its performance in predicting oral cancer. *Carcinogenesis.*, v.42, p.127-135, 2021. doi: 10.1093/carcin/bgaa062.
- SZCZEKLIK, W.; SANAK, M.; SZCZEKLIK, A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.114, n.2, p.248-253, 2004. doi: 10.1016/j.jaci.2004.05.030.
- WANG, Z.M. et al. Abnormal COX2 Protein expression may be correlated with poor prognosis in oral cancer: a meta-analysis. *Biomed Res. Int.*, v.2014, p.364207, 2014. doi: 10.1155/2014/364207
- YANG, S.F. et al. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol.*, v.53, p.287-294, 2008. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.09.001.