

## INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO Arg194Trp DO GENE XRCC1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CÂNCER DE CAVIDADE ORAL NO ESPÍRITO SANTO

### *INVESTIGATION OF THE Arg194Trp POLYMORPHISM OF THE XRCC1 GENE AND ITS ASSOCIATION WITH ORAL CANCER IN ESPÍRITO SANTO*

Júlia Ferreira de Araújo<sup>1</sup>

Lucas André Silva Bonela<sup>2</sup>

Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler<sup>3</sup>

Melissa de Freitas Cordeiro Silva<sup>4</sup>

**RESUMO:** O câncer oral representa o 16° câncer mais comum no mundo e o 15° que mais mata em ambos os sexos. No Brasil são estimados 15.100 novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025 e 360 casos no Espírito Santo. Apesar dos avanços no tratamento do carcinoma epidermóide oral (CEO), o prognóstico permanece desfavorável com taxas de sobrevida global de até 60%. Além de fatores extrínsecos, alterações genéticas como polimorfismos podem estar relacionadas ao desenvolvimento deste câncer. Com isso, este estudo objetivou investigar a associação do polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1 com o câncer oral no Espírito Santo, Brasil. Foram analisados, através da técnica de PCR-RFLP, o material genético de 107 indivíduos, sendo 44 pacientes com CEO e 63 controles para obtenção de informações acerca da presença deste polimorfismo. Como resultado, o genótipo CC foi encontrado em 84,1% dos controles e 65,9% dos casos, caracterizando os homozigotos selvagens. O genótipo CT foi mais encontrado entre os casos, com 34,1% e 14,3% dos controles, caracterizando os heterozigotos, entretanto o genótipo TT se mostrou incomum, sendo observado somente em um dos controles. O valor de  $p=0,041$  se mostrou estatisticamente significativo, indicando que a presença do alelo T em um dos genes pode ter um papel importante no câncer oral. Portanto, os valores significativos deste estudo, em relação à frequência do polimorfismo Arg194Trp (C26304T) do gene XRCC1 e sua associação ao câncer oral no Espírito Santo, sugerem que indivíduos heterozigotos podem apresentar maior suscetibilidade ao câncer.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; Câncer oral; PCR-RFLP.

<sup>1</sup>Centro Universitário Salesiano - UniSales. Vitória/ES, Brasil. [juliaferreira.de@gmail.com](mailto:juliaferreira.de@gmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN. Vitória/ES, Brasil. [lucasbonela7@gmail.com](mailto:lucasbonela7@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Vitória/ES, Brasil. [sandra.zeidler@ufes.br](mailto:sandra.zeidler@ufes.br)

<sup>4</sup>Centro Universitário Salesiano - UniSales. Vitória/ES, Brasil. [mcordeiro@salesiano.br](mailto:mcordeiro@salesiano.br)

**ABSTRACT:** Oral cancer is the 16th most common cancer worldwide and the 15th leading cause of cancer death in both sexes. In Brazil, an estimated 15,100 new cases are expected each year from 2023 to 2025, with 360 cases in Espírito Santo. Despite advances in the treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC), the prognosis remains unfavorable, with overall survival rates as low as 60%. In addition to extrinsic factors, genetic alterations such as polymorphisms may be related to the development of this cancer. Therefore, this study aimed to investigate the association of the Arg194Trp polymorphism of the XRCC1 gene with oral cancer in Espírito Santo, Brazil. The genetic material of 107 individuals was analyzed using the PCR-RFLP technique, including 44 patients with oral cancer and 63 controls, to obtain information about the presence of this polymorphism. As a result, the CC genotype was found in 84.1% of the controls and 65.9% of the cases, characterizing wild-type homozygotes. The CT genotype was more frequently found among the cases, with 34.1%, and 14.3% of the controls, characterizing heterozygotes; however, the TT genotype was uncommon, being observed in only one of the controls. The p-value of 0.041 was statistically significant, indicating that the presence of the T allele in one of the genes may play an important role in oral cancer. Therefore, the significant values of this study, regarding the frequency of the Arg194Trp (C26304T) polymorphism of the XRCC1 gene and its association with oral cancer in Espírito Santo, suggest that heterozygous individuals may have a greater susceptibility to cancer.

**Keywords:** Polymorphism; Oral cancer; PCR-RFLP.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer consiste em um dos maiores problemas de saúde pública e econômica do mundo, sendo responsável pela morte de uma a cada seis pessoas (Bray *et al.*, 2024). Dentre os diversos tipos de cânceres, as neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço destacam-se pela elevada incidência, ocupando a posição de sétimo câncer mais prevalente no mundo e um dos mais agressivos, sendo responsáveis por mais de 870 mil novos casos e 440 mil mortes a cada ano (Thakral *et al.*, 2024).

O tipo histológico mais frequente na região de cabeça e pescoço é o carcinoma de células escamosas, presente em 90% dos sítios anatômicos como laringe, faringe e cavidade oral (Thakral *et al.*, 2024). A cavidade oral é o sítio mais frequentemente acometido por estes tumores e, somente em 2022, foram registrados 389.846 novos casos e 188.438 mortes por câncer oral no mundo, com estimativa de 15.100 novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025 no Brasil e 360 casos no Espírito Santo (INCA, 2022; IARC, 2024).

Apesar dos avanços no tratamento destes tumores, o prognóstico permanece desfavorável, com casos de recidiva e taxas de sobrevida global de 50% a 60% (Gupta *et al.*, 2024). Ademais, o conhecimento acerca do câncer oral e seus fatores de riscos diferem entre países em desenvolvimento e desenvolvidos, corroborando para um diagnóstico tardio e comprometendo a eficácia do tratamento (Kijowska *et al.*, 2024).

O tabagismo e etilismo são os principais fatores de risco para o câncer oral e, quando associados, atuam sinergicamente aumentando o potencial carcinogênico de forma

considerável. Além disso, uma dieta com baixo valor nutricional também tem sido associada ao desenvolvimento destes tumores (Kijowska *et al.*, 2024).

Ademais, polimorfismos em genes de reparo do DNA possuem um papel importante na suscetibilidade ao câncer oral, já que apresentam uma função fundamental em reparar mutações ocasionadas por fatores ambientais, como hábitos de vida associados a este câncer (Tata; Kshirsagar; Nangare, 2022). Dessa forma, a associação de fatores ambientais atrelados a pré-disposição genética individual pode induzir danos ao DNA por modificar a estrutura e função de enzimas dos sistemas de reparo (Gupta *et al.*, 2024).

Estudos apontam que a redução da capacidade de reparo do DNA causada pela presença de polimorfismos genéticos é crescente e está relacionada ao aumento do risco de câncer oral. Dessa forma, o gene XRCC1, o qual codifica a Proteína 1 Complementadora Cruzada de Reparo de Raios X (XRCC1), mostra-se significativo nesse processo. Além disso, sua combinação com o gene XRCC4 tem sido descrita como um potencial biomarcador para o câncer de cavidade oral (Tata; Kshirsagar; Nangare, 2022).

O gene XRCC1 está envolvido em algumas vias de reparo do DNA, como a via de reparo por excisão de bases (*base excision repair, BER*) e reparo de quebra de fita simples (*single-strand break repair, SSB*). Os mecanismos de reparo de DNA são ativados quando ocorrem danos ao material genético e esse processo recruta enzimas que, em conjunto, realizam e otimizam a inserção dos nucleotídeos corretos aos locais da mutação, acelerando esse processo (London, 2020).

Entretanto, alterações na via de reparo por excisão de bases podem elevar o risco do câncer, evidenciando que falhas neste sistema contribuem para o acúmulo de mutações que podem ativar proto-oncogenes e inativar genes supressores de tumores (Grundy; Parsons, 2020; Sinkala, 2023). Com isso, a detecção precoce de polimorfismos, atrelados a alterações moleculares, se apresenta como um método potencial para identificar indivíduos com maior risco de desenvolver câncer oral, podendo contribuir para o diagnóstico em estágio inicial e conseqüentemente a um melhor prognóstico (Tata; Kshirsagar; Nangare, 2022).

Portanto, a possibilidade de avaliar essas alterações genéticas e moleculares precoces pode aumentar as chances de um diagnóstico de doença em fase inicial, melhorando o prognóstico do paciente. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação do polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1 (C26304T) e o risco de carcinoma epidermóide oral (CEO) em 44 pacientes e 63 controles.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL (CEO)

O CEO se caracteriza como uma neoplasia maligna originada do epitélio de revestimento da cavidade oral e lábio, representando 90% dos tumores desta região. Os subsítios mais comumente afetados, categorizados a partir da Classificação Internacional de Doenças (CID), são o lábio inferior, assoalho da boca e língua (Su *et al.*, 2021).

A exposição da mucosa oral a agentes carcinogênicos, em especial aqueles provenientes da combustão do tabaco e consumo de bebidas alcoólicas, pode levar à transformação de células epiteliais e iniciar o processo de tumorigênese. Nas fases iniciais é possível observar o surgimento de distúrbios com potencial de transformação maligna (*oral potentially malignant disorders*, OPMDs), como a leucoplasia (placa branca) e a eritroplasia (placa ou mancha vermelha). Estas lesões podem apresentar graus variados de displasia intraepitelial oral e são identificadas por seu potencial de se transformarem em carcinoma epidermóide invasivo (Gupta *et al.* 2024; Su *et al.* 2021).

Esse processo que leva ao câncer consiste em uma progressão multifacetada que acarreta uma série de alterações genéticas e associadas a fatores epigenéticos em genes com funções reguladoras do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA (Gupta *et al.* 2024). As células tumorais sofrem diversas alterações, como a sustentação da sinalização do crescimento celular, seguida da evasão a inibidores de crescimento, resistência a apoptose, fenótipo de imortalidade, indução da angiogênese e ativação dos mecanismos de invasão e metástase. Esses eventos são decorrentes das transformações celulares e podem levar à instabilidade genômica, favorecendo o acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas que facilitam o avanço do câncer e a manutenção do processo inflamatório (Hasegawa *et al.*, 2023).

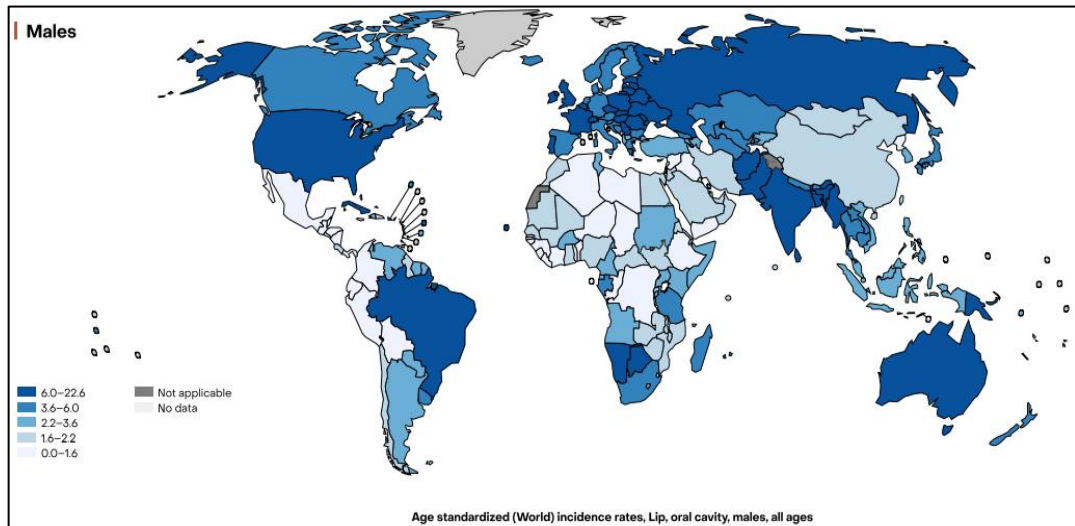
## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é um importante problema de saúde pública neste século. Com elevada mortalidade, as neoplasias malignas são responsáveis pelo óbito de uma a cada seis pessoas (16,8%) na população em geral e um a cada quatro indivíduos (22,8%) com doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), globalmente. Além de provocar a morte prematura de três a cada 10 indivíduos, principalmente entre a faixa etária de 30 a 69 anos, e estar entre as três maiores causas de morte nesta mesma faixa etária em 177 de 183 países (Bray *et al.*, 2024).

O câncer de cabeça e pescoço é o sétimo tipo de câncer mais frequente na população mundial, podendo afetar sítios anatômicos como cavidade oral, lábio, faringe, seios paranasais e glândulas salivares. São registrados anualmente mais de 890.000 novos casos, cerca de 4,5% dos diagnósticos de câncer no mundo, e 450.000 óbitos, em torno de 4,6% das mortes por câncer mundialmente (Barsouk *et al.*, 2023).

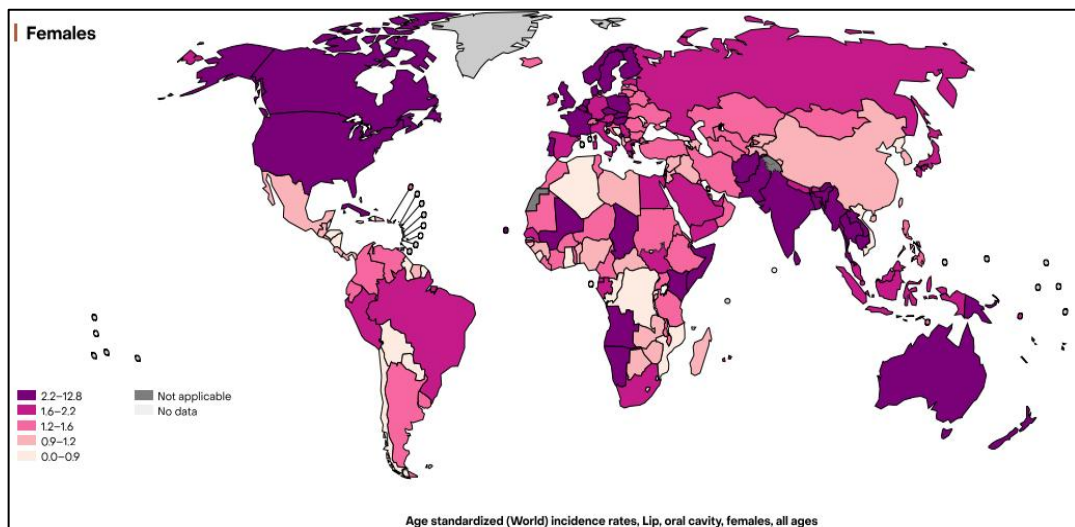
De acordo com o GLOBOCAN, em 2022 a estimativa dos 36 tipos de cânceres obtidas a partir de dados de 185 países, classificaram o câncer de cavidade oral como o 16º mais frequente no mundo com 389.485 novos casos. Além da elevada frequência, estes tumores são classificados na 15ª posição em termos de mortalidade, com 188.230 óbitos em ambos os sexos, com predomínio em homens, como pode ser observado nas figuras 1 e 2 (Bray *et al.* 2024).

Figura 1: Mapa global da incidência de câncer de lábio e cavidade oral entre homens de todas as idades.



Fonte: GLOBOCAN, 2022.

Figura 2: Mapa global da incidência de câncer de lábio e cavidade oral entre mulheres de todas as idades.



Fonte: GLOBOCAN, 2022.

O câncer de cabeça e pescoço, além de ser uma preocupação global, apresentando altas taxas de incidência e mortalidade, tem sido relacionado a indicadores de vulnerabilidade social, estando frequentemente associado a condições socioeconômicas e sociodemográficas menos favoráveis. Em consonância com a literatura, casos de câncer de cabeça e pescoço têm sido mais observados em homens com idade superior a 50 anos, de cor parda e com menor nível socioeconômico (Barsouk *et al.* 2023).

Fatores sociodemográficos, relacionados à localização geográfica, são descritos como variáveis para a ocorrência de câncer oral, já que este afeta uma população, em

sua maioria, situada em países em desenvolvimento, afetando indivíduos com pouco ou nenhum conhecimento relacionado ao câncer oral, expostos a fatores de riscos, como etilismo e tabagismo, justificando os maiores índices de CEO e reforçando a necessidade de estratégias de intervenção (Sarode *et al.*, 2020).

## 2.3 FATORES DE RISCOS

### 2.3.1 Consumo de bebidas alcoólicas

O etanol é tido como um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento do câncer de cavidade oral e de diversos outros tipos de cânceres. Durante o metabolismo do etanol, são gerados produtos considerados carcinogênicos, em especial o acetaldeído, primeiro produto desse metabolismo, o qual é classificado como um carcinógeno do grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC) (Nokovitch *et al.*, 2023).

O metabolismo do etanol se dá através da enzima álcool desidrogenase (ADH), pela via citocromo P4502E1 (CYP2E1), transformando etanol em acetaldeído (AA), que é metabolizado pela enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH) e transformado em acetato, que não é considerado um produto tóxico. Já o acetaldeído, quando gerado, provoca adutos de DNA, moléculas que se ligam a carcinógenos, inibindo o reparo do material genético e danificando o sistema antioxidante (Kijowska *et al.*, 2024).

Ademais, a oxidação do etanol pelo CYP2E1 é descrita como formadora de espécies reativas de oxigênio (ERO), a qual leva a modificações no DNA, que o sistema de defesa antioxidante, por ser afetado, não consegue evitar (Kijowska *et al.* 2024). O etanol também age como um solvente para outros carcinógenos, aumentando as chances de mutação por agentes provenientes do tabaco e nitritos, os quais são cancerígenos. Dito isso, é possível destacar ainda que a associação entre o consumo de bebidas alcoólicas e o tabaco contribuem efetivamente para o maior risco do aparecimento de OPMD e câncer oral (Barsouk *et al.* 2023).

### 2.3.2 Tabaco

O tabaco é um dos principais fatores relacionados ao CEO. Classificado como um carcinógeno do grupo 1 pela IARC, assim como o etanol, o tabaco em todas as suas formas, como fumo, rapé ou mascado é dito como um potencial carcinógeno para o desenvolvimento do câncer oral entre homens e mulheres (Nokovitch *et al.* 2023). Diversos componentes químicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aminas aromáticas e aldeídos, são liberados durante a combustão do tabaco e possuem capacidade de provocar mutações no DNA das células levando ao câncer (Barsouk *et al.* 2023).

Além de alterações no material genético que favorecem o desenvolvimento do câncer, o tabaco está relacionado a um pior prognóstico e menor sobrevida entre os pacientes com câncer que não interrompem o uso durante o tratamento oncológico, em relação a pacientes que nunca fumaram ou são ex-fumantes. Com isso, entende-se que o

tabagismo possui tanto efeitos cumulativos, associadas a progressão tumoral, como efeitos agudos favoráveis à permanência do câncer (De La Iglesia *et al.*, 2020).

O tabaco foi considerado fator causal para os tumores de cavidade oral e de faringe em 70% dos casos registrados no Reino Unido, apesar de países desenvolvidos terem apresentado queda no uso de tabaco nas últimas décadas, e em países em desenvolvimento o consumo do tabaco é um fator ainda mais preocupante (Barsouk *et al.* 2023).

### 2.3.3 Dieta

A alimentação pobre em vegetais, carotenóides e frutas, além da adoção de uma dieta pró-inflamatória, são descritos como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, incluindo o câncer oral. Esses alimentos podem elevar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, atuando como promotores no processo de tumorigênese. Desse modo, carne processada e embutidos, açúcar e alimentos industrializados estão relacionados ao maior risco para o CEO (Nokovitch *et al.* 2023; Kijowska *et al.* 2024).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

O câncer de boca, quando diagnosticado precocemente (estádios I e II) apresenta chances de cura que podem passar de 80%. No entanto, a maioria dos casos são diagnosticados em estágios avançados (estádios III e IV), os quais apresentam sobrevida em 5 anos de até 50%. Desse modo, torna-se imprescindível a detecção das OPMD e o diagnóstico precoce de lesões iniciais, a fim de que possa ser realizado o monitoramento e tratamento oportuno (Su *et al.* 2021).

O diagnóstico é feito pela inspeção visual que consiste em um procedimento clínico para reconhecer lesões precursoras e iniciais mais comuns da mucosa oral, destacando as leucoplasias, eritroplasias e úlceras persistentes (Su *et al.* 2021; Pekarek *et al.*, 2023). Após identificação de lesões suspeitas deve ser feita a biópsia incisional, procedimento considerado padrão ouro para análise histológica e confirmação do diagnóstico clínico (Chaurasia; Alam; Singh, 2021).

## 2.5 PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

Os protocolos para tratamento do câncer são decididos a partir da avaliação do tipo histológico, sítio anatômico do tumor primário e estadiamento clínico do tumor (Sistema TNM de Classificação das Neoplasias Malignas, *American Joint Committee on Cancer*) (National Cancer Institute, 2024).

As modalidades terapêuticas com finalidade curativa incluem a cirurgia e radioterapia exclusivas ou as modalidades combinadas de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Grande parte dos tumores diagnosticados em estágio I e II são tratados com uma única modalidade, em geral cirurgia ou radioterapia. Em contrapartida, tumores em estágios III e IV, em geral, necessitam de tratamento multimodal (Arboleda *et al.*, 2023).

A cirurgia consiste no método de tratamento curativo de grande significância, principalmente para tumores diagnosticados precocemente. No entanto, a presença de comorbidades e tumores com estadiamento clínico avançado demandam uma combinação de modalidades terapêuticas com impacto direto no prognóstico do paciente. O câncer oral, se diagnosticado e tratado nos estádios iniciais, reduz o risco de metástases e o impacto do tratamento na morbidade do indivíduo, apresentando melhor prognóstico (Oliveira *et al.*, 2020).

Ademais, o uso de biomarcadores para monitoramento apresenta-se como ferramenta importante para prever o prognóstico e direcionar tratamentos personalizados, considerando as características tumorais e individuais (Li *et al.*, 2024).

## 2.6 POLIMORFISMOS DO GENE XRCC1 E CEO

O DNA é constantemente exposto a agentes potencialmente danosos, como metabólitos, radiação ionizante, luz ultravioleta e alterações geradas por erros de replicação, tanto provenientes de fatores endógenos quanto exógenos. As mutações provocadas por esses agentes podem aumentar consideravelmente o risco de desenvolvimento de um câncer. Portanto, sistemas de reparo de danos ao DNA são empregados para reverter essas alterações através de cinco vias, como a reparo por excisão de base (BER), recombinação homóloga (HR), reparo de erros de pareamento (MMR), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (Liu *et al.*, 2023).

Mutações em genes envolvidos nesses sistemas podem comprometer sua eficiência, reduzindo a capacidade de reparo dos danos, gerando o acúmulo de alterações nos genes que podem levar à tumorigênese. Nesse sentido, destaca-se um dos genes relacionados ao reparo do DNA como o gene de Complementação Cruzada de Reparo de raios X 1 (XRCC1), já que alterações na sua expressão têm sido relacionadas a algumas neoplasias malignas. A família do gene XRCC é composta por 11 membros (XRCC1-11), todos atrelados ao sistema de reparo do genoma, em especial pelo SSBR e BER (Liu *et al.* 2023; London, 2020).

Este gene está localizado no cromossomo 19q13.2-13.3 (Li *et al.*, 2012) e codifica a proteína 1 Complementadora Cruzada de Reparo de raios X (XRCC1), que é uma proteína essencial no processo de SSBR e BER. XRCC1 interage com a poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1), recrutada quando há quebras de fita simples (SSB) causadas por oxidação ou alquilação. As enzimas glicosilases atuam na etapa da excisão da base (BER), que recruta a endonuclease APE1 criando uma SSB intermediária. A DNA polimerase  $\beta$  insere o nucleotídeo faltante e a PNKP atua nas extremidades do DNA e, por fim, a XRCC1 se liga a DNA ligase III, a qual realiza a selagem da SSB intermediária para concluir o reparo por excisão de bases (Vaezi; Feldman; Niedernhofer, 2011; Tang; Çağlayan, 2021).

Dada a importância desses sistemas, alterações no gene XRCC1 podem aumentar o risco para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, entre estes o câncer oral. A via BER está relacionada à proteção do DNA contra agentes carcinogênicos, impedindo a instabilidade genômica. Porém, a presença de polimorfismos do gene XRCC1 pode comprometer a eficiência no reparo dos danos ao material genético,

tornando o indivíduo mais suscetível ao câncer (Mohtasham; Najafi-Ghobadi; Abbaszadeh, 2023).

Dentre os principais polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) do gene XRCC1 que levam a mudanças de aminoácido estão os polimorfismos localizados nos éxons 6 (Arg194Trp), éxons 9 (Arg280His) e 10 (Arg399Gln) (Xia; Wu; Wang, 2021). Algumas pesquisas já associaram o polimorfismo Arg194Trp ao aumento do risco individual de câncer de cavidade oral, pois essa variação genética resulta em alterações na capacidade de reparação dos danos ao DNA (Zhang *et al.*, 2013).

Dito isso, faz-se necessário a investigação da influência dessas alterações genéticas, com o intuito de elucidar o papel dos polimorfismos, em especial do gene XRCC1 do tipo Arg194Trp, no desenvolvimento do câncer de cavidade oral na população do estado do Espírito Santo, Brasil.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo caso-controle onde foram incluídos indivíduos com diagnóstico de CEO atendidos no Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca do Hospital Santa Rita de Cássia, da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo. Todos os participantes residiam no estado do Espírito Santo, Brasil e foram recrutados segundo protocolo do Projeto de Pesquisa Multicêntrico Internacional intitulado “Estudo do Câncer de Cabeça e Pescoço na América do Sul - InterCHANGE” nos anos de 2011 a 2013.

Um total de 44 casos foram selecionados, seguindo os seguintes critérios de inclusão: indivíduos de ambos os sexos, de qualquer grupo étnico ou faixa etária, com diagnóstico de carcinoma epidermóide oral, que não tivessem iniciado tratamentos antineoplásicos prévios. Os 63 indivíduos do grupo controle incluíram voluntários de base hospitalar ou acompanhantes de pacientes, sem vínculo parental direto com os mesmos e que nunca apresentaram diagnóstico de câncer. Os grupos caso e controle foram pareados em relação a idade e sexo.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde (nº 318/2011) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os participantes.

#### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico de casos e controles. Foram transferidos 1mL de sangue para um tubo de polipropileno devidamente identificado e aplicado o método de extração orgânico. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao tubo 1mL de Tris-MgCl<sub>2</sub> (TM) refrigerado e, em seguida, a solução do tubo foi homogeneizada.

O tubo foi novamente centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C, formando um pellet avermelhado e o sobrenadante foi descartado. Após isso, foi adicionado 1mL

de TM refrigerado e homogeneizado novamente. A centrifugação do tubo foi repetida nas mesmas condições, formando o pellet esbranquiçado (buffy coat). O precipitado foi ressuspensionado em 570µl de Tris-EDTA pH 9, homogeneizado e adicionado 30µl de SDS/proteínase K (5mg/mL em 10% SDS-Dodecil Sulfato de Sódio) ao pellet para o processo de digestão de proteínas e para o rompimento da membrana celular.

As amostras foram incubadas a 48°C por 2 horas e após esse tempo foi adicionado 600µl de Fenol-Clorofórmio pH 9,0. Em seguida, os tubos foram homogeneizados por 1 minuto e centrifugados a 14.000rpm por 2 minutos, sendo retirado o sobrenadante para um outro tubo, onde foi adicionado 600µl de Fenol-Clorofórmio pH 9,0 e homogeneizado por mais 1 minuto. A centrifugação foi repetida da mesma forma e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a precipitação do DNA foi realizada a partir da adição de 100µl de 10M de acetato de sódio e 1,0 ml de etanol absoluto à solução aquosa e, por fim, os tubos foram armazenados overnight a -20°C.

Após, foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos, descartado todo sobrenadante e adicionado 1mL de etanol 70% refrigerado, o qual foi centrifugado novamente nas mesmas condições e o líquido foi descartado. Os tubos invertidos foram submetidos à secagem por 15 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 100µL de Low Tris-EDTA (LoTE) e incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos e armazenado a -20°C.

### 3.3 RASTREAMENTO DE POLIMORFISMO Arg194Trp (C26304T) DO GENE XRCC1

O polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1 foi genotipado por meio da técnica de *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e os fragmentos obtidos foram visualizados em gel de agarose 2% corado com GelRed para visualização e análise dos resultados. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo, campus de Maruípe, Vitória/ES.

A PCR-RFLP foi realizada a partir da adaptação da metodologia aplicada por (Csejtei *et al.*, 2009). O sítio dimórfico avaliado foi o códon 194 do XRCC1, utilizando os primers 5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A-3' e 5'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T-3' responsável pela amplificação de um fragmento de 490 pb que abrange o polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1. A PCR foi feita utilizando 0.4µM de cada primer, 100 ng de DNA genômico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1U de Taq DNA polimerase e 2.5 µL de solução tampão para PCR (200mM Tris-HCl pH 8.4 e 500mM KCl) em volume final de 25 µL.

Foi utilizado o termociclador da Applied Biosystems durante os ensaios de PCR e programado 30 ciclos para amplificação com as condições de desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 57°C por 60s e extensão 72°C por 60s. Os produtos da PCR foram submetidos ao processo de avaliação em gel de agarose 2% corado com GelRed, utilizando a enzima de restrição *pvull* para identificar o polimorfismo.

A digestão enzimática foi realizada através do banho maria a 37°C durante 2 horas. Foram utilizados 5µL do produto da PCR, 2µL de tampão de reação (10x), 12,7µL dH<sub>2</sub>O e 5U da enzima *pvull*, com volume final de 20µL. Os resultados da digestão enzimática também foram visualizados em gel de agarose 2% e corados com GelRed. Foram obtidos fragmentos de 490pb para homocigotos selvagens (CC), 490, 294, 196pb para heterocigotos (CT), 294, 196pb para homocigoto mutante (TT).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genóticas foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os testes qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para a análise de associação do polimorfismo com as características da população analisada, adotando-se significância quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo incluiu 44 casos e 63 controles. Informações detalhadas sobre a idade e sexo dos participantes dos grupos caso e controle estão descritas na Tabela 1. Um predomínio de indivíduos do sexo masculino 84,0% (37/44) foi observado entre os casos. Entre os controles, 77,7% (49/63) eram do sexo masculino. Em relação à faixa etária, 50,0% (22/44) dos casos apresentaram idade maior ou igual a 55 anos e outros 50,0% (22/44) menor do que 55 anos, já os controles foram 47,6% (30/63) com idade maior ou igual a 55 anos e 52,3% (33/63) menor do que 55 anos.

Como pode ser observado na tabela 1, não houve diferença significativa para tais características entre os dois grupos, o que condiz com outros estudos que buscaram avaliar este polimorfismo.

Tabela 1: Distribuição dos grupos caso e controle em relação a sexo e idade.

Características	Pacientes		Controles		P-valor
	N.	(%)	N.	(%)	
<b>Sexo</b>					
Feminino	7	(15.9)	14	(22.2)	0.467
Masculino	37	(84.0)	49	(77.7)	
<b>Idade</b>					
≥ 55	22	(50.0)	30	(47.6)	0.846
< 55	22	(50.0)	33	(52.3)	

Fonte: autoria própria, 2025.

Os genótipos encontrados indicam as combinações de bases possíveis no DNA, sendo dois alelos com citosina (CC), sem o polimorfismo, caracterizando um homocigoto selvagem, um alelo com citosina e outro mutado com timina no lugar da citosina (CT), com a presença do polimorfismo, ou seja, um heterocigoto e, por fim, um indivíduo com dois alelos mutados com timinas no lugar das citosinas (TT), sendo um homocigoto mutado.

O genótipo CC, sem o polimorfismo, foi mais encontrado entre os casos e controles, estando presente em 84,1% (53/63) dos indivíduos sem o câncer oral. Já entre os indivíduos com CEO, a presença do genótipo CC foi identificada em 65,9% (29/44) dos casos, sugerindo que esse genótipo é menos frequente em indivíduos com câncer de cavidade oral. Tata; Kshirsagar; Nangare (2022) avaliaram a presença do polimorfismo Arg194Trp do XRCC1 em 75 pacientes com câncer oral e 75 casos controles e não houve significância em relação as características de sexo e faixa etária.

Já o genótipo CT, com o polimorfismo em um dos alelos, foi mais encontrado entre os casos com câncer oral, estando presente em 34,1% (15/44) dos pacientes estudados e em 14,3% (9/63) dos controles. O genótipo TT se mostrou incomum, presente em 1,6% (1/63) dos indivíduos do grupo controle e nenhum dos casos de câncer oral ( $p=0,041$ ), o que pode indicar que a presença do alelo T em um dos genes pode ter um papel importante ao estar associado ao maior risco para o câncer de cavidade bucal. Ainda com Tata; Kshirsagar; Nangare (2022), também foram encontrados resultados significativos para este polimorfismo na Índia, relacionando essa alteração a um maior risco de câncer oral.

A investigação dos genótipos CC e a combinação de CT e TT apresentou significância ( $p=0,037$ ). Os homocigotos correspondem a 84,1% (53/63) dos controles e 65,9% (29/44) dos casos, sendo que a associação dos grupos com ao menos um alelo T foi mais frequente nos casos de câncer com 34,1% (15/44) e 15,9% (10/63) dos controles, destacando novamente a associação do alelo T ao CEO.

A frequência dos alelos mostrou o alelo T mais presente nos casos de câncer oral com 17% (15/88) em comparação aos casos controles com 8,7% (11/126), já o alelo C foi mais frequente nos dois grupos, sendo 83% (73/88) para os casos e 91,3% (115/126) para os controles ( $p=0,088$ ), como detalhado na tabela 2, demonstrando que o alelo T é mais presente entre os casos, porém não houve diferença significativa entre os grupos casos e controles.

Tabela 2: Frequências genotípicas e alélicas nos grupos avaliados.

Genótipo	Casos		Controles		P- Valor
	N.	(%)	N.	(%)	
<b>XRCC1 C26304T</b>					
CC	29	(65.9)	53	(84.1)	<b>0.041</b>
CT	15	(34.1)	9	(14.3)	
TT	0		1	(1,6)	
CC	29	(65.9)	53	(84.1)	<b>0.037</b>
CT + TT	15	(34.1)	10	(15.9)	
C	73	(83)	115	(91.3)	0.088
T	15	(17)	11	(8.7)	

Fonte: autoria própria, 2025.

Portanto, os resultados deste estudo indicam que o genótipo CT com o polimorfismo do gene XRCC1 Agr194Trp (C26304T) pode estar associado ao aumento do risco de câncer de cavidade oral, principalmente, quando há a presença de somente um alelo T, sendo que o genótipo CC, sem o polimorfismo, parece estar menos relacionado ao câncer de cavidade oral.

O estudo de Mohtasham; Najafi-Ghobadi; Abbaszadeh (2023), descreve que a presença deste polimorfismo pode estar associada ao câncer de cabeça e pescoço, inclusive o câncer oral, pois compromete a eficácia do sistema de BER, promovendo uma alteração na proteína XRCC1, já que modifica o códon 194 trocando arginina por

triptofano, levando a alteração da estrutura proteica e perda da eficácia no reparo do DNA frente a danos causados por agentes carcinogênicos.

Essa modificação pode estar relacionada à suscetibilidade ao câncer oral na medida que indivíduos com o polimorfismo, quando ocorre uma mutação no DNA e esta não é reparada, pode apresentar aumento no risco de desenvolvimento da doença, pois o sistema de reparo aos danos não é capaz de corrigir (Mohtasham; Najafi-Ghobadi; Abbaszadeh, 2023).

Contudo, pesquisas prévias citaram o papel deste polimorfismo no câncer oral como contraditório, porém, a meta-análise realizada por Zhang *et al.* (2013), mostrou uma associação significativa entre o polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1 em relação ao câncer oral, inclusive em casos de leucoplasia oral. Este polimorfismo ainda é citado como o mais comum no gene XRCC1 e sua associação significativa com o câncer de cavidade oral pode fornecer, inclusive, novas evidências sobre o papel deste polimorfismo no desenvolvimento tumoral (Zhang *et al.*, 2013)

Além da relação com o desenvolvimento deste câncer, a presença de polimorfismos do gene XRCC1, em especial o Arg194Trp, pode estar relacionado à resposta ao tratamento de radioterapia, evidenciando que indivíduos com a variação genética apresentariam maior sensibilidade ao tratamento, visto que com o polimorfismo, a capacidade de reparo dos danos ao DNA causados pela radiação não seriam plenamente corrigidos. Em contrapartida, esses indivíduos também podem apresentar efeitos colaterais mais evidentes durante o tratamento. No entanto, ainda são necessários outros estudos para determinar o papel deste polimorfismo na resposta à radioterapia (Raturi *et al.*, 2020).

Ademais, Wang *et al.* (2023) relata em seu estudo, que em tumores primários de cabeça e pescoço a expressão do gene XRCC1, mesmo sem o polimorfismo, ou seja, em homozigotos selvagens, se mostra elevada em comparação a grupos sem a presença da doença. Essa informação pode destacar a presença exacerbada da proteína XRCC1 como um potencial biomarcador de diagnóstico precoce do câncer de cabeça e pescoço, com foco no câncer de cavidade oral (Wang *et al.*, 2023).

Desse modo, tanto o polimorfismo Arg194Trp do gene XRCC1, como o gene não mutado, demonstram ter influência no câncer oral estando relacionados ao maior risco de desenvolvimento da doença, no caso de indivíduos heterozigotos com, e resposta ao tratamento. Outros estudos associaram a alta expressão desse gene a um risco maior de resposta mínima ao tratamento e pior sobrevida em homozigotos selvagens. Entretanto, indivíduos com o polimorfismo também podem apresentar menor sobrevida e pior prognóstico, além de maiores chances de recidivas (Wang *et al.*, 2023; Vaezi, Feldman; Niedernhofer, 2011).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, os dados obtidos neste estudo demonstraram associação entre a relação à frequência do polimorfismo Arg194Trp (C26304T) do gene XRCC1 e câncer de cavidade oral no Espírito Santo, indicando que indivíduos com essa alteração genética podem ser mais suscetíveis a doença, já que o genótipo CT sugere maior relação com o câncer de cavidade oral. A presença desse polimorfismo pode comprometer a capacidade de reparo aos danos no DNA, principalmente, aqueles causados por

carcinógenos, levando ao acúmulo de mutações genéticas que podem estar atreladas à doença.

Ademais, essa variação genética também pode estar relacionada ao prognóstico e resposta ao tratamento oncológico, sendo que estes indivíduos podem apresentar uma melhor resposta ao tratamento, com menor risco de resistência tumoral. Entretanto, apesar dos indivíduos polimórficos terem maiores efeitos colaterais, ainda são controversos os estudos acerca do prognóstico e sobrevida de pacientes com ou sem essa alteração. Por fim, estudos descrevem o gene XRCC1 como um potencial biomarcador para o câncer oral, no entanto, outras pesquisas são necessárias para aquisição de informações concretas.

## REFERÊNCIAS

ARBOLEDA, Lady Paola Aristizabal *et al.* **Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity, Oropharynx, and Larynx: A Scoping Review of Treatment Guidelines Worldwide.** *Cancers* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.

BARSOUK, Adam *et al.* **Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Medical sciences.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 jun. 2023.

BRAY, Freddie *et al.* **Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.

CHAURASIA, Akhilanand; ALAM, Saman Ishrat; SINGH, Navin. **Oral cancer diagnostics: An overview.** *National Journal of Maxillofacial Surgery.* Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 set. 2021.

CSEJTEI, Andras *et al.* **Association between XRCC1 Polymorphisms and Head and Neck Cancer in a Hungarian Population.** *Anticancer research*, 2009.

DE LA IGLESIA, Janis V. *et al.* **Effects of tobacco smoking on the tumor immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma.** *Clinical Cancer Research*, v. 26, n. 6, p. 1474–1485, 15 mar. 2020.

GRUNDY, Gabrielle J.; PARSONS, Jason L. **Base Excision Repair and its implications to cancer therapy.** *Essays in biochemistry.* NLM (Medline). 64 831–843, 2020.

GUPTA, Ishita *et al.* **Connecting the dots: investigating the link between environmental, genetic, and epigenetic influences in metabolomic alterations in oral squamous cell carcinoma.** *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

HASEGAWA, Toshihiro *et al.* **Etiology of Oral Potentially Malignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma Based on Cellular Stress Regulation and Matrix Stiffness.** *Frontiers in Bioscience – Landmark.* IMR Press Limited, , 2023.

IARC. **Global Cancer Observatory: cancer today.** 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/1-lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 28 out. 2025.

INCA. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.** Rio de Janeiro. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 28 out. 2025.

KIJOWSKA, Julia *et al.* **Epidemiology, Diagnostics, and Therapy of Oral Cancer—Update Review.** *Cancers.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2024.

LI, Shuluan *et al.* **Prognostic impact of oral microbiome on survival of malignancies: a systematic review and meta-analysis.** *Systematic Reviews.* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

LI, Ya *et al.* **X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1 (XRCC1) Genetic Polymorphisms and Cervical Cancer Risk: A HuGE Systematic Review and Meta-Analysis.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 12 set. 2012.

LIU, Qiang *et al.* **X-ray cross-complementing family: the bridge linking DNA damage repair and cancer.** *Journal of Translational Medicine.* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023.

LONDON, Robert E. **XRCC1 – Strategies for coordinating and assembling a versatile DNA damage response.** *DNA Repair.* Elsevier B.V., , 1 set. 2020.

MOHTASHAM, Nooshin; NAJAFI-GHOBADI, Khadijeh; ABBASZADEH, Hamid. **The XRCC1 Arg194Trp polymorphism was associated with the risk of head and neck squamous cell carcinoma development: Results from a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Reports.* John Wiley and Sons Inc, , 1 mar. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging.** SEER Training Modules, 2024.

NOKOVITCH, Lara *et al.* **Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Risk Factors: State of the Art.** *Journal of Clinical Medicine.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 maio 2023.

OLIVEIRA, Leticia L. *et al.* **Prognostic factors associated with overall survival in patients with oral cavity squamous cell carcinoma.** *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 25, n. 4, p. e523–e531, 1 jul. 2020.

PEKAREK, Leonel *et al.* **Emerging histological and serological biomarkers in oral squamous cell carcinoma: Applications in diagnosis, prognosis evaluation and personalized therapeutics (Review)**. *Oncology Reports*, v. 50, n. 6, 1 dez. 2023.

RATURI, Vijay *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 and Neck*, v. 42, n. 5, p. 1045–1056, 1 maio 2020.

SARODE, Gargi *et al.* **Epidemiologic aspects of oral cancer**. *Disease-a-Month*. Mosby Inc., 1 dez. 2020.

SINKALA, Musalula. **Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers**. *Scientific Reports*. 2023.

SU, Yee Fun *et al.* **Current insights into oral cancer diagnostics**. *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2021.

TANG, Qun; ÇAĞLAYAN, Melike. **The scaffold protein XRCC1 stabilizes the formation of pol $\beta$ / gap DNA and ligase III $\alpha$ /nick DNA complexes in base excision repair**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 297, n. 3, 1 set. 2021.

TATA, Neville Hoshedar; KSHIRSAGAR, Ashok; NANGARE, Nitin. **Characterization of genetic polymorphisms in oral cancer-related genes pertaining to oxidative stress, carcinogen detoxifying, and DNA repair: A case-control study**. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 18, n. 4, p. 1023–1029, 1 jul. 2022.

THAKRAL, Abhinav *et al.* **Smoking and alcohol by HPV status in head and neck cancer: a Mendelian randomization study**. *Nature Communications*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2024.

VAEZI, Alec; FELDMAN, Chelsea H.; NIEDERNHOFER, Laura J. **ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer**. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2011.

WANG, Guobing *et al.* **XRCC1: a potential prognostic and immunological biomarker in LGG based on systematic pan-cancer analyses**. Vol. 16, No. 1, 2023. Disponível em: <[www.aging-us.com](http://www.aging-us.com)>.

XIA, Shitong; WU, Sihai; WANG, Minghao. **The Association Between the XRCC1 Arg399Gln Polymorphism and the Risk of Head and Neck Cancer: An Updated Meta-Analysis Including 14586 Subjects**. *Technology in Cancer Research and Treatment*, v. 20, 2021.

ZHANG, Yi *et al.* **XRCC1 Arg194Trp polymorphism is associated with oral cancer risk: Evidence from a meta-analysis**. *Tumor Biology*, v. 34, n. 4, p. 2321–2327, 2013.