

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS E
EPIGENÉTICOS NA OCORRÊNCIA DE MUCOSITE
ORAL QUIMIOINDUZIDA EM PACIENTES
ONCOPEDIÁTRICOS**

JOSÉ MARIA CHAGAS VIANA FILHO

SAPIENTIA AEDIFICAT

2023

JOSÉ MARIA CHAGAS VIANA FILHO

**INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS
NA OCORRÊNCIA DE MUCOSITE ORAL QUIMIOINDUZIDA EM
PACIENTES ONCOPEDIÁTRICOS**

**INFLUENCE OF GENETIC AND EPIGENETIC MARKERS ON THE
OCCURRENCE OF CHEMO-INDUCED ORAL MUCOSITIS IN
ONCOPEDIATRIC PATIENTS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Naila Francis Paulo de Oliveira

João Pessoa

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BIBLIOTECÁRIO: ANNA REGINA DA SILVA RIBEIRO - CRB-15/24

V614i Viana Filho, José Maria Chagas.

Influência de marcadores genéticos e epigenéticos na ocorrência de mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos / José Maria Chagas Viana Filho. - João Pessoa, 2023.

98 f. : il.

Orientação: Naila Francis Paulo de Oliveira.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Odontopediatria. 2. Mucosite oral - Pacientes oncopediátricos. 3. Mucosite oral - Metotrexato. 4. Estomatite. 5. Polimorfismo Genético. 6. Metilação de DNA. I. Oliveira, Naila Francis Paulo de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314-053.2(043)

Informações Complementares:

Título em outro idioma: Influence of genetic and epigenetic markers on the occurrence of chemo-induced oral mucositis in oncopediatric patients

Palavras-chave em outro idioma: Oral mucositis; Polymorphisms; DNA methylation; Epigenetic

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos Tecidos Buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Prof.^a Dr.^a Naila Francis Paulo de Oliveira – Examinadora 1 (Orientadora, UFPB); Prof.^a Dr.^a Ana Maria Gondim Valença – Examinadora 2 (UFPB); Prof.^a Dr.^a Cristina Wide Pissetti – Examinadora 3 (UFPB); Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Godoy dos Santos – Examinadora 4 (UFPR); Prof.^a Dr.^a Simone Silva dos Santos Lopes – Examinadora 5 (UEPB).

Data de defesa: 02-03-2023

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

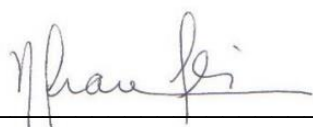
- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5922-1217>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4053497163192725>

JOSÉ MARIA CHAGAS VIANA FILHO

**INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS
NA OCORRÊNCIA DE MUCOSITE ORAL QUIMIOINDUZIDA EM
PACIENTES ONCOPEDIÁTRICOS**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Tese de Doutorado apresentada em sessão pública no dia 02 de março de 2023 e atribuiu o conceito APROVADO.



Prof.ª Dr.ª Naila Francis Paulo de Oliveira

Examinadora 1 (Orientadora) – UFPB



Prof.ª Dr.ª Ana Maria Gondim Valença

Examinadora 2 – UFPB



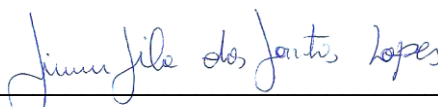
Prof.ª Dr.ª Cristina Wide Pissetti

Examinadora 3 – UFPB



Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Godoy dos Santos

Examinadora 4 – UFPR



Prof.ª Dr.ª Simone Silva dos Santos Lopes

Examinadora 5 – UEPB

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às crianças e adolescentes, e suas famílias, que lutam diariamente contra o câncer, mas que se dispuseram a participar destas pesquisas. Diante das dores físicas e psicológicas, elas se mostraram encorajadas pela descoberta de informações que pudessem contribuir para redução dos seus sofrimentos. Aos sobreviventes, minha admiração pela superação, e aos que se foram, meu mais sincero desejo de que estejam em um lugar tranquilo.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer pessoa, gostaria de agradecer a Deus (minha força maior), por nunca ter me abandonado, mesmo eu sendo ingrato, muitas vezes. Ele que me carregou nos braços, quando eu estive cansado, e me deu forças para não desistir. Deus sempre cuidou de mim!

Gostaria de agradecer a minha família, meu porto seguro (minha mãe, Fátima; meus irmãos: Mazé, Saminha e Deninho; minha segunda mãe, madrinha Nilda, e minha irmã mais nova, Bruninha), que se fez presente durante todo esse percurso, mesmo distantes fisicamente. Por vezes pensei em desistir, largar tudo, mas quando desabafava com vocês, no grupo da família, sempre encontrava refúgio, acolhimento, afago e isso me impulsionava a continuar. Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui!

Postumamente, gostaria de agradecer aos cuidados espirituais da minha mãe do céu, Zélia, e do meu pai do céu, Derci, que estão juntos de Deus, como anjos, cuidando de mim. Não teve uma só vez, durante esse período, que eu não pedisse a intercessão de vocês em minhas decisões e não sentisse a presença dos dois ao meu lado. Muito obrigado por cuidarem de mim!

Sou grato aos meus amigos, minha segunda família, que compartilharam comigo de perto todas as alegrias, euforias, sabores e angústias desses três últimos anos. Muitos de longe, fisicamente, outros mais de perto, mas que sempre estiveram a postos para me parabenizar ou ouvir minhas lamúrias. Destaco aqui meu amigo André, que esteve comigo diariamente durante todo esse curso de doutorado, me dando forças e me fazendo acreditar que eu era capaz, quando eu mesmo tentava me sabotar. Amigos, minha eterna gratidão a todos!

Ao meu namorado, Ítalo, que chegou em meio à turbulência do último ano de pesquisa, mas que sempre me apoiou, me ouviu, me ajudou, entendeu minhas ausências e se fez presente ao meu lado. Você representa calma em meio à tempestade que eu sou!

Um agradecimento todo especial a minha orientadora, Prof.^a Naila Oliveira, que está caminhando comigo desde o mestrado e foi a responsável pelo meu desenvolvimento intelectual dentro da Genética Humana e Biologia Molecular, áreas que hoje carrego em meu coração. À Naila, toda gratidão e admiração pela excelente pesquisadora e professora que ela é! Nesses cinco anos passamos por altos e baixos, como toda relação humana, mas ao final posso dizer sem sombra de dúvidas que tive a melhor orientadora! Você me abriu portas, me ensinou, me carregou pela mão, me puxou na orelha, quando foi necessário, e me fez chegar até aqui. Hoje sou doutor graças ao sucesso do seu trabalho. Muito obrigado!

Gostaria de agradecer aos amigos de curso e aos professores do PPGO, em especial à Prof.^a Ana Maria Valença, que foi minha coorientadora, oficialmente, no mestrado, mas sempre se mostrou disponível para contribuir com as minhas demandas do doutorado e profissionais. Todos deveriam ter a sorte de ter a Ana Maria em suas vidas. Eu tenho nela o maior exemplo a ser seguido enquanto professor e pesquisador. Obrigado por tudo, Ana!

Um agradecimento especial ao Laboratório de Genética Molecular Humana, coordenado pela Prof.^a Naila, e a todos os amigos que fiz por lá durante esses anos, em especial Bia, Marina e Mussara. Aos demais laboratórios que utilizei nos meus experimentos e à colaboração de outras equipes, como a da Prof.^a Darlene Persuhn. Que estes espaços sejam bem utilizados para novas descobertas e que os próximos alunos zelem por cada um deles.

Aos profissionais e colaboradores do Hospital Napoleão Laureano, que sempre se mostraram dispostos e contribuíram para a concretização destas pesquisas.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Prof. Yuri Cavalcanti, pelo apoio institucional oferecido durante esses cinco anos de pós-graduação.

Agradeço às instituições de fomento que financiaram as pesquisas desta tese, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

(processo nº 434392/2018-9) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) (processo nº 17/2021).

Desde já, agradeço às professoras que compõem a minha banca avaliadora, por todas as valiosas contribuições.

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”*

Hipócrates

RESUMO

A mucosite oral (MO) quimioinduzida é uma resposta inflamatória tecidual à ação bioquímica dos quimioterápicos, comumente observada em pacientes que fazem uso do Metotrexato (MTX). Essa droga, por sua vez, está relacionada a uma alteração de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e um desbalanço oxidativo, que pode reduzir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Em adição, os níveis de vitamina D também foram associados à ocorrência de MO. Estudos têm mostrado que o mecanismo da toxicidade do MTX está relacionado a alterações genéticas, como polimorfismos de nucleotídeo único, e no perfil epigenético dos pacientes, sobretudo no que diz respeito à metilação do DNA. Diante disso, objetivou-se analisar a influência de modificações genéticas e epigenéticas em genes que codificam o receptor de vitamina D e genes envolvidos em mecanismos inflamatórios e do estresse oxidativo. Foram analisados se os polimorfismos *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) no gene *VDR*, bem como o perfil de metilação nos genes *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF- α* estavam associados à ocorrência de mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos tratados com MTX. Para tanto, realizou-se um estudo com 123 pacientes (5 a 19 anos), dos quais 102 eram do Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa-PB) e tinham diagnóstico de leucemias ou linfomas e tratados com MTX, e 21 eram indivíduos saudáveis selecionados de clínica odontológica privada. A MO foi avaliada pelo *Oral Assessment Guide* modificado. Dados demográficos, clínicos, hematológicos e bioquímicos foram coletados em prontuários médico-odontológicos. Amostras de células epiteliais bucais foram obtidas por bochecho e o DNA genômico foi extraído para análise de polimorfismos pela técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) e para análise de metilação do DNA por MSP (*Methylation Specific PCR*). Análise estatística foi realizada através dos testes Qui-quadrado, exato de Fisher, U de Mann-Whitney, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para comparações múltiplas e equilíbrio de Hard-Weinberg ($p<0,05$). O estudo de polimorfismo no gene *VDR* incluiu 102 pacientes oncopediátricos, no qual foi observada prevalência pelo sexo masculino (57,8%) e média de idade foi de 10,3 anos ($\pm 4,7$). A MO atingiu 84,3% dos pacientes, dos quais 53,1% desenvolveram a forma grave da doença (MOG). Houve associação do genótipo CT do polimorfismo *FokI* C>T (rs2228570) (OR=1,81; IC=0,58–5,66; $p=0,038$), bem como do alelo G do polimorfismo *BsmI* G>A (rs1544410) (OR=2,27; IC=1,01–5,11; $p=0,040$) com a MOG. O estudo de metilação nos genes *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF- α* , envolveu 85 indivíduos, sendo 21 indivíduos saudáveis e 64 pacientes oncopediátricos. Predominou o sexo feminino (54,1%), com idade média de 11,1 anos ($\pm 4,3$) e diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (56,5%). A maioria dos pacientes com câncer (75,0%) desenvolveu MO. Observou-se diferença nos perfis de metilação do gene *TNF- α* entre os grupos ($p=0,004$), sendo o perfil não-metilado mais frequente nos pacientes que haviam se recuperado da mucosite quando comparado de forma isolada com os pacientes que apresentavam mucosite no momento da coleta das amostras ($p=0,049$). Conclui-se, portanto, que ambas as modificações, genéticas e epigenéticas estão associadas à mucosite oral. Os polimorfismos *FokI* C>T (rs2228570) e *BsmI* G>A (rs1544410) no gene *VDR*,

aumentam a chance de ocorrência de mucosite oral grave e o perfil de metilação em *TNF- α* está associado ao período pós-mucosite em pacientes oncopediátricos.

Palavras-chave: Odontopediatria; Metotrexato; Estomatite; Polimorfismo Genético; Metilação de DNA.

ABSTRACT

Chemoinduced oral mucositis (OM) is a tissue inflammatory response to the biochemical action of chemotherapy, commonly observed in patients using Methotrexate (MTX). This drug, in turn, is related to an alteration of inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and an oxidative imbalance, which can reduce the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In addition, vitamin D levels were also associated with the occurrence of OM. Studies have shown that the mechanism of MTX toxicity is related to genetic alterations, such as single nucleotide polymorphisms, and in the epigenetic profile of patients, especially with regard to DNA methylation. Therefore, the objective was to analyze the influence of genetic and epigenetic modifications in genes that encode the vitamin D receptor and genes involved in inflammatory mechanisms and oxidative stress. We analyzed whether the *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) and *TaqI* T>C (rs731236) polymorphisms in the *VDR* gene, as well as the methylation profile in the *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* and *TNF- α* were associated with the occurrence of chemoinduced oral mucositis in pediatric oncopediatric patients treated with MTX. To this end, a study was carried out with 123 patients (5 to 19 years old), of which 102 were from the Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa-PB) and had a diagnosis of leukemia or lymphoma and were treated with MTX, and 21 were selected healthy individuals. OM was assessed using the modified Oral Assessment Guide. Demographic, clinical, hematological and biochemical data were collected from medical and dental records. Samples of buccal epithelial cells were obtained by mouthwash and genomic DNA was extracted for analysis of polymorphisms by the PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) and for analysis of DNA methylation by MSP (Methylation Specific PCR). Statistical analysis was performed using Chi-square, Fisher's exact, Mann-Whitney U, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner tests for multiple comparisons and Hard-Weinberg balance ($p < 0.05$). The study of polymorphism in the *VDR* gene included 102 oncopediatric patients, in which a prevalence was observed in males (57.8%) and mean age was 10.3 years (± 4.7). OM affected 84.3% of the patients, of which 53.1% developed the severe form of the disease (MOG). There was an association between the CT genotype of the *FokI* C>T polymorphism (rs2228570) (OR=1.81; CI=0.58–5.66; $p=0.038$), as well as the G allele of the *BsmI* G>A polymorphism (rs1544410) (OR=2.27; CI=1.01–5.11; $p=0.040$) with MOG. The study of methylation in the *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* and *TNF- α* genes involved 85 individuals, 21 healthy individuals and 64 pediatric oncopediatric patients. Females predominated (54.1%), with a mean age of 11.1 years (± 4.3) and diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (56.5%). Most cancer patients (75.0%) developed OM. There was a difference in the methylation profiles of the *TNF- α* gene between the groups ($p=0.004$), with the non-methylated profile being more frequent in patients who had recovered from mucositis when compared in isolation with patients who had mucositis in the time of sample collection ($p=0.049$). Therefore, it is concluded that both genetic and epigenetic modifications are associated with oral mucositis. The *FokI* C>T (rs2228570) and *BsmI* G>A (rs1544410) polymorphisms in the *VDR* gene increase the chance of severe oral mucositis and the *TNF- α* methylation profile is associated with the post-mucositis period in pediatric oncology patients.

Keywords: Pediatric dentistry; Methotrexate; Stomatitis; Genetic Polymorphism; DNA methylation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

CCG – *Children's Cancer Group*

CTCAE – *Common Terminology Criteria for Adverse Event*

Da – Dalton

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutathione Peroxidase

IL1 β – Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina 6

INCA – *Instituto Nacional do Câncer*

kDa – Quilodalton

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

MDA – Malondialdeído

MO – Mucosite Oral

MOG – Mucosite Oral Grave

MSP – *Methylation Specific PCR*

MTX – Metotrexato

NCI – *National Cancer Institute*

NF- κ B – Fator Nuclear do Fator de Transcrição – kappa beta

OAG – *Oral Assessment Guide*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RCBP – Registros de Câncer de Base Populacional

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SAM – S-adenosilmetionina

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SOD – Superóxido dismutase

TFIIB – Fator de Transcrição II B

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral – alfa

UVB – Radiação Ultravioleta B

VDR – Receptor de Vitamina D

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Câncer infanto-juvenil	19
2.2. Mucosite oral	21
2.3. Marcadores genéticos, epigenéticos e mucosite oral	25
2.3.1. Vitamina D e mucosite oral	27
2.3.2. Citocinas inflamatórias e mucosite oral	29
2.3.3. Estresse oxidativo e mucosite oral	31
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. CAPÍTULO 1: Polymorphism but not methylation status in the <i>VDR</i> gene contributes to oral mucositis in children	35
5. CAPÍTULO 2: <i>TNF-α</i> promoter hypomethylation is associated with occurrence of oral mucositis in oncopediatric patients treated with methotrexate	59
6. CONSIDERAÇÃO GERAIS	76
7. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	90
ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil acomete indivíduos de 0 a 19 anos de idade e apresenta altas taxas de morbimortalidade em todo o mundo, ainda que nos últimos anos tenha-se observado um progresso significativo no tratamento e melhora nas taxas de sobrevivência de crianças que vivem em países desenvolvidos (1,2).

As leucemias e linfomas lideram o ranking dos tumores mais incidentes na população infanto-juvenil, os quais surgem em tecidos hematopoiéticos e possuem rápido crescimento e disseminação, por isso, são mais sensíveis e responsivos à quimioterapia (3). Protocolos quimioterápicos envolvendo o metotrexato (MTX) são amplamente empregados para o tratamento dessas neoplasias (4)

O MTX é um metabólito antagonista do folato, que atua na fase S do ciclo celular, impedindo a síntese do DNA (ácido desoxirribonucleico) e interrompendo a divisão exponencial de células malignas. Tecidos saudáveis com alto poder mitótico também são locais de ação para este fármaco, uma vez que ele não é seletivo para células malignas, mas para o reconhecimento de células em constante divisão (4). Dessa forma, ocorre uma redução na regeneração epitelial das mucosas, que passam por um frequente processo de reparo tecidual. Isso contribui, por exemplo, para o desenvolvimento de danos na mucosa, chamados de mucosite oral (5,6).

A mucosite oral quimioinduzida, portanto, é uma consequência da injúria farmacológica causada pelas medicações nos tecidos orais, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio e ativação da cascata inflamatória. Ela costuma ser mais frequente e mais severa em crianças, por apresentarem intensa divisão celular em seus tecidos (7,8). Clinicamente, apresenta-se como lesões eritematosas e edemaciadas, que podem evoluir para ulcerações sangrantes e dolorosas, representando seu estágio mais grave (9).

A etiologia e a severidade dessa resposta inflamatória estão relacionadas com a toxicidade terapêutica direta do quimioterápico, idade, doença de base, sexo, condição de higiene bucal, condição hematológica e bioquímica (10), além de variações genéticas e epigenéticas, como polimorfismos de nucleotídeo único (11) e perfil de metilação do DNA (12).

As modificações genéticas e epigenéticas podem estar relacionadas com a intensidade da resposta inflamatória, sendo um importante objeto de estudo para

entender os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da mucosite oral. Alguns polimorfismos de nucleotídeo único têm potencial de codificar proteínas estrutural e funcionalmente deficientes, o que pode contribuir com a citotoxicidade terapêutica direta do quimioterápico (7) e/ou regulação da expressão de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e na mediação da resposta inflamatória (13).

Em se tratando de respostas inflamatórias, têm-se observado um importante papel da forma ativa da vitamina D, por meio de sua ação anti-inflamatória em processos imunológicos (14). A deficiência desse hormônio lipossolúvel tende a impactar de forma negativa na mediação de respostas inflamatórias, associando-se à progressão de diversas doenças, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla (15). Recentemente um estudo também encontrou associação entre os baixos níveis de vitamina D e a mucosite oral (16).

A variabilidade nos efeitos da vitamina D pode ser resultado de polimorfismos em genes envolvidos em seu metabolismo, dentre os quais está o receptor de vitamina D (*VDR*) (17). A ocorrência de polimorfismos em *VDR* pode resultar em uma diminuição da atividade deste receptor e, conseqüentemente, redução dos eventos resultantes do complexo vitamina D+*VDR* (18). Os polimorfismos mais investigados em *VDR*, no contexto de doenças inflamatórias, são: *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) (19).

Também relacionado à regulação da expressão gênica, a metilação do DNA é um importante biomarcador amplamente estudado neste contexto. Os efeitos biológicos da metilação do DNA, normalmente, estão relacionados com uma redução da expressão de moléculas ou o silenciamento gênico, que em algumas situações, como no caso de genes supressores de tumores, podem representar um efeito não desejado que resultará em prejuízos substanciais à saúde dos indivíduos (20).

Nos estudos com a mucosite oral, não foi observada associação com o perfil de metilação, mas verificou-se modificação no perfil de metilação de pacientes oncopediátricos submetidos ao MTX, sendo a metilação global um marcador de exposição a quimioterápicos (12). Uma vez que a toxicidade do MTX esteja ligada a sua capacidade de inibir a enzima metionina-adenosina transferase e, conseqüentemente, à produção do doador de radical metil (SAM), alterações no perfil de metilação de DNA derivada de seu tratamento não é exatamente um evento

surpresa (21). De fato, alguns estudos mostraram que o MTX está associado a alterações no perfil de metilação do DNA, tanto global quanto sítio-específica (22–24).

Além dessas mudanças, já foi observado que o MTX é capaz de induzir o estresse oxidativo nos tecidos bucais, pela redução da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (25), e, se levada em consideração a filosofia da resposta biológica da metilação (20) nos genes que codificam essas enzimas, isso poderia reduzir mais ainda a atividade endógena antioxidante e aumentar os danos na mucosa oral de pacientes oncopediátricos submetidos a regimes quimioterápicos envolvendo o MTX.

Pensando nisso, o mesmo poderia ocorrer em relação à expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , que são moléculas mediadoras da resposta inflamatória e parecem apresentar importante atividade biológica no desenvolvimento da mucosite oral (26). Esse desfecho é resultado do aumento da concentração dessas citocinas na saliva (26) e isso leva a acreditar, ainda que hipoteticamente, que pode ter uma relação com a mudança na metilação (hipometilação) dos genes que codificam essas proteínas.

A identificação de marcadores biológicos associados ao surgimento de doenças bucais visa minimizar os efeitos biológicos ocasionados por modificações genéticas e/ou epigenéticas, controlando a severidade dos efeitos adversos das terapias. Consequentemente, personaliza-se a terapia empregada no controle e na resolução dessas alterações (27) e espera-se aperfeiçoar o tratamento e reduzir custos.

Assim, justifica-se a importância de estudar as alterações em marcas genéticas e epigenéticas em genes envolvidos no estresse oxidativo e em processos inflamatórios que possivelmente estão associadas à ocorrência de mucosite oral decorrente de protocolos quimioterápicos que incluam o MTX em crianças e adolescentes com tumores hematológicos.

Levando em consideração a ação da vitamina D, por meio da ligação com o seu receptor (VRD), das enzimas antioxidantes e das citocinas mencionadas nas respostas inflamatórias, objetivou-se investigar se marcas genéticas (polimorfismos) e epigenéticas (metilação do DNA) nos genes que codificam essas moléculas, na tentativa de identificar marcadores da mucosite oral ou de exposição ao MTX.

Para tanto, apresentam-se quatro hipóteses, divididas duas a duas de acordo com o eixo do estudo que foi desenvolvido (polimorfismos genéticos e metilação de DNA).

- Estudo de polimorfismos genéticos em *VDR*:

H0: Os polimorfismos genéticos *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) no gene *VDR* não estão associados à ocorrência de mucosite oral ou a sua severidade em pacientes pediátricos com tumores hematológicos;

H1: Os polimorfismos genéticos *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) no gene *VDR* estão associados à ocorrência de mucosite oral ou a sua severidade em pacientes pediátricos com tumores hematológicos.

- Estudo de metilação do DNA em *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF-α*:

H0: O perfil de metilação sítio-específica nos genes *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF-α* não está associado com a utilização de MTX ou com a mucosite oral em pacientes pediátricos com tumores hematológicos;

H1: O perfil de metilação sítio-específica nos genes *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF-α* está associado com a utilização de MTX ou com a mucosite oral em pacientes pediátricos com tumores hematológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.2. Câncer infanto-juvenil

O câncer infanto-juvenil é considerado uma doença rara, de comportamento específico e heterogêneo, que o diferem daqueles diagnosticados em indivíduos com idades mais avançadas (28,29). Representa uma das principais causas de mortalidade em crianças e adolescentes no mundo, mesmo com avanços significativos em tecnologias de diagnóstico, tratamento e melhoria nas taxas de sobrevida em regiões economicamente desenvolvidas (2).

Uma estimativa mundial previu, para os anos de 2020 a 2050, a ocorrência de 13,7 milhões de novos casos de câncer infantil, sendo que 44,9%, quase metade, não serão diagnosticados e 84,1% dos casos estarão em países de renda baixa e média-baixa (29).

No Brasil, é classificado como aquele que acomete indivíduos de 0 a 19 anos de idade e representa a principal causa de mortalidade por doença no público infanto-juvenil, onde se observa uma tendência por curtos períodos de latência, resultando em uma rápida invasão e crescimento (30). De acordo com os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), 3% (percentual mediano) dos tumores malignos são encontrados em crianças e adolescentes, estimando-se a ocorrência de 7.930 novos casos de câncer nesses indivíduos, para o ano do triênio 2023-2025, com maior incidência nas regiões sul e sudeste. Isso corresponde a um risco estimado de 134,81 por milhão de crianças e adolescentes (31).

Dentre os tipos de câncer que acometem os pacientes pediátricos, as leucemias são os mais prevalentes (32). Esse tipo de neoplasia acomete as células brancas produzidas na medula óssea, as quais não sofrem maturação e se transformam em células neoplásicas. Essas células, por sua vez, não realizam suas funções, não sofrem morte celular, mas substituem as células sanguíneas saudáveis e se dividem rapidamente (33,34).

Mais da metade dos pacientes pediátricos acometidos pelo câncer é tratada com a quimioterapia antineoplásica, que consiste na utilização de fármacos com o objetivo de impedir a rápida divisão celular. Esta terapia pode ser utilizada de forma

isolada ou associada a procedimentos cirúrgicos e/ou radioterapia, constituindo o principal método utilizado no tratamento de pacientes oncológicos infanto-juvenis (3).

Apesar de ser o principal recurso no tratamento do câncer, a quimioterapia apresenta efeitos adversos, devido a sua ação em tecidos normais com alto poder mitótico, como a mucosa oral. Tais efeitos dependem da dose, da frequência e do tipo de recurso terapêutico que está sendo utilizado (35,36). Sabe-se que os agentes quimioterápicos não apresentam igualmente toxicidade aos tecidos sadios, sendo o Metotrexato (MTX), o 5-Fluorouracil, a Ciclofosfamida e a Cisplatina as medicações mais envolvidas com efeitos adversos (8,37). No caso do MTX, medicamento amplamente utilizado no tratamento de tumores hematológicos, mesmo em baixas doses, são observadas repercussões indesejadas (38).

O MTX é classificado como um fármaco antifolato, que atua na fase S do ciclo celular, impedindo a síntese do DNA e interrompendo a divisão exponencial de células malignas. Além disso, possui efeitos anti-inflamatórios e é utilizado no tratamento de algumas doenças autoimunes (39). O mecanismo de ação do MTX inicia com sua poliglutamação, realizada pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS), e em seguida, o produto glutamado inibe a atividade das enzimas: dihidrofolato redutase (DHFR), timidilato sintase (TYMS), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) e formiltransferase (ATIC), contribuindo, assim, para o acúmulo intracelular de adenosina (40).

Um estudo recente sintetizou doenças, doses e efeitos adversos que o MTX pode apresentar. Dentre elas, pode-se destacar sua utilização no tratamento de leucemias, variando a dose de 3,3 a 30mg/m² durante dias ou semana, e no tratamento de linfomas, com posologia de 10 a 25mg/dia em um período de 4 a 8 dias. Os efeitos adversos são comuns e estão ligados à dose, podendo o indivíduo apresentar mielossupressão, náusea, diarreia, sonolência e estomatites ulcerativas (41).

Na cavidade bucal de pacientes oncopediátricos, principalmente, podem ser observadas respostas inflamatórias a ação deste fármaco, que reconhece o poder mitótico do tecido epitelial e interpreta como sendo uma divisão celular maligna exponencial, resultando em lesões chamadas de mucosite oral (4,42). No entanto, os efeitos positivos desta medicação no tratamento de neoplasias são indiscutíveis,

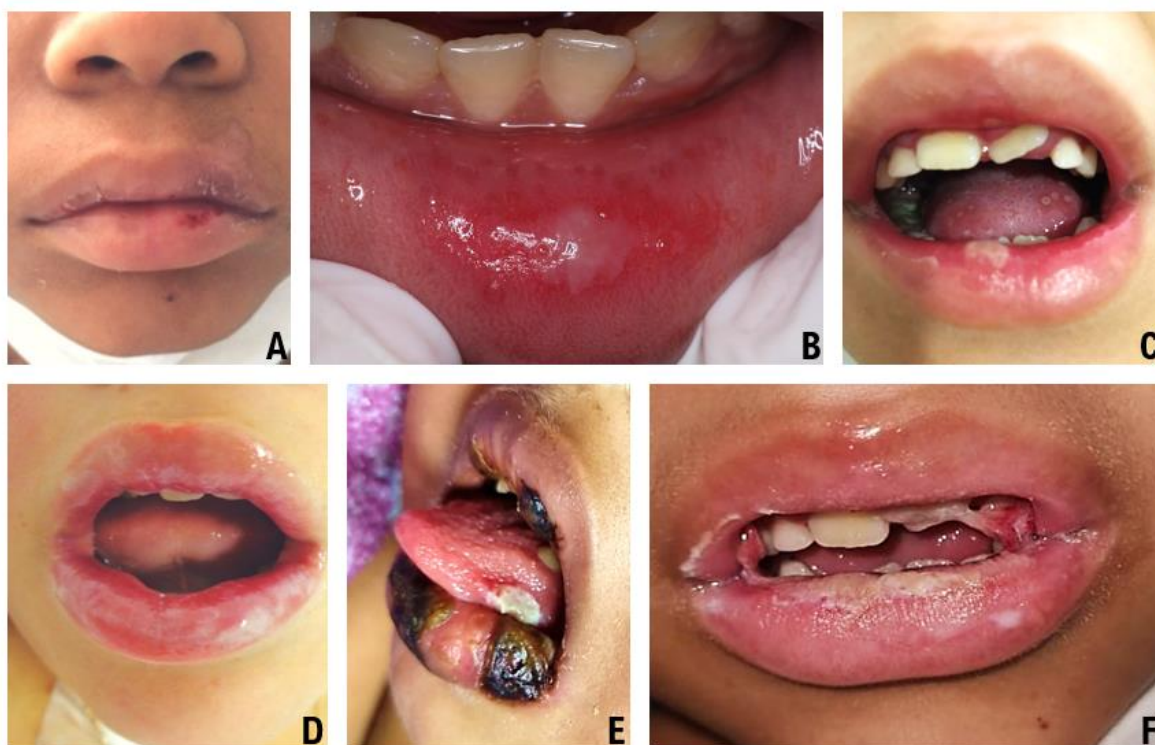
sobretudo no tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância, aumentando significativamente a sobrevida desses indivíduos (43).

2.2. Mucosite oral

Um dos efeitos adversos dos protocolos quimioterápicos é a mucosite oral (MO), que consiste em uma resposta inflamatória dos tecidos da boca à toxicidade terapêutica direta dos fármacos (8). Essas lesões tendem a ser mais frequentes e mais severas em crianças, por conta da intensa atividade de mitose nessa fase, e comumente observada em pacientes com tumores hematológicos tratados com MTX (10,12).

Clinicamente, as alterações podem variar de eritemas e edemas a ulcerações confluentes por toda a mucosa (Figura 1), sendo nesses casos mais severos com dor intensa, sangramento, disfagia, dificuldade para falar, além de representar uma via de fácil acesso para microrganismos oportunistas presentes no biofilme bucal (44). Indivíduos com mucosite oral grave (MOG) necessitam interromper a terapêutica quimioterápica para tratar esses efeitos adversos, uma vez que prejuízos nutricionais, sepse e impacto negativo na qualidade de vida podem ser observados nessa fase (4,36).

Figura 1. Sinais clínicos da mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos. João Pessoa-PB, Brasil, 2022.



Fonte: Fotos cedidas pelo Grupo de Atenção Odontológica ao Paciente Oncopediátrico (GAOPO), grupo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) que presta serviço odontológico ao Hospital Napoleão Laureano em João Pessoa-PB. A e B: mucosite oral leve; C e D: mucosite oral moderada; E e F: mucosite oral grave.

Um modelo patobiológico de mecanismos múltiplos foi proposto para explicar, de forma molecular, a ocorrência da mucosite oral e a sua gradação. Arbitrariamente, pode ser dividido em cinco fases de acordo com os seus processos biológicos, que são: (A) iniciação, (B) geração da mensagem, (C) amplificação do sinal, (D) ulceração e (E) cicatrização (45).

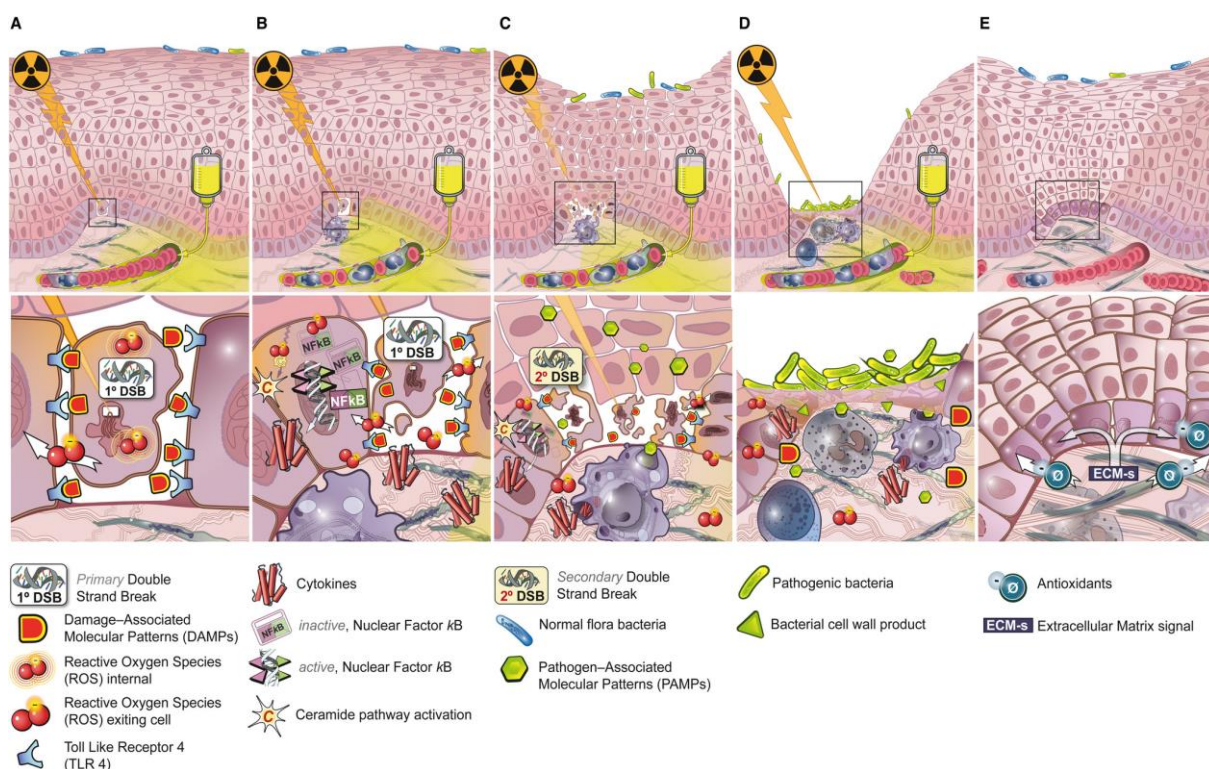
O início da inflamação ocorre com um dano irreversível no DNA, causado pelos quimioterápicos, que chegam pelos vasos sanguíneos e atingem a camada basal do epitélio (fase A). Este dano tecidual resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio, que ativam o gene *p53* (supressor tumoral) e o fator nuclear kappa-B (NF- κ B), desencadeando a sinalização de eventos submucosos (fase B), antes mesmo de se manifestarem clinicamente no epitélio. Estes eventos são marcados pela quimiotaxia de células de defesa, principalmente macrófagos, e sinalização de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (8,46).

A partir desses eventos, ocorre uma redução da oxigenação tecidual que, conseqüentemente, aumentará o dano à camada basal do epitélio, ao tecido conjuntivo e ao endotélio vascular. Isso promoverá uma desintegração na interface entre epitélio e submucosa, ao nível da membrana basal, onde os sinais serão amplificados (fase C) (46).

As células da camada basal do epitélio oral começam a sofrer apoptose e não conseguem promover divisão celular para reparo tecidual, formando, clinicamente, uma ulceração, que pode ser colonizada por patógenos oportunistas e gerar sepse nos pacientes (fase D). A recuperação das lesões ocorre espontaneamente, variando o período de cicatrização de acordo com o quadro sistêmico ou microbiota local, mas normalmente a mucosite regride em até 15 dias (fase E) (8,47).

Abaixo a figura 2 esquematiza o modelo patobiológico da mucosite oral proposto por Sonis (1988) (48):

Figura 2. Modelo patobiológico da mucosite oral.



Fonte: ELAD, S.; YAROM, N.; ZADIK, Y.; KUTEN-SHORRER, M.; SONIS, S. T. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 72, n. 1, p. 57-77, 2021. DOI: (10.3322/caac.21704) (49).

O diagnóstico da mucosite oral e a classificação da sua severidade podem ser estabelecidos por meio do uso de alguns instrumentos, como o *Oral Assessment Guide* (OAG) modificado – grau 1 a 3, escala da Organização Mundial da Saúde (OMS) – grau 0 a 4 e *National Cancer Institute's – Common Terminology Criteria for Adverse Events* (NCI-CTCAE) – grau 0 a 5 (Tabela 1).

Tabela 1. Instrumentos utilizados para diagnóstico e classificação da severidade da mucosite oral.

ESCALA	GRADAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
OAG modificado	Grau 1	Normalidade da voz, capacidade de engolir, textura dos lábios, língua mucosa jugal, palato, mucosa labial, gengiva e consistência da saliva.
	Grau 2	Voz rouca, dor ao engolir, lábios secos/rachados, língua aparentemente brilhosa com ou sem papilas e vermelhidão, mucosa jugal, palato e mucosa labial avermelhada/esbranquiçada, mas sem ulceração, gengiva edemaciada com ou sem vermelhidão e consistência da saliva espessa/viscosa.
	Grau 3	Dificuldade de falar/dor, incapacidade de engolir, lábios ulcerados/sangrantes, língua empolada/rachada, mucosa jugal, palato e mucosa labial com ulceração com ou sem sangramento, gengiva sangrante com ou sem estímulo e saliva ausente.
OMS	Grau 0	Sem alterações.
	Grau 1	Eritema, irritações, dor.
	Grau 2	Eritema, úlceras (dieta sólida).
	Grau 3	Úlceras (dieta líquida).
	Grau 4	Impossibilidade de alimentação.
NCI-CTCAE	Grau 0	Sem alterações.
	Grau 1	Sem sintomas ou sintomas leves, intervenção não indicada.
	Grau 2	Dor moderada ou úlceras que não interferem na deglutição, indicação de modificação de dieta.
	Grau 3	Dor intensa interferindo na deglutição.
	Grau 4	Consequências com risco de vida, intervenção urgente indicada.
	Grau 5	Morte.

OAG: *Oral Assessment Guide*; OMS: Organização Mundial da Saúde; NCI-CTCAE: *National Cancer Institute's – Common Terminology Criteria*

Desses instrumentos apresentados, a escala “OAG modificado” foi proposta para avaliar os efeitos adversos da quimioterapia na mucosa oral de crianças. De fácil aplicação, ela é, especialmente, indicada para essa população pela sua simplicidade, levando apenas 3 ou 4 minutos para completa avaliação (50). Nela são observados oito itens e atribuídos escores de 1 a 3, sendo 1 a normalidade dos parâmetros, o 2 representa alterações leves ou moderadas e o 3 corresponde alterações severas. O somatório final varia de 8 a 24, entretanto, não é atribuída uma nota de corte para diagnosticar ou classificar a mucosite. A classificação da gradação da mucosite se dá apenas pela presença do escore 2 ou 3 em algum dos parâmetros (51).

Os graus mais severos da mucosite oral podem ocasionar sérios danos ao paciente, inclusive o aumento do tratamento antineoplásico, uma vez que ele precisará ser interrompido para cuidar dos efeitos adversos que estão impactando de forma negativa na vida do indivíduo (52). Prejuízos nutricionais, dor intensa, sangramento, mielossupressão e sepse reduzem a qualidade de vida dos pacientes e, mais drasticamente, a morte foi observada em decorrência da evolução clínica e complicações da mucosite oral grave (53).

Tendo em vista os malefícios ocasionados pela quimioterapia, estudos têm avançado na investigação dos mecanismos moleculares relacionados com o desenvolvimento da mucosite oral (54). O advento da medicina de precisão objetiva investigar terapias personalizadas, com a intenção de minimizar os efeitos adversos e sofrimento relacionados aos tratamentos convencionais (55).

No tratamento do câncer essa tecnologia já pode ser observada, uma vez que características como o tipo de tumor, o microambiente tumoral, mutações genéticas, o RNA, análise proteômica e biomarcadores genéticos e imunológicos podem ser identificadas e estudadas para otimizar as terapias de forma personalizada (56). O estudo de biomarcadores tem como uma de suas finalidades investigar indicadores moleculares em processos patogênicos, representando medidas quantitativas e objetivas na patobiologia de doenças multifatoriais (57).

Neste contexto, em busca de minimizar os efeitos adversos dos quimioterápicos em pacientes oncopediátricos e evitar que eles cheguem à forma mais severa da mucosite oral, é necessária a investigação de biomarcadores na patobiologia da doença, a fim de reduzir o sofrimento e otimizar o tempo terapêutico desses indivíduos. Alguns estudos já foram publicados na intenção de identificar biomarcadores genéticos e sua influência na ocorrência e em sua severidade (7,13,54), o que servem de base para implementação de protocolos preventivos de rastreio, que poderiam ser utilizados na prescrição das doses terapêuticas.

2.3. Marcadores genéticos, epigenéticos e mucosite oral

As alterações genéticas que ocorrem com frequência de mais de 1% na população são denominadas de polimorfismos genéticos. Polimorfismos genéticos

compreendem alterações na sequência de bases no DNA, seja por inserção, deleção, variantes no número de cópias, inversões ou substituição de nucleotídeos.

As inserções e deleções de nucleotídeos acontecem, respectivamente, pela presença ou ausência de um pequeno seguimento de DNA de 100 a 1.000 pares de bases (pb) (58). As variantes no número de cópias correspondem a presença ou ausência de repetições grandes (maiores que 1.000pb) na sequência de DNA, muitas delas sendo do tipo duplicações segmentares, onde sequências repetidas se estendem ao longo da fita dupla-hélice. As inversões acontecem, na maioria das vezes, em regiões homólogas nas extremidades dos segmentos invertidos. Já as substituições ou polimorfismos de nucleotídeo único correspondem a trocas de nucleotídeos únicos em uma determinada sequência do DNA (58).

Essas modificações podem resultar na diminuição ou aumento da expressão gênica, ausência da expressão gênica, formação de proteínas com maior ou menor número de aminoácidos em sua sequência, e conseqüentemente, alterações na sua estrutura e/ou atividade, levando a uma deficiência/ineficiência da proteína (59).

Diferentes alelos estão associados à suscetibilidade ou proteção a doenças, podendo assim ser utilizados para predizer o risco a doenças. São ferramentas para diagnóstico e prognóstico, e podem direcionar para terapias personalizadas. A literatura mostra que diversos genes apresentam polimorfismos distribuídos de forma diferentes entre populações, uma vez que a origem étnica pode influenciar as frequências alélicas (60), o que, dentre outros fatores, pode explicar porque distintas populações apresentam maior ou menor suscetibilidade a uma mesma doença (61).

No contexto da mucosite oral, e somado aos demais fatores etiológicos, os polimorfismos genéticos de nucleotídeo único se apresentam como um objeto de estudo frequentemente encontrado na literatura, sobretudo em genes envolvidos no metabolismo do MTX (11).

Assim como polimorfismos genéticos, as alterações epigenéticas, em especial, alterações no perfil de metilação de DNA, também podem estar relacionadas à ocorrência de doenças (62).

As marcas epigenéticas são um mecanismo comum e necessário para a atividade gênica em nosso organismo, contudo ela é reversível, ou seja, é alterada durante nosso desenvolvimento desde a fecundação até o envelhecimento. Os fatores ambientais e hábitos de vida como, exposição à poluição, agrotóxicos, dieta, atividade

física, tabagismo, etilismo, infecções, estresse, cuidado parental e outros, podem alterar as marcas epigenéticas e essas alterações podem resultar em uma atividade gênica favorável ou não ao indivíduo. Em geral, hábitos e exposições danosas levam a alterações epigenéticas que favorecem o aparecimento de doenças (62,63).

Atualmente, há somente um estudo sobre epigenética e desenvolvimento de mucosite oral relacionada à quimioterapia com MTX (12). No entanto, alterações no perfil epigenético têm sido implicadas como um possível biomarcador de toxicidade relacionada ao tratamento com MTX no câncer e tratamento da artrite reumatoide (64–67).

Já foi visto que a toxicidade do MTX está ligada à capacidade de inibir a enzima metionina-adenosina transferase e, conseqüentemente, à produção do doador de radical metil (SAM). Portanto, modificações no perfil de metilação de DNA derivada de tratamento quimioterápico com MTX, não é exatamente um evento surpresa (68). De fato, alguns estudos mostraram que o MTX está associado a alterações no perfil de metilação do DNA, tanto global quanto sítio-específica (22–24).

Diante disso, observa-se a necessidade de mais investigações sobre marcas genéticas e epigenéticas na ocorrência da mucosite oral levando em consideração o estresse oxidativo e os fatores envolvidos na resposta inflamatória.

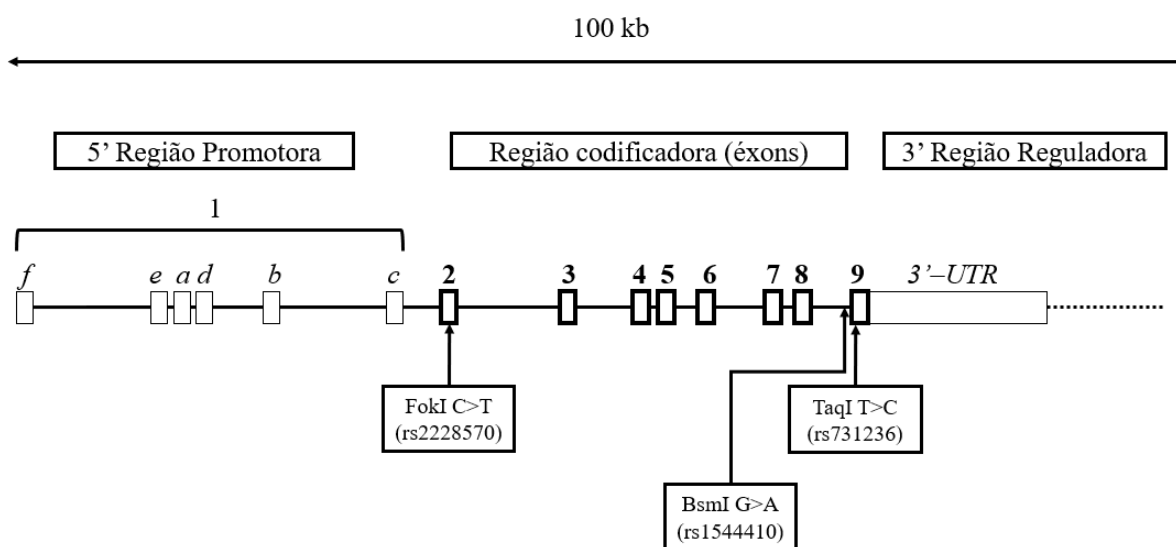
2.3.1. Vitamina D e mucosite oral

A vitamina D é um hormônio lipossolúvel sintetizado na derme, por meio da exposição à radiação ultravioleta B (UVB), e também pode ser obtido através da ingestão de alimentos (peixes gordurosos) ou suplementos. Sua principal função está relacionada com a manutenção da homeostase normal do cálcio e da saúde óssea (69).

O colecalciferol (vitamina D3) é estimulado pela radiação UVB, transportado para o fígado e os rins, onde é metabolizado, e transformado na forma biologicamente ativa da vitamina D, a 1,25 desidroxivitamina D ou calcitriol [1,25(OH)2D3]. Essa forma ativa liga-se aos receptores de vitamina D (VRD) e desenvolve seus efeitos biológicos no organismo, tais como: metabolismo ósseo, processos imunológicos, influência muscular, neural e circulatória, além de atuar em doenças dérmicas, reumáticas, transtornos mentais e possuir atividades anticancerígenas (70,71).

Embora já se entenda o papel da vitamina D nos processos imunológicos – efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e regulação da divisão celular (14) –, a presença de polimorfismos genéticos nos receptores de vitamina D (*VDR*) pode interferir na absorção e nos efeitos biológico da vitamina D no organismo (18). Os polimorfismos *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) são as modificações mais estudadas no gene *VDR* (Figura 3).

Figura 3. Estrutura do gene *VDR* e posição dos polimorfismos mais estudados.



Fonte: Modelo adaptado – Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, Pols HAP, van Leeuwen JPTM. Genética e biologia dos polimorfismos dos receptores da vitamina D. (2004) *Gene*, 338 143–156 (72).

O polimorfismo *BsmI* G>A (rs1544410) está localizado na posição 63980 no íntron 8 no 3'UTR (regiões não traduzidas do mRNA), resulta da substituição adenina-guanina e está relacionado com a regulação da expressão gênica, especialmente a estabilidade do mRNA (72).

FokI C>T (rs2228570) está localizado na junção entre o íntron 1 e o éxon 2 com a substituição citosina-timina na posição 30920 criando um códon de iniciação adicional. A variante T resulta em uma proteína completa (427 aa), enquanto o alelo C resulta em uma proteína menor (424 aa) e parece interagir mais fortemente com o fator de transcrição II B (TFIIB), representando uma proteína *VDR* transcricionalmente mais potente. Embora seja um polimorfismo funcional, não está claro o que isso pode representar (72).

Já o *TaqI* T>C (rs731236) está localizado no éxon 9 com a substituição silenciosa timina-citosina, ambas codificando o aminoácido isoleucina, no entanto, o alelo T está associado ao aumento da atividade transcricional, estabilidade do mRNA e alto nível sérico de vitamina D (73).

Alguns estudos mostram a relação desses polimorfismos com doenças inflamatórias, como periodontite (74), artrite reumatoide, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico (75), além de aumento do risco da cárie dentária (76).

Além dessas modificações genéticas, um estudo recente da epigenética mostrou que o perfil de metilação na região promotora do gene *VDR* (hipermetilação) influenciou na redução do nível de vitamina D e diminuição da expressão desse gene em sangue periférico de crianças com tuberculose (77). A metilação de *VDR* pode influenciar negativamente nos processos anti-inflamatórios, já que essa modificação epigenética, normalmente, está relacionada com o silenciamento gênico (78). Em consequência disso, os indivíduos tem uma diminuição da resposta imune e ficam mais susceptíveis a danos teciduais causados por agentes externos (77), como os quimioterápicos.

A investigação de modificações genéticas e epigenéticas neste gene como provável marcador biológico no contexto na mucosite oral parece promissora, uma vez que essas modificações podem estar relacionadas com uma diminuição dos eventos realizados pelo complexo vitamina D+VDR, portanto, menores níveis séricos de vitamina D ativa. Somada a essas informações, um estudo recente encontrou associação entre os baixos níveis de vitamina D e a ocorrência da mucosite oral (16). Ainda não há relatos sobre essas modificações genéticas e epigenéticas em relação à mucosite oral quimioinduzida.

2.3.2. Citocinas inflamatórias e mucosite oral

As fases 2 e 3 da mucosite oral estão relacionadas à ativação e produção de citocinas, que parecem ser mediadas pelo estresse oxidativo (79). O modelo patobiológico contemporâneo inclui a ativação do NF-κB como consequência da quimioterapia e radioterapia que podem contribuir para o desenvolvimento da mucosite. Entre muitos genes regulados positivamente pela ativação do NF-κB estão

os responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- α , IL-6 e IL-1 β (46,80–82).

Em especial, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 parecem ter um papel importante no desenvolvimento da mucosite. Um estudo (26) mostrou que as concentrações de ambas na saliva aumentaram após 4-12 dias de quimioterapia e esses níveis estavam relacionados à ocorrência de mucosite oral em adultos. Os autores ainda observaram que nos indivíduos com as concentrações mais altas de TNF- α antes da quimioterapia (*baseline*), a ocorrência de mucosite foi mais prevalente em relação aqueles que não apresentavam concentrações tão elevadas neste período. Previamente, outros autores já haviam observado que os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram após 2-3 dias de quimioterapia, alcançando a maior concentração em 3-5 dias (83–85).

As citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 são codificadas pelos genes *TNF- α* e *IL-6* respectivamente. O gene *TNF- α* está localizado no braço curto do cromossomo 6, compreendendo 2770 pares de bases e contendo 4 éxons. A proteína codificada por esse gene, apresenta 233 aminoácidos e 25644 Dalton (Da) e está envolvida na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose. O gene *IL-6* está localizado no braço curto do cromossomo 7, compreendendo 6119 pares de bases e contendo 5 éxons. A proteína codificada por esse gene, a interleucina-6 apresenta 212 aminoácidos e 26 Quilodalton (kDa), sendo produzida nos sítios de inflamação aguda e crônica e está envolvida na maturação de células B.

Um estudo recente a respeito de polimorfismos em *IL-6* e *TNF- α* no contexto da mucosite oral em pacientes oncopediátricos mostrou que não houve relação entre o -176G>C (rs1800795) em *IL-6*, e os resultados de -308G>A (rs1800629) em *TNF- α* apresentaram relação, mas foram expostos como inconclusivos (13). No entanto, trabalhos sobre a metilação de DNA nessas citocinas inflamatórias em relação à ocorrência de mucosite oral ainda não foram realizados.

Contudo, estudo sobre o perfil de metilação de *IL-6* e *TNF- α* já foram realizados em outras doenças inflamatórias bucais. Para *IL-6*, o perfil hipometilado já foi associado à estomatite aftosa recorrente (86), periodontite crônica (87) e pulpíte (88). Já para *TNF- α* , os dados mostram que tanto o perfil hipometilado (89) quanto o hipermetilado (90), a depender do sítio CpG, estiveram relacionados com a periodontite crônica.

2.3.3. Estresse oxidativo e mucosite oral

O estresse oxidativo diz respeito a um desbalanço entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes, que resulta na geração de espécies reativas e/ou radicais livres oriundos do metabolismo do oxigênio. A principal fonte geradora desses produtos é a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons (91).

Os sistemas de defesas antioxidantes têm a função de reduzir os danos causados pela produção de ERO, atrasando ou inibindo a ação oxidantes deles. Usualmente, podem ser divididos em: enzimáticos e não-enzimáticos, neste último caso, majoritariamente de origem dietética. Os enzimáticos são aqueles que agem impedindo ou controlando a formação de ERO, envolvidos na iniciação, propagação e amplificação das reações em cadeia, que culminam na formação de danos oxidativos. Como o próprio nome sugere, são formados por enzimas endógenas como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (91,92).

As ERO causam danos nos tecidos por vários mecanismos, que incluem danos à proteína, causando desdobramento reversível ou irreversível, fragmentação e reações de polimerização e degradação da proteína. Outra maneira é causando peroxidação lipídica, o que leva à produção de diversos dienos conjugados, peróxidos lipídicos e acumulação de malondialdeídos (MDA) que intracelularmente perturbam a integridade da membrana celular e levam ao colapso das células. O dano ao DNA causa várias mutações (92,93).

No que tange à relação do estresse oxidativo e a mucosite oral, o estresse oxidativo tem sido proposto como mediador da toxicidade do MTX. Foi demonstrado que o aumento do estresse oxidativo está implicado em uma resposta inflamatória na mucosa de ratos. Isto foi sugerido como resultado da ativação da citocina pró-inflamatória NF-κB induzida pelo estresse oxidativo (94).

Em adição, Ahmed et al. (2017) (25) observou aumentos nos níveis de MDA e diminuição de glutathiona peroxidase (GSH), além da redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, os quais são provas do estado de estresse oxidativo induzido pelo MTX nas mucosas vestibular e lingual. Os autores mostraram que o MTX poderia resultar em comprometimento do sistema de defesa antioxidante endógeno (enzimas antioxidantes), expondo assim as células aos radicais livres,

indicando que o MTX pode evocar extensos danos teciduais mediados pelo estresse oxidativo. Ainda, estudos prévios demonstraram que o MTX induz estresse oxidativo em vários tecidos evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA e diminuição das atividades de SOD (95–97).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase 3 e catalase são codificadas pelos genes *SOD3* e *CAT*, respectivamente. O gene *SOD3* está localizado no braço curto do cromossomo 4, compreendendo 10931 pares de bases. A *SOD3* apresenta 240 aminoácidos, aproximadamente 26 kDa e catalisa a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, diferente da *SOD 1* e *SOD2*, exclusivamente em compartimentos extracelulares (98). O gene *CAT* está localizado no braço curto do cromossomo 11, compreendendo 33138 pares de bases e contendo 13 éxons. A proteína codificada por esse gene, a catalase apresenta 527 aminoácidos, 60 kDa e um grupo heme. A catalase é uma enzima presente principalmente no peroxissomo, sendo responsável por converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (99,100).

O estudo das enzimas *SOD3* e *CAT* no contexto de pacientes oncológicos submetidos a regimes quimioterápicos, levou a observação de que, nos estágios iniciais, há uma liberação ERO após a administração dos quimioterápicos. A se saber, esse produto reativo liberado nos tecidos causa danos aos biocompostos essenciais, dentre eles o DNA, causando assim a morte celular (93).

Como já mencionado, as enzimas acima citadas são extremamente importantes para o balanço oxidativo celular e sua inativação/disfunção pode causar estresse oxidativo. O estresse oxidativo, por sua vez, está relacionado a diversas patologias, como: doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doença periodontal (101) e a própria mucosite oral (79).

O mesmo estudo conduzido sobre polimorfismos genéticos nas citocinas inflamatórias (*TNF- α* e *IL-6*) também conduziu análises nos genes *SOD2* (rs4880) e *CAT* (rs7943316). Os resultados mostraram que o genótipo AA em *CAT* associou-se com os indivíduos que desenvolveram a forma grave da doença. Não foi observada associação com *SOD2* (13).

Estudos sobre metilação do DNA e mucosite oral nesses genes ainda não foram conduzidos, no entanto, são promissores, uma vez que o perfil hipometilado nestes genes poderia levar a uma diminuição da expressão dessas enzimas

antioxidantes, que já estariam com atividade reduzida pelo uso do MTX (25). Contudo, estudo sobre o perfil de metilação de *SOD* e *CAT* já foram realizados em outras doenças, embora sejam escassos, e os dados mostram que em *SOD*, o perfil hipometilado da região promotora de *SOD3* esteve relacionado com infarto cerebral (102), câncer de mama (103) e o perfil hipermetilado da região promotora deste mesmo gene demonstrou associação com câncer de pulmão (104,105). Já para *CAT*, o perfil hipometilado no sítio CpG II desse gene mostrou relação com a leucemia linfocítica crônica (106) e um estudo do nosso grupo mostrou uma tendência à metilação, na região promotora de *CAT*, em células bucais de pacientes com periodontite crônica (107).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a influência de modificações genéticas e epigenéticas na ocorrência de mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos tratados com MTX.

3.2. Objetivos específicos

- a) Investigar se os polimorfismos genéticos *BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570) e *TaqI* T>C (rs731236) no gene do receptor da vitamina D (*VDR*) estão associados à ocorrência de mucosite oral e a sua severidade;
- b) Avaliar se o perfil de metilação do DNA no gene do receptor da vitamina D (*VDR*) está associado à mucosite oral ou à exposição ao MTX.
- c) Identificar se o perfil de metilação do DNA em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), está associado à mucosite oral ou à exposição ao MTX.
- d) Analisar se o perfil de metilação do DNA em genes que codificam as enzimas envolvidas em mecanismos do estresse oxidativo, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD3), está associado à mucosite oral ou à exposição ao MTX.

4. CAPÍTULO 1

*O manuscrito a seguir foi publicado no periódico “Oral Diseases”
(DOI:10.1111/odi.14394).*



Polymorphism but not methylation status in the VDR gene contributes to oral mucositis in children

Polymorphism and DNA methylation in oral mucositis

Viana Filho JMC, Souza BF, Coêlho MC, Valença AMG, Persuhn DC, de Oliveira NFP

José Maria Chagas Viana Filho¹ (ORCID: 0000-0002-5922-1217), Beatriz Fernandes de Souza¹ (ORCID: 0000-0001-9500-1273), Marina de Castro Coêlho¹ (ORCID:0000-0002-2007-8863), Ana Maria Gondim Valença¹ (ORCID: 0000-0001-8460-3981) Darlene Camati Persuhn² (ORCID: 0000-0001-5291-5454), Naila Francis Paulo de Oliveira^{1,2} (ORCID: 0000-0002-0855-2518)

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, - UFPB, João Pessoa, PB-Brasil

² Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, - UFPB, João Pessoa, PB-Brasil

***Corresponding Author:**

Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

Federal University of Paraíba, Centre of Exact and Natural Sciences, Molecular Biology Department, Cidade Universitária – Campus I, 58051-900, João Pessoa-PB/ Brazil, Phone: +55 83 3216-7643, nailafpo@dbm.ufpb.br

Keywords: Oral mucositis; Polymorphisms; DNA methylation; Epigenetic, Vitamin D receptor, VDR.

ABSTRACT

Objective: To investigate the relationship between the polymorphisms rs1544410 (*BsmI*), rs2228570 (*FokI*) and rs731236 (*TaqI*) and DNA methylation status in the *VDR* gene (vitamin D receptor) with oral mucositis (OM) in oncopaediatric patients treated with methotrexate (MTX®).

Methods: The population comprised healthy patients and with haematological malignancies aged between 5 and 19 years. An evaluation of oral conditions was performed using the Oral Assessment Guide. Demographic, clinical, biochemical and haematological data were obtained from medical records. Genomic DNA from oral mucosal cells was used for the analysis of polymorphisms (n=102) (PCR-restriction fragment length polymorphism) and DNA methylation (n=81) (methylation-specific PCR).

Results: Males predominated (57.8%) and the mean age was 10.3 years (± 4.7). OM affected 84.3% of patients, of which 53.1% developed severe oral mucositis (SOM). Patients with OM had lower platelet and leukocyte counts ($p < 0.05$). The G allele of rs1544410 ($p = 0.040$) and the CT genotype of rs2228570 polymorphisms were associated with SOM ($p = 0.038$). A partially methylated status in the *VDR* promoter was found in all patients.

Conclusion: OM is associated with lower leukocyte and platelet counts. SOM is associated with the rs1544410 and rs2228570 polymorphisms. The methylation status of the *VDR* is not associated with inflammation or exposure to MTX®.

INTRODUCTION

Studies investigating genetic markers of disease susceptibility are increasingly being performed in order to contribute to accurate health data. Precision medicine recommends that the treatment must be personalised for the patient in order to obtain the best results and the fewest adverse events, providing an increase in the success of the treatment and a decrease in the expenses and suffering of the patient (Ramaswami et al., 2018).

Regarding patient suffering, in particular, oral mucositis resulting from chemotherapy treatment of paediatric patients is an important issue. Oral mucositis is

an inflammatory disease associated with pain, which can vary between mild, moderate and severe forms, resulting in difficulties in eating, drinking and speaking. Severe oral mucositis (SOM) cases may require nutritional support (nasogastric tube) (Villa & Sonis, 2015; Mcgrath et al., 2020). It can worsen the patient's cachexia, decrease quality of life and lead to the temporary interruption of chemotherapy treatment to recover the oral mucosa (Qutob et al., 2013, Villa & Sonis, 2015). The toxicity caused by methotrexate (MTX®), a drug frequently used in the treatment of leukaemias and lymphomas, is one of the main causes of oral mucositis (Curra et al., 2021). Thus, studies to identify genetic markers of susceptibility to the development of oral mucositis may be important tools for the prevention of the severe form of the disease.

Studies addressing genetic markers such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the context of oral mucositis in oncopaediatric patients have already been conducted in China (Lu et al., 2018), the Netherlands (den Hoed et al., 2015; Gutierrez-Camino et al., 2017, Oosterom et al., 2018), Mexico (Ruis-Argüelles et al., 2007) and Turkey (Bektaş-Kayhan et al., 2012), among others. We are the only group to date to conduct studies of this nature in Brazil (Viana Filho et al., 2021, Coêlho et al., 2022). The genes investigated in these studies comprise genes involved in inflammation, oxidative stress, membrane proteins related to drug resistance, MTX® metabolism and micro-RNAs.

More recently, epigenetic marks have also been considered as biomarkers that could predict susceptibility to diseases, and moreover aid in diagnosis and prognosis; since they are reversible, they can also be targets for drugs (Costa-Pinheiro et al. 2015, Zhang et al., 2020). In the context of chemo-induced oral mucositis in paediatric patients, only one study to date has addressed epigenetics (Oosterom et al., 2018), in contrast to other oral diseases, such as periodontitis and oral cancer, in which it has been addressed since 2009 (Oliveira et al., 2009) and 1998 (Saito et al., 1998), respectively.

While genetic polymorphisms refer to changes in the DNA sequence, epigenetic marks refer to information that is 'above' the DNA, which are chemical changes in DNA and histones, as well as non-coding RNAs. These marks do not change the sequence of DNA bases, and are heritable and reversible; the most studied is DNA methylation (Zhang et al., 2020). Polymorphisms can have effects on the level of RNA expression and protein activity (Ruis-Ballesteros et al., 2020), and DNA

methylation can decrease or completely inhibit RNA expression by inhibiting the binding of transcription factors to the DNA (Zhang et al., 2020).

In particular, the gene that encodes the vitamin D receptor (VDR), which has been extensively studied in different contexts, has not yet been addressed in oral mucositis. Virtually all actions of vitamin D occur through VDR activation. Thus, any modification of VDR activities induced by VDR polymorphisms or epigenetic profiles can affect vitamin D function. The vitamin D-VDR receptor complex can bind to thousands of VDREs (VDR response elements) on the human genome and up- or down-regulate hundreds of genes (Ruiz-Ballesteros et al., 2020), including self-regulation (Zella et al., 2010). Of interest, evidence has shown that vitamin D and VDR have a mucosal immune function, which influences mucosal immunity, bacterial infection and inflammation (Sun, 2010, Ruiz-Ballesteros et al., 2020).

The BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570) and TaqI (rs731236) polymorphisms in the VDR gene are among the most studied and have been associated with oral diseases such as cancer, lichen planus, caries, periodontitis and temporomandibular disorders (Bektas-Kayhan et al., 2010; Kujundzic et al. 2016; Lei et al. 2021, Yildiz et al, 2021; Hamrun et al. 2022). VDR methylation status was assessed in hand-foot-and-mouth disease associated with enterovirus 71 in children (Li et al. 2020). VDR expression is regulated by DNA methylation status (Maruthai et al. 2020), is expressed by oral epithelial cells (Ge et al. 2020) and can be modulated by environmental factors (Beckett et al. 2016). Both markers (genetic and epigenetic) in the VDR gene have not yet been explored in chemoinduced oral mucositis until now.

These data suggest the importance of vitamin D pathway genes in the development of oral diseases. Indeed, in their recent review, Diachkova et al. (2021) reported that vitamin D is a fat-soluble secosteroid that plays a significant role throughout the body, including the maxillofacial region. The discovery of its receptors in many cells and organs made it possible to reveal the participation of vitamin D not only in the regulation of calcium phosphate metabolism, but also in immunological processes, providing anti-inflammatory and antimicrobial effects, delaying cell proliferation and stimulating differentiation.

Based on these facts, our objective was to investigate the BsmI, FokI and TaqI polymorphisms as well as the DNA methylation profile of the VDR gene in a population of oncological children with oral mucositis resulting from chemotherapy treatment with

MTX®, in an attempt to identify profiles associated with the occurrence or severity of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Considerations

The procedures for carrying out this research complied with the guidelines and norms that regulate research involving humans and were approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Centre of the Federal University of Paraíba (UFPB) (Opinion No. 4,878,034). All procedures also complied with the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments to comparable ethical standards.

Study Design

A cross-sectional observational analytical study was carried out. Cancer patients were approached in the paediatrics sector of Hospital Napoleão Laureano (HNL), a reference centre for cancer treatment in the state of Paraíba, located in João Pessoa (northeastern Brazil). Patients who were undergoing chemotherapy and those in the maintenance phase were investigated through direct observation. Patients were followed up throughout their chemotherapy treatment, as well as during their hospitalisation and maintenance periods, and oral surveillance was performed to categorise them according to the occurrence of mucositis. This follow-up is part of the daily routine of the oral healthcare team, which evaluates the oral cavity of patients for continuous care of perceived needs. Healthy patients were approached at a private dental office (João Pessoa/PB). The demographic, haematological, biochemical and oral health data of patients were collected from medical and dental records. The condition of the oral mucosa was assessed using the modified Oral Assessment Guide (OAG), an instrument that measures changes in the oral mucosa of paediatric patients resulting from chemotherapy. The instrument has scores ranging from 1 to 3, where 1 indicates normality of the mucosa, 2 indicates mild and/or moderate alterations and 3 indicates severe complications (Cheng et al., 2004). Eight items are evaluated: voice, swallowing, lips, tongue, saliva, labial/palate mucosa, labial mucosa and gingiva. Previously calibrated subjects ($\kappa = 0.87$) were responsible for the diagnosis. The

selection and location of the participants for the collection of biological samples occurred in the first 60 days of treatment for each patient, considering the disease status in this period (individuals without oral mucositis and individuals who presented oral mucositis). Data from patients who did not develop mucositis were followed up until the last session to ensure this condition. The choice of this period is due to the fact that mucositis appears mainly in the first weeks of treatment (Villa & Sonis, 2015). Biological samples for analysis of polymorphisms and DNA methylation were analysed at the Human Molecular Genetics Laboratory of the Molecular Biology Department of the Federal University of Paraíba.

Sample Selection

Sample was selected between July 2018 and April 2022, consisting of patients between 5 and 19 years of age of both sexes. Inclusion criteria for oncopaediatric patients were a primary diagnosis of leukaemia or lymphoma and treated with a chemotherapy protocol involving MTX®. Inclusion criteria for healthy patients were patients without a diagnosis of neoplasms and without oral alterations. Exclusion criteria were patients with cognitive or motor alterations that made collection procedures difficult; compromised health status or isolated with restricted contact, whose condition would make it impossible to carry out the collection; patients with any other oral inflammation other than oral mucositis; patients treated with a combination of chemo and radiotherapy.

For the analysis of genetic polymorphisms, 102 patients were evaluated, divided in two ways: 1- occurrence of oral mucositis: Group 1 (n=16), comprising individuals without oral mucositis during chemotherapy treatment; Group 2 (n=86) comprising individuals who presented oral mucositis during chemotherapy treatment; 2- severity of oral mucositis: Group 3 (n=23) comprising individuals in Group 2 with mild or moderate oral mucositis; Group 4 (n=26) comprising individuals in Group 2 with severe oral mucositis (SOM). Only patients from Group 2 with a thoroughly-filled OAG severity grading scale recorded in their dental charts were included into Group 3 or 4. Our analysis considered the oral examinations performed in the first 60 days of treatment for each patient in an attempt to reduce bias due to treatment duration.

For the DNA methylation analysis, 81 individuals were analysed and divided into four groups: Group 1 (n=21) comprising patients without cancer; Group 2 (n=15)

comprising patients without oral mucositis during chemotherapy; Group 3 (n=30) comprising patients without oral mucositis at the time of biological sample collection, but who presented during chemotherapy treatment; and Group 4 (n=15) comprising patients with mucositis at the time of biological sample collection.

Haematological and Biochemical Data

Haematological data refer to haemoglobin, leukocyte and platelet counts. Biochemical data refer to urea and creatinine levels. Data were obtained from medical records only from oncopaediatric patients and were collected referring to the moment when the patient developed oral mucositis. If the patient developed severe oral mucositis during follow-up, data were selected from this time point. Haematological data collected from patients who did not develop oral mucositis corresponded to the last chemotherapy session.

Sample Collection and DNA Extraction

Oral mucosal cells were obtained from a 1-minute rinse with 6 mL of autoclaved 3% dextrose. Then, 3 mL of TNE solution was added, and the sample was taken to the laboratory, where it was centrifuged at 11,000 rpm for 10 minutes, after which the supernatant was discarded. Lysis solution was added to the oral epithelial cell pellet and samples were frozen at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA was purified using 8 M ammonium acetate (Aidar & Line, 2007). The amount of purified DNA and its purity were measured in a spectrophotometer at an OD ratio of DNA with a 260/280 ratio above 1.8 was considered pure (NanoDrop® 2000).

Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the VDR Gene

SNPs were chosen based on functional significance and minor allele frequency (MAF) >0.20 according to the 1000Genomes database (A=0.29 for rs1544410 (BsmI); T=0.33 for rs2228570 (FokI); and C=0.27 for rs731236 (TaqI)). The genetic polymorphisms were analysed by the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique, in which DNA fragments were amplified by PCR, followed by enzymatic digestion by restriction enzymes, as previously described (Table 1). Samples were amplified in 15 µL reactions containing 7.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega Corporation, St. Madison,

USA), 1 μ L of each primer (10 μ M), 1 μ L of DNA and nuclease-free water. Polymorphisms were identified by the actions of the restriction enzymes BsmI, FokI and TaqI (New England Biolabs); the presence or absence of polymorphisms was determined from the products generated during digestion. The genotypes were analysed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels stained with 0.5% silver nitrate or GelRed® (Biotium).

Table 1. Details of reactions for polymorphism analysis (PCR-RFLP) and DNA methylation (MSP) in the *VDR* gene.

VDR Analysis	Primers	Anneling (°C)	Restriction Enzyme (°C – h)	Product	Reference
PCR-RFLP					
rs1544410 (G>A)	F: CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA R: AACCAGCGGGAAGTCAAGGG	58	<i>BsmI</i> (65° - 16h)	A (B): 870bp G (b): 640bp, 230bp	(108)
rs2228570 (C>T)	F: AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCT R: ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC	69	<i>FokI</i> (37° - 2h)	C (F): 267bp T (f): 197bp, 70bp	(19)
rs731236 (T>C)	F: GGGACGATGAGGGATGGACAGAGC R: GGAAAGGGGTTAGGTTGGACAGGA	68	<i>TaqI</i> (65° - 16h)	T (T): 512bp, C (t): 311bp, 201bp	(19)
MSP					
Methylated	F: GTAGACGTATATTCGTTGTCGTTATTC R: AAAATCTCATTACCAACACTTCG	56	-----	193bp	Maruthai et al., 2020
Unmethylated	F: AGATGTATATTGTTGTTGTTATTTGT R: AAAATCTCATTACCAACACTTCAAA	56	-----	190bp	Maruthai et al., 2020

VDR: vitamin D receptor; PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism; MSP: Methylation Specific PCR; F: forward; R: reverse; °C: temperature in degrees Celsius; h: hours; bp: base pairs. B,F,T: alleles not cleaved by the restriction enzyme; b,f,t: alleles cleaved by the restriction enzyme.

Analysis of Methylation Status in the VDR Gene

The analysis of VDR methylation was performed using methylation-specific PCR (MSP). To perform this technique, 1000 ng of purified DNA was transformed with sodium bisulphite using the EZ Methylation Gold Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Differences in DNA sequences after bisulphite treatment were detected by amplification with specific primers for methylated and unmethylated sequences, as previously described (Table 1). Samples were amplified in 20 μ L reactions containing 10 μ L of GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega Corporation), 1 μ L (10 μ M) of each primer, 1.5 μ L (50 ng) of bisulphite-transformed DNA and nuclease-free water. After amplification, methylation profiles were visualised by vertical electrophoresis of 7 μ L of amplified DNA on 6% polyacrylamide gels, followed by silver nitrate staining. To ensure the specificity of the methylated and unmethylated reactions, fully methylated (Universal Methylated Human DNA Standard,

Zymo Research) and fully unmethylated DNA (EpiTect Control DNA, Qiagen) were bisulphite-transformed as mentioned above and PCR was performed. Profiles were categorised as methylated, with amplification only for the methylated condition; unmethylated, with amplification for the unmethylated condition; and partially methylated, when amplification was observed for both conditions.

Statistical Analysis

Data were categorised and organised in a database to allow for analysis. Data normality was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. The relationships between the variables were measured using the chi-squared test, Fisher's exact test or the Mann-Whitney U test, adopting $\alpha < 0.05$ in Jamovi 2.3.12 software (Stats Open Now, Sydney, Australia). For the analysis of Hardy-Weinberg equilibrium, a Court Lab-HW calculator (Seattle Pacific University, Washington, USA) was used.

RESULTS

Demographic, Clinical, Biochemical and Haematological Data

Of a total of 102 oncopaediatric patients, there was a predominance of males in the sample (57.8%), with a primary diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia (74.5%) and a mean age of 10.3 years (± 4.7). It was observed that 84.3% of the patients had oral mucositis, of which 53.1% developed SOM. There was an association between the gender variable and the outcome of oral mucositis, revealing that male individuals had a 3.71-fold increased chance of developing oral mucositis (OR=3, 71; CI=1.18-11.7; $p=0.019$; chi-squared test). No associations or differences were observed between the variables age and underlying disease in relation to the occurrence and/or severity of oral mucositis. There was a difference between the leukocyte count ($p=0.006$; Mann-Whitney U test) and platelets ($p=0.016$; Mann-Whitney U test) between the groups, with lower values being observed in individuals with oral mucositis (Table 2). No associations with other haematological and biochemical parameters were detected (data not shown).

Table 2. Demographic, clinical and hematological data of oncopediatric patients for the study of genetic polymorphisms (n=102). All patients underwent chemotherapy

	No mucositis during chemotherapy ¹	Mucositis during chemotherapy ²	Mild/Moderate mucositis ³	Severe mucositis ⁴
	(n=16)	(n=86)	(n=23)	(n=26)
Age (years)				
Mean (± standard deviation)	10.1 (± 3.6)	10.4 (± 4.9)	8.7 (± 4.8)	10.8 (± 4.6)
Sex – n (%)				
Girls	11 (69.0)	32 (37.0)	10 (43.0)	12 (46.0)
Boys	05 (31.0)	54 (63.0)	13 (57.0)	14 (54.0)
Hematological parameters⁵				
Leukocytes (mm ³)	5300 (3775–7725)	2700 (1100–5225)	2900 (950–6100)	2150 (1025–4700)
Platelets (mm ³)	200000 (147250–342250)	120000 (60250–241150)	103000 (53000–261500)	120000 (58500–265000)
p-value (leukocytes) ⁶	0,006* ^{1,2}		0,568 ^{3,4}	
p-value (platelets) ⁶	0,016* ^{1,2}		0,741 ^{3,4}	
Cancer – n (%)				
ALL	11 (69.0)	65 (76.0)	20 (87.0)	19 (73.0)
AML	02 (12.0)	10 (12.0)	02 (9.0)	02 (8.0)
APL	01 (6.0)	02 (2.0)	-	02 (8.0)
CML	01 (6.0)	01 (1.0)	-	-
HL	01 (6.0)	01 (1.0)	01 (4.0)	-
NHL	-	07 (8.0)	-	03 (12.0)

n: absolute frequency; %: percentage frequency; –: missing value; ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia; AML: Acute Myeloid Leukemia; APL: Acute Promyelocytic Leukemia; CML: Chronic Myeloid Leukemia; HL: Hodgkin's Lymphoma; NHL: Non-Hodgkin's Lymphoma; ⁵: median (Q25 – Q75); ⁶: Mann-Whitney test; *: p<0.05.

involving MTX®.

Polymorphisms in the VDR Gene

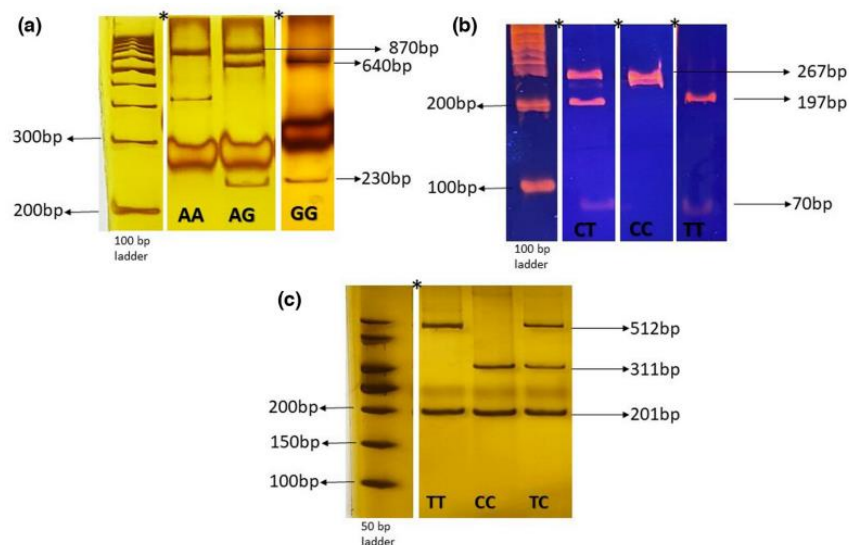
There was no association between the Bsml, FokI and TaqI polymorphisms and the occurrence of oral mucositis. However, when investigating the relationship between polymorphisms and disease severity, an association was identified between the CT (Ff) genotype of the FokI polymorphism and the occurrence of SOM, indicating that individuals who have that genotype have a 1.81-fold increased chance of developing the severe form of oral mucositis (OR=1.81; CI=0.58-5.66; p=0.038). A higher frequency of the G (b) allele of the Bsml polymorphism was also identified in the group with the severe form of the disease, which increases the chances of developing SOM by 2.27-fold (OR=2.27; CI=1.01-5.11; p=0.040) (Table 3 and Figure 1).

Table 3. Genotypic and allelic frequencies, Hardy-Weinberg Equilibrium of polymorphisms in *VDR* gene in oncopediatric patients with or without oral mucositis (n=102). All patients underwent chemotherapy involving MTX®.

	No Mucositis during chemotherapy ¹	Mucositis during chemotherapy ²	p-value ^{1,2}	Mild/Moderate mucositis ³	Severe mucositis ⁴	p-value ^{3,4}
	(n=16)	(n=86)		(n=23)	(n=26)	
<i>BsmI</i> (G>A)						
n (%)						
rs1544410						
AA	05 (33.3)	27 (31.4)	0.552 [€]	07 (30.4)	05 (19.2)	0.077 [€]
AG	04 (26.7)	32 (37.2)		13 (56.6)	10 (38.5)	
GG	07 (40.0)	27 (31.4)		03 (13.0)	11 (42.3)	
A (B)	14 (46.7)	86 (50.0)	0.516 [¥]	27 (58.6)	20 (38.5)	0.040 ^{**}
G (b)	18 (53.3)	86 (50.0)		19 (41.4)	32 (61.5)	
EHW	0.050	0.017	-	0.426	0.339	-
<i>FokI</i> (C>T)						
n (%)						
rs2228570						
CC	07 (43.8)	39 (45.9)	0.441 [€]	14 (60.9)	12 (46.2)	0.038 ^{*€}
CT	09 (56.2)	39 (45.9)		06 (26.1)	14 (53.8)	
TT	-	07 (8.2)		03 (13.0)	-	
C (F)	23 (71.9)	117 (68.8)	0.731 [¥]	33 (71.7)	38 (73.1)	0.882 [¥]
T (f)	09 (28.1)	53 (31.2)		13 (28.3)	14 (26.9)	
EHW	0.117	0.523	-	0.120	0.060	-
<i>TaqI</i> (T>C)						
n (%)						
rs731236						
CC	08 (50.0)	36 (42.9)	0.428 [€]	09 (40.9)	12 (46.2)	0.862 [€]
CT	08 (50.0)	40 (47.6)		11 (50.0)	11 (42.3)	
TT	-	08 (9.5)		02 (9.1)	03 (11.5)	
T	24 (75.0)	112 (66.7)	0.354 [¥]	29 (65.9)	35 (67.3)	0.884 [¥]
C	08 (25.0)	56 (33.3)		15 (34.1)	17 (32.7)	
EHW	0.182	0.512	-	0.597	0.843	-

n: absolute frequency; %: percentage frequency; -: missing value; EHW: Hardy-Weinberg Equilibrium; €: Fisher exact; ¥: Pearson's Chi-Square; *: p<0.05.

Figure 1- Representative fragments of PCR-RFLP reactions for *VDR* polymorphisms.



A) *BsmI* restriction fragments: AA (870 bp), AG (870, 640, 230bp) and GG (640, 230 bp); **B)** *FokI* restriction fragments: CC (267 bp), CT (267, 197, 70bp) and TT (197, 70 bp); **C)** *TaqI* restriction fragments: TT (512 bp), TC (512, 311, 201bp), and CC (311, 201 bp). A and C: 6% polyacrylamide gel stained with 0.5% silver nitrate; B: 6% polyacrylamide gel stained with GelRed®.

Methylation status in the VDR Gene

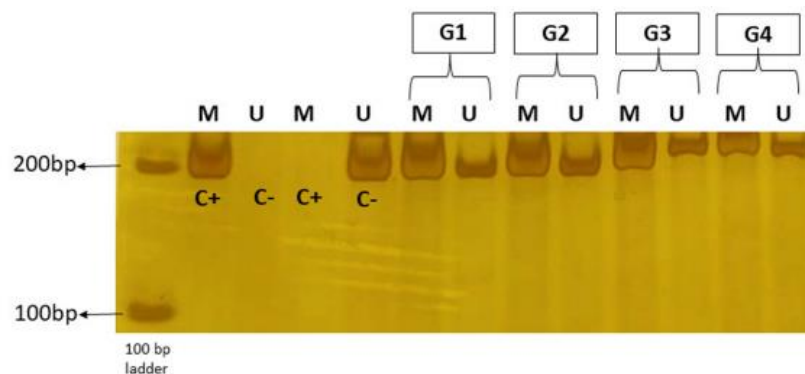
There were no associations or differences between the groups regarding the variables age, sex and underlying disease. Regarding the methylation profile, all individuals presented a partially methylated profile, which refers to the amplification of both conditions (met/unmet) (Table 4 and Figure 2).

Table 4. Demographic, clinical and methylation status in *VDR* gene data of healthy and oncopediatric patients with or without mucositis (n=81). Oncopediatric patients underwent chemotherapy involving MTX®.

	Healthy ¹	No Mucositis during chemotherapy ²	No Mucositis during sample collection, but during chemotherapy ³	Mucositis during sample collection ⁴
	(n=21)	(n=15)	(n=30)	(n=15)
Age (years)				
Mean (± standard deviation)	10.2 (± 3.3)	10.3 (± 3.7)	12.6 (± 4.8)	10.5 (± 4.3)
Sex – n (%)				
Girls	14 (67.0)	10 (67.0)	13 (43.0)	06 (40.0)
Boys	07 (33.0)	05 (33.0)	17 (57.0)	09 (60.0)
Cancer – n (%)				
ALL	-	10 (67.0)	24 (80.0)	11 (74.0)
AML	-	02 (12.0)	02 (7.0)	02 (13.0)
APL	-	01 (7.0)	02 (7.0)	-
CML	-	01 (7.0)	01 (3.0)	-
HL	-	01 (7.0)	-	-
NHL	-	-	01 (3.0)	02 (13.0)
Without cancer	21 (100.0)	-	-	-
Methylation Status – n (%)				
Methylated	-	-	-	-
Unmethylated	-	-	-	-
Met/Unmet	21 (100.0)	15 (100.0)	30 (100.0)	15 (100.0)

n: absolute frequency; %: percentage frequency; –: missing value; ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia; AML: Acute Myeloid Leukemia; APL: Acute Promyelocytic Leukemia; CML: Chronic Myeloid Leukemia; HL: Hodgkin's Lymphoma; NHL: Non-Hodgkin's Lymphoma

Figure 2- Representative bands of MSP reaction for *VDR* promoter.



C+: methylated control DNA; C-: unmethylated control DNA; M: methylated (193bp); U: unmethylated (190bp); G1: healthy; G2: oncopediatric patients without oral mucositis during chemotherapy; G3: oncopediatric patients without oral mucositis during sample collection, but during chemotherapy; G4: oncopediatric patients with oral mucositis during sample collection. 6% polyacrylamide gel stained with 0.5% silver nitrate.

DISCUSSION

The occurrence of oral mucositis can lead to nutritional impairment in the patient, which requires the interdiction of cancer treatment, increases the length of hospital stay and consequently negatively impacts patient quality of life and increases hospital costs (Martins et al., 2021).

The high prevalence of oral mucositis observed in the present study (more than 80% of patients) suggests a strong relationship with the type of tumour and associated chemotherapy. The sample of this study consisted of individuals diagnosed with haematological tumours, i.e. leukaemias and lymphomas, both of haematopoietic origin and already mentioned as the most frequent for the emergence of chemo-induced oral mucositis (Damascena et al., 2020). Treatments for these neoplasms are designed to inhibit malignant blood cell division, and end up generating myelosuppression (Livshits et al., 2014).

In the present study, it was observed that the group that developed mucositis was also the group that had the lowest leukocyte and platelet counts (Table 1). Previous studies have discussed this relationship (Curra et al., 2021), including some conducted by the same research group as this study (Damascena et al., 2020; Viana Filho et al., 2021). Thus, it has already been suggested that a low leukocyte and platelet count may favour the exacerbation of the inflammatory response of individuals to chemotherapy, as they will be insufficient to be able to mediate tissue recovery (Repsold & Joubert, 2021). In particular, MTX®, frequently used in the treatment of haematological neoplasms, is recognised as having a high cytotoxic power, which can lead to the death of epithelial cells, and is therefore associated with the occurrence of oral mucositis (Curra et al., 2021). Together, the cytotoxic capacity of MTX® and myelosuppression may contribute to the onset of oral mucositis, as observed in our results.

The data discussed above only reinforce what has already been reported in the literature. The novelty in this study is the relationship between polymorphisms in the gene encoding the vitamin D receptor (VDR) and oral mucositis in paediatric patients with haematologic malignancies treated with MTX®. We found in the studied population that the polymorphisms rs1544410 (BsmI) and rs2228570 (FokI) were associated with the severe form of the disease and increased the rate of SOM

occurrence. Other diseases, such as rheumatoid arthritis, COVID-19, diabetic complications, multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus, among others, have already been related to polymorphisms in the VDR gene (Zhang et al., 2020; Assis et al., 2022; Apaydin et al. 2022).

The human VDR gene is located on chromosome 12q12-q14 and comprises 11 exons and 11 introns. Polymorphisms named BsmI, FokI and TaqI are related to the enzyme that recognises the restriction site and are located in the intronic region, intron-exon junction and exonic region, respectively (Uitterlinden et al., 2004; Ruiz-Ballesteros et al., 2020).

BsmI G>A (rs1544410), located at position 63980 in intron 8 in the 3'UTR (non-translated regions of mRNA), results from adenine-guanine substitution and is related to the regulation of gene expression, especially mRNA stability (Uitterlinden et al. al., 2004). In the present study, the group of patients with SOM had a higher frequency of the G allele (also known as b, because it is cleaved by BsmI). A previous study identified a greater circulation of 1,25 dehydroxyvitamin D in individuals with the absence of the G allele (Morrison et al., 1994), suggesting that the presence of the G (b) allele could be related to lower expression of VDR and, consequently lowering defence capacity in inflammatory processes and leading to greater tissue injury. Regarding other oral diseases, the G (b) allele has already been associated with temporomandibular disorders (Yildiz et al., 2021), and the Bb (AG) and bb (GG) genotypes are associated with caries risk in children (Kong et al. 2017; Sadeghi et al., 2021).

FokI C>T (rs2228570) is located at the junction between intron 1 and exon 2 with the cytosine-thymine substitution at position 30920 creating an additional start codon. The T variant (also called f because it is cleaved by FokI at codon ATG) results in a full-length protein (427 aa), while the C allele (called F because it is not cleaved at codon ACG) results in a smaller protein (424 aa) and appears to interact more strongly with the TFIIB transcription factor, representing a more transcriptionally potent VDR protein. Although it is a functional polymorphism, it is unclear what this might represent, and it has been suggested that there might be a gene-specific effect in that some promoter areas of vitamin D target genes might be more sensitive to this VDR genotype-dependent difference in activity, while others may not be (Uitterlinden et al., 2004). Possibly, one of these effects may be related to decreased vitamin D levels, as

was shown in children with pneumonia carrying the CT (Ff) or CC (FF) genotype compared to children with the TT (ff) phenotype. The explanation was based on the information that the active form of vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D) regulates its own serum concentration and its precursor 25D by a negative feedback loop via VDR. Since the f allele has less biological activity than the shorter F allele, this allows more synthesis of 25D, which could explain the observed higher concentrations of vitamin D in children with the ff gene variant (Abouzeid et al., 2018). In the present study, the group of patients with SOM had a higher frequency of the CT genotype (Ff). Regarding other oral conditions, the CT genotype has been associated with a higher proportion of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque (Torrungruang et al., 2020) and with lichen planus (Kujundzic et al., 2016).

Making a combined analysis of these two findings, in order to verify the individuals who simultaneously presented the G allele of SNP rs1544410 and the CT genotype of SNP rs2228570, it was observed that patients who developed SOM had a distribution of 42.3%, compared to groups 1, 2 and 3 which presented 25%, 32.5% and 17.4%, respectively. Although the percentage of individuals with both genetic profiles was higher in the group with SOM, there was no association of this combination with the severity outcome ($p=0.071$; Fisher's exact test). It is interesting to evaluate the combination of different alterations in the same gene, and when they happen together, because since they biologically result in the same or similar outcomes, they can help to explain certain functional results (Uitterlinden et al., 2004). Perhaps a study with a larger sample size could show this association, which here seems to be a trend.

TaqI T<C (rs731236) is located on exon 9 with the thymine-cytosine substitution. In our study, the frequency of T (known as T because it is not cleaved by TaqI) and C (also known as t because it is cleaved) alleles of the CC, CT and TT genotypes did not show significant differences between groups, indicating that this polymorphism does not contribute to oral mucositis. In contrast to our data, the CC/CT genotype was associated with periodontitis (Hamrun et al., 2022) and the C allele and CC genotype were associated with caries risk in children (Lei et al., 2021).

Vitamin D interacts with the immune system through its regulation of the division and differentiation of defence cells. It regulates the production of immunosuppressive cytokines and inhibits the division and differentiation of T and B lymphocytes, all of which are mediated by VDR receptors, which are present on

immune cells (Gil et al., 2018). Thus, it is believed that the presence of changes at the level or structure of these receptors can deregulate the inflammatory process and exacerbate inflammatory responses. This could perhaps explain the increased risk of individuals with VDR BsmI and FokI polymorphisms to develop the most severe stages of chemo-induced oral mucositis. In addition, it has already been reported that the decrease in 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D3) levels in children with haematologic malignancies treated with MTX® is associated with severe oral mucositis (Oosterom et al., 2019). Together, these data show the importance of the vitamin D pathway for the development of the severe form of chemo-induced oral mucositis.

Another approach of our study was the study of the DNA methylation profile in the VDR gene. DNA methylation occurs mainly at cytosines that precede guanines (CpG dinucleotides) in gene promoter regions and can decrease or silence gene expression (Zhang et al., 2020). The methylation profile is tissue and site-specific, is associated with disease (Zhang et al., 2020) and can be modulated by environmental factors such as UV radiation, nutrition, smoking, infection, physical activity, drugs, etc. (Costa et al., 2016; Esteller, 2017; Luna et al., 2018; de Oliveira et al., 2020; Diniz et al., 2021; Corley et al., 2021). It is important to mention that the VDR is expressed by oral cells (Ge et al., 2020), which makes the study of this gene in oral cells interesting, especially in the case of inflammation that affects the oral mucosa. In this sense, for this approach, we added a group of healthy children who had not had the experience of chemotherapy, in an attempt to identify a biomarker of exposure, i.e. a marker of response to treatment, in addition to a biomarker of inflammation (in the group of oncological children).

As with the TaqI polymorphism, the methylation profile of the VDR gene was not associated with oral mucositis in this study, and the partially methylated profile in the promoter region of the VDR gene was found in all individuals (Table 4). Recently, a study addressing the methylation profile in the promoter region of the VDR gene in adolescents without cancer in the same city where the present study was conducted also found partial methylation, in which the mean ranged from 26% ($\pm 12.4\%$) to 30% ($\pm 14.2\%$) in blood cells (Lacerda de Lucena et al., 2021). In our study, although it did not take a quantitative approach, the analysis of the electrophoresis gels suggests partial methylation of around 50% in oral cells, since the bands of the methylated and unmethylated conditions seem equivalent (Figure 2). In contrast, the same CpG site

analysed in our study was previously studied by Maruthai et al. (2020), who identified hypermethylation in blood cells from children with tuberculosis; this profile was associated with decreased VDR expression. For children and adolescents with cystic fibrosis, hypomethylation at CpG site 723 in the promoter region of the VDR gene in blood cells appears to be a common profile (de Paiva et al., 2021). Hypomethylation in the promoter of VDR was found in children with severe associated hand, foot and mouth disease compared to moderate cases (Li et al., 2020).

Just as we did not identify an association with inflammation, we also did not find an association with exposure to chemotherapy (Table 4 and Figure 2). In contrast, an Australian study showed that the methylation profile in the promoter region of the VDR gene can be modulated by the duration and intensity of UV radiation derived from sun exposure in blood cells (Beckett et al., 2016).

Currently, in addition to the present study, there has been only one study on epigenetics and chemo-induced oral mucositis in children and adolescents. Oosterom et al. (2018) identified an increase in global methylation levels in blood cells after chemotherapy with MTX®; however, they did not find an association with oral mucositis, indicating that the global methylation profile is a marker of exposure but not of inflammation. In the present study, the promoter region of the VDR gene was not identified as a biomarker of inflammation or exposure in oral cells. It is worth mentioning that we reproduced here the study by Maruthai et al. (2020), which did not mention the studied CpG site. It is possible that this same CpG site can be modulated in blood cells, which are more exposed to chemotherapy than oral cells, or other CpG sites can be modulated in oral cells. Indeed, alterations in the methylation profile in blood cells have been implicated as a possible biomarker of exposure related to MTX® treatment in rheumatoid arthritis. Both increases and decreases in the methylation level can occur at different CpG sites in CD4+ naïve T cells (e.g. a decrease in the methylation level of the ZNF793, DNAAF5, TRIM15, TRIM10 and USP37 genes) and memory T cells (an increase in the methylation level in the ZNF793, DNAAF5, TRIM15, TRIM10 and USP37 genes) in patients with rheumatoid arthritis (Guderud et al., 2021).

The limitations of our study have already been explored previously (Viana Filho et al., 2021; Coêlho et al., 2022) and can be listed: a study power less than 80% due to the small sample size, as this was a single-centre study based on an adverse event (oral mucositis) of a rare disease (haematological neoplasms); the gap between

sample collections due to the COVID-19 pandemic, which also contributed to the small sample size; dependence on medical records duly completed by the hospital staff so that patients could be included in the research. Even considering these limitations, our data are unpublished and can be used as a guide for intervention strategies as well as studies with other populations and with a larger sample size. Regarding intervention strategies focusing on the vitamin D pathway, it was recently shown that a vitamin D gel in the oral mucosa of patients with head and neck cancer treated with radiotherapy allowed the maintenance of the mild form of the disease or its remission, including decreased pain, compared to the control group that developed the severe form (Bakr et al., 2021). This may be particularly important for individuals with VDR gene polymorphisms.

It is known that oral mucositis is a multifactorial disease, and data such as age, sex, nutrition, genetics, biochemistry and others are associated with the development of this inflammation (Damascena et al., 2020). Our group has been dedicated to the study of genetic polymorphisms in this context, and the present study adds information to the list of genes that we have already associated with chemo-induced oral mucositis in paediatric patients with haematological neoplasms: ABCG2 (rs2231142) (Viana-Filho et al., 2021), CAT (rs7943316) (Coêlho et al. 2022), and now VDR (rs1544410 and rs2228570). In addition to these genes, the literature has already shown association with ABCC4 (rs7317112), MDR-1 (rs1045642), MTHFR (rs1801133) and miR-1206 (rs2114358) (Bektaş-Kayhan et al., 2012; den Hoed et al., 2015, Gutierrez-Camino et al., 2017; Lu et al., 2021). Taken together, demographic, clinical, biochemical, genetic and epigenetic data can be tools supporting personalised interventions, with the objective of reducing expenses and, more importantly, increasing the quality of life of patients who are already experiencing intense suffering from the underlying disease.

CONCLUSION

The occurrence of oral mucositis is associated with lower leukocyte and platelet counts. Severity is associated with the presence of the G allele for rs1544410 and the CT genotype for rs2228570. A partially methylated profile in the VDR promoter

is common in oral cells and is not associated with inflammation or exposure to MTX® chemotherapy.

Acknowledgements: This work was financial supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Brazil) (17/2021); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (434392/2018-9) and the Graduate Program in Dentistry - Universidade Federal da Paraíba, Brazil. BFS and MCC were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions: José Maria Chagas Viana Filho performed collection of samples, molecular and statistical analysis and writing of the manuscript. Beatriz Fernandes de Souza contributed to the collection of samples and was involved in the critical review of the manuscript. Marina de Castro Coêlho contributed to the collection of samples and was involved in the critical review of the manuscript. Ana Maria Gondim Valença contributed to study design, coordinated and supervised the collection of samples and was involved in the critical review of the manuscript. Darlene Camati Persuhn coordinated the polymorphism analysis, contributed to data interpretation and was involved in the critical review of the manuscript. Naila Francis Paulo de Oliveira is responsible for acquiring Labor funding, designed the study, coordinated the methylation analysis, contributed to data interpretation and was involved in the critical review of relevant intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

Abouzeid, H., Abdelaal, N. M., Abdou, M. A., Mosabah, A. A. A., Zakaria, M. T., Soliman, M. M., Sherif, A. M., ... Elbasyouni, H. A. A. (2018). Association of vitamin D receptor gene FokI polymorphism and susceptibility to CAP in Egyptian

- children: a multicenter study. *Pediatric Research*, 84(5), 639–644. doi: 10.1038/s41390-018-0149-y.
- Aidar, M., Line, S. R. P. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal*, 18(2): 148–152. doi: 10.1590/S0103-64402007000200012.
- Apaydin, T., Polat, H., Yazan, C. D., Ilgin, C., Elbasan, O., Dashdamirova, S., Bayram, F., ... Gozu, H. (2022). Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on the prognosis of COVID-19. *Clinical Endocrinology*, 96(6): 819-830. doi: 10.1111/cen.14664.
- Assis, C. S., Diniz, T. G., Alcântara, J. O. S., Brito, V. P. A. S., Nascimento, R. A. F., Nunes, M. K. D. S., Silva, A. S., ... Persuhn, D. C. (2022). Metabolic impact of the VDR rs1544410 in diabetic retinopathy. *PLoS One*, 17(2): e0263346. doi: 10.1371/journal.pone.0263346.
- Bakr, I. S., Zaki, A. M., El-Moslemany, R. M., Elsaka, R. O. (2021) Vitamin D oral gel for prevention of radiation-induced oral mucositis: A randomized clinical trial. *Oral Diseases*, 27(5): 1197–1204. doi: 10.1111/odi.13650.
- Beckett, E. L., Jones, P., Veysey, M., Duesing, K., Martin, C., Furst, J., Yates, Z., ... Luccock M. (2017). VDR gene methylation as a molecular adaption to light exposure: Historic, recent and genetic influences. *American Journal Human Biology*, 29(5): 1–11. doi: 10.1002/ajhb.23010.
- Bektaş-Kayhan, K., Küçük Hüseyin, Ö., Karagöz, G., Ünür, M., Öztürk, O., Ünüvar, A., Devocioğlu, Ö., ... Yılmaz-Aydoğan, H. (2012). Is the MDR1 C3435T polymorphism responsible for oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(10): 5251-5. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.10.5251.
- Bektas-Kayhan, K., Ünür, M., Yaylim-Eraltan, I., Ergen, H. A., Toptas, B., Hafiz, G., Karadeniz, A., ... Isbir, T. (2010) Association of vitamin D receptor Taq I polymorphism and susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *In Vivo*, 24(5): 755-9. PMID: 20952745.
- Charoenngam, N., Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, 12(7): 2097. doi: 10.3390/nu12072097.
- Cheng, K. K. F., Chang, A. M., Yuen, M. P. (2004). Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy: A randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. *European Journal of Cancer*, 40(8): 1208–1216. doi: 10.1016/j.ejca.2003.10.023.
- Coêlho, M. C., Viana Filho, J. M. C., Souza, B. F., Valença, A. M. G., Persuhn, D. C., Oliveira, N. F. P. (2022). Genetic polymorphisms of genes involved in oxidative stress and inflammatory management in oncopediatric patients with chemo-induced oral mucositis. *Journal Applied of Oral Science*, 30: e20210490. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0490.
- Corley, M. J., Pang, A. P. S., Dody, K., Mudd, P. A., Patterson, B. K., Seethamraju, H., Bram, Y., ... Ndhlovu, L. C. (2021). Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood reveals an epigenetic signature associated with severe COVID-19. *Journal of Leukocyte Biology*, 110(1): 21–26. doi: 10.1002/JLB.5HI0720-466R.
- Costa, L. A., Silva, I. C. B., Mariz, B. A. L. A., Silva, M. B., Freitas-Ribeiro, G. M., Oliveira, N. F. P. (2016). Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of KRT14, KRT19, MIR-9-3 and MIR-137 genes of oral mucosa. *Archives of Oral Biology*, 72: 56-65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.013.

- Costa-Pinheiro, P., Montezuma, D., Henrique, R., Jerónimo, C. (2015). Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. *Epigenomics*, 7(6):1003-15. doi: 10.2217/epi.15.56.
- Curra, M., Gabriel, A. F., Ferreira, M. B. C., Martins, M. A. T., Brunetto, A. T., Gregianin, L. J., Martins, M. D. (2021). Incidence and risk factors for oral mucositis in pediatric patients receiving chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*, 29(11): 6243-6251. doi: 10.1007/s00520-021-06199-5.
- Damascena, L. C. L., Lucena, N. N. N., Ribeiro, I. L. A., Pereira, T. L., Lima-Filho, L. M. A., Valença, A. M. G. (2020). Severe Oral Mucositis in Pediatric Cancer Patients: Survival Analysis and Predictive Factors. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 17(4): 1235. doi: 10.3390/ijerph17041235.
- De Oliveira, N. F. P., Souza, B. F., Coêlho, M. C. (2020). UV Radiation and Its Relation to DNA Methylation in Epidermal Cells: A Review. *Epigenomes*, 4(4):23. doi: 10.3390/epigenomes4040023.
- Den-Hoed, M. A., Lopez-Lopez, E., Te-Winkel, M. L., Tissing, W., Rooij, J. D., Gutierrez-Camino, A., Garcia-Orad, A., ... Van-Den-Heuvel-Eibrink, M. M. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(3):248-54. doi: 10.1038/tpj.2014.63.
- Diachkova, E., Trifonova, D., Morozova, E., Runova, G., Ashurko, I., Ibadulaeva, M., Fadeev, V., ... Tarasenko, S. (2021). Vitamin d and its role in oral diseases development. Scoping review. *Dentistry Journal*, 9(11):129. doi: 10.3390/dj9110129.
- Diniz, T. G., Silva, A. S., Santos M. K. N., Ribeiro, M. D., Filho, J. M., Nascimento, R. A. F., Gomes, C. N. A. P., ... Persuhn, D. C. (2021). Physical Activity Level Influences MTHFR Gene Methylation Profile in Diabetic Patients. *Frontiers in Physiology*, 11: 618672. doi: 10.3389/fphys.2020.618672.
- Esteller, M. (2017). Epigenetic drugs: More than meets the eye. *Epigenetics*, 12(5): 307. doi: 10.1080/15592294.2017.1322881.
- Ge, X., Xie, H., Wang, L., Li, R., Zhang, F., Xu, J., Zhao, B., ... Du, J. (2021). MicroRNA-122 promotes apoptosis of keratinocytes in oral lichen planus through suppressing VDR expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(7): 3400-3407. doi: 10.1111/jcmm.16418.
- Gil, A., Plaza-Diaz, J., Mesa, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(2): 87–95. doi:10.1159/000486536.
- Guderud, K., Sunde, L. H., Flåm, S. T., Mæhlen, M. T., Mjaavatten, M. D., Norli, E. S., Evenrød, I. M., ... Lie, B. A. (2021). Methotrexate Treatment of Newly Diagnosed RA Patients Is Associated With DNA Methylation Differences at Genes Relevant for Disease Pathogenesis and Pharmacological Action. *Frontiers in Immunology*, 12: 713611. doi: 10.3389/fimmu.2021.713611.
- Gutierrez-Camino, A., Oosterom, N., Den-Hoed, M. A. H., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pluijm, S. M. F., Pieters, R., ... Van-Den-Heuvel-Eibrink MM. (2017). The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Genomics*, 27(8): 303-306. doi: 10.1097/FPC.0000000000000291.
- Hamrun, N., Ruslin, M., Marlina, E., Oktawati, S., Saito, T., Yusuf, A. S. H., Ou, KL. (2022). Profile of vitamin D receptor gene polymorphism TaqI in patients with periodontitis. *Biomedical Reports*, 16(5):35. doi: 10.3892/br.2022.1518.

- Issa, C. T., Silva, A. S., Toscano, L. T., Medeiros, M. S., Persuhn, D. C., Silva-Diniz, A., Carvalho-Costa, M. J., ... Rodrigues-Gonçalves M. C. (2016). Relationship between cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. *Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. Experimental Gerontology*, 81: 56–64. doi: 10.1016/j.exger.2016.04.020.
- Kong, Y. Y., Zheng, J. M., Zhang, W. J., Jiang, Q. Z., Yang, X. C., Yu, M., Zeng, S. J. (2017). The relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and deciduous tooth decay in Chinese children. *BMC Oral Health*, 17(1): 111. doi: 10.1186/s12903-017-0398-x.
- Kujundzic, B., Zeljic, K., Supic, G., Magic, M., Stanimirovic, D., Ilic, V., Jovanovic, B., ... Magic, Z. (2016). Association of VDR, CYP27b1, CYP24a1 and MTHFR gene polymorphisms with oral lichen planus risk. *Clinical Oral Investigation*, 20(4): 781-9. doi: 10.1007/s00784-015-1572-7.
- Lucena, L. L., Silva, A. S., Nascimento, R. A. F. D., Persuhn, D. C., Neves, J. P. R., Costa, M. J. C., Queiroz, D. J. M., ... Gonçalves, M. D. C. R. (2021). Relationship between BsmI polymorphism and VDR gene methylation profile, gender, metabolic profile, oxidative stress, and inflammation in adolescents. *Nutrición Hospitalaria*, 38(5):911-918. doi: 10.20960/nh.03383.
- Lei, W., Tian, H., Xia, Y. (2021). Association Between the TaqI (rs731236 T>C) Gene Polymorphism and Dental Caries Risk: A Meta-analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 25(5):368-375. doi: 10.1089/gtmb.2020.0263.
- Li, Y. P., Deng, H. L., Wang, W. J., Wang, M. Q., Li, M., Zhang, Y. F., Wang, J., ... Dang, S. S. (2020). Vitamin D receptor gene methylation in patients with hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71. *Archives of Virology*, 165(9):1979-1985. doi: 10.1007/s00705-020-04701-8.
- Livshits, Z., Rao, R. B., Smith, S. W. (2014). An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(1):167-203. doi: 10.1016/j.emc.2013.09.002.
- Lu, S., Zhu, X., Li, W., Chen, H., Zhou, D., Zhen, Z., Sun, F., ... Sun, X. (2021). Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphism on High-Dose Methotrexate-Related Toxicities in Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Patients. *Frontiers in Oncology*, 11: 598226. doi: 10.3389/fonc.2021.598226.
- Luna, R. C. P., Nunes, M. K. S., Monteiro, M. G. C. A., Silva, C. S. O., Nascimento, R. A. F., Lima, R. P. A., Pimenta, F. C. F., ... Carvalho-Costa, M. J. (2018). α -Tocopherol influences glycaemic control and miR-9-3 DNA methylation in overweight and obese women under an energy-restricted diet: a randomized, double-blind, exploratory, controlled clinical trial. *Nutrition & Metabolism*, 15: 49. doi: 10.1186/s12986-018-0286-7.
- Paiva, M. P., Queiroz, D. J. M., Silva-Junior, C. C., Cartaxo, C. G. B., Coelho, M. C., Pordeus, R. C. L., Lima, R. L. F. C., ... Goncalves, M. C. R. (2021). Effect of vitamin D3 supplementation upon the metabolic and DNA methylation profile of cystic fibrosis patients. *Journal of Biochemical and Clinical Genetics*, 4(2): 76-84. doi: 10.24911/JBCGenetics/183-1613502878
- Lopes-Martins, A. F., Nogueira, T. E., Morais, M. O., Sousa-Neto, S. S., Oton-Leite, A. F., Valadares, M. C., Aires-Freitas, N. M., ... Mendonça, E. F. (2022). Cost-effectiveness randomized clinical trial on the effect of photobiomodulation therapy for prevention of radiotherapy-induced severe oral mucositis in a Brazilian cancer

- hospital setting. *Supportive Care in Cancer*, 29(3): 1245–1256. doi: 10.1007/s00520-020-05607-6.
- Maruthai, K., Sankar, S., Subramanian, M. (2022). Methylation Status of VDR Gene and its Association with Vitamin D Status and VDR Gene Expression in Pediatric Tuberculosis Disease. *Immunological Investigations*, 51(1): 73–87. doi: 10.1080/08820139.2020.1810702.
- McGrath, K. H., Evans, V., Yap, J. (2020). Indications and Patterns of Use for Parenteral Nutrition in Pediatric Oncology. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 44(4): 632-638. doi: 10.1002/jpen.1685.
- Morrison, N. A., Qi, J. C., Tokita, A., Kelly, P. J., Crofts, L., Nguyen, T. V., Sambrook, P. N., ... Eisman, J. A. (1994). Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 367(6460): 284–287. doi:10.1038/367284a0.
- Oliveira, N. F., Damm, G. R., Andia, D. C., Salmon, C., Nociti, F. H. Jr., Line, S. R., Souza, A. P. (2009). DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(9): 719-25. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01446.x.
- Oosterom, N., Berrevoets, M., Den-Hoed, M. A. H., Zolk. O., Hoerning, S., Pluijm, S. M. F., Pieters R, ... Heil, S. G. (2018). The role of genetic polymorphisms in the thymidylate synthase (TYMS) gene in methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Genomics*, 28(10): 223-229. doi: 10.1097/FPC.0000000000000352.
- Oosterom, N., Dirks, N. F., Heil, S. G., Jonge, R., Tissing, W. J. E., Pieters, R., Van-Den-Heuvel-Eibrink, M. M., ... Pluijm, S. M. F. (2019). A decrease in vitamin D levels is associated with methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Supportive Care in Cancer*, 27(1): 183–190. doi:10.1007/s00520-018-4312-0.
- Oosterom, N., Griffioen, P. H., Den-Hoed, M. A. H., Pieters, R., Jonge, R., Tissing, W. J. E., Van-Den-Heuvel-Eibrink, M. M., ... Heil, S. G. (2018). Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*, 13(7): 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0199574.
- Qutob, A. F., Gue, S., Revesz, T., Logan, R. M., Keefe, D. (2013). Prevention of oral mucositis in children receiving cancer therapy: a systematic review and evidence-based analysis. *Oral Oncology*, 49(2): 102-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.08.008.
- Ramaswami, R., Bayer, R., Galea, S. (2018). Precision Medicine from a Public Health Perspective. *Annual Review of Public Health*, 39: 153-168. doi: 10.1146/annurev-publhealth-040617-014158.
- Repsold, L., Joubert, A. M. (2021). Platelet function, role in thrombosis, inflammation, and consequences in chronic myeloproliferative disorders. *Cells*, 10(11): 3034. doi: 10.3390/cells10113034
- Ruiz-Argüelles, G. J., Coconi-Linares, L. N., Garcés-Eisele, J., Reyes-Núñez, V. (2007). Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology*, 12(5):387-91. doi: 10.1080/10245330701448479.
- Ruiz-Ballesteros, A. I., Meza-Meza, M. R., Vizmanos-Lamotte, B., Parra-Rojas, I., Cruz-Mosso, U. (2020). Association of Vitamin D Metabolism Gene Polymorphisms with Autoimmunity: Evidence in Population Genetic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 9626. doi: 10.3390/ijms21249626.

- Sadeghi, M., Golshah, A., Godiny, M., Sharifi, R., Khavid, A., Nikkerdar, N., Tadakamadla, S. K. (2021). The Most Common Vitamin D Receptor Polymorphisms (ApaI, FokI, TaqI, BsmI, and BglI) in Children with Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Children*, 8(4): 302. doi: 10.3390/children8040302.
- Saito, Y., Takazawa, H., Uzawa, K., Tanzawa, H., Sato, K. (1998). Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG island. *International Journal of Oncology*, 12(2):293-8. doi: 10.3892/ijo.12.2.293.
- Salimi, S., Eskandari, F., Rezaei, M., & Sandoughi, M. (2019). Vitamin D Receptor rs2228570 and rs731236 Polymorphisms are Susceptible Factors for Systemic Lupus Erythematosus. *Advanced Biomedical Research*, 8, 48. doi: 10.4103/abr.abr_19_19.
- Sun, J. (2020). Vitamin D and mucosal immune function. *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(6):591-5. doi: 10.1097/MOG.0b013e32833d4b9f.
- Torrunguang, K., Chantarangsu, S., Sura, T., Thienpramuk, L. (2020). Interplay between vitamin D receptor FokI polymorphism and smoking influences *Porphyromonas gingivalis* proportions in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(8):912-920. doi: 10.1111/jcpe.13307.
- Uitterlinden, A. G., Fang, Y., Van-Meurs, J. B., Pols, H. A., Van-Leeuwen, J. P. (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 338(2): 143-56. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014.
- Viana-Filho, J. M. C., Coêlho, M. C., Ribeiro, I. L. A., Persuhn, D. C., Valença, A. M. G., Oliveira, N. F. P. (2021). ABCG2 polymorphism, age and leukocyte count may contribute to oral mucositis in oncopediatric patients. *Brazilian Dental Journal*, 32(2):14-26. doi: 10.1590/0103-6440202103768.
- Villa, A., Sonis, S. T. (2015). Mucositis: Pathobiology and management. *Current Opinion in Oncology*, 27(3): 159–164. doi: 10.1097/CCO.0000000000000180.
- Yildiz, S., Tumer, M. K., Yigit, S., Nursal, A. F., Rustemoglu, A., Balel, Y. (2021). Relation of vitamin D and BsmI variant with temporomandibular diseases in the Turkish population. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 59(5): 555-560. doi: 10.1016/j.bjoms.2020.08.101.
- Zella, L. A., Meyer, M. B., Nerenz, R. D., Lee, S. M., Martowicz, M. L., Pike, J. W. (2010). Multifunctional enhancers regulate mouse and human vitamin D receptor gene transcription. *Molecular Endocrinology*, 24(1): 128-47. doi: 10.1210/me.2009-0140.
- Zhang, L., Lu, Q., Chang, C. (2020). Epigenetics in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1253: 3-55. doi: 10.1007/978-981-15-3449-2_1.
- Zhang, W. T., Jin, T. F., Chen, L. (2020). Associations of four common VDR polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: evidence from a meta-analysis. *Lupus*, 29(4): 364–370. doi: 10.1177/0961203320909432.

5. CAPÍTULO 2

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Journal of Oral Pathology and Medicine” e encontra-se em análise. (Anexo III)

***TNF- α* promoter hypomethylation is associated with occurrence of oral mucositis in oncopediatric patients treated with methotrexate**

Site-specific DNA methylation and oral mucositis

Viana Filho JMC, Coêlho MC, Queiroz Neto JN, Souza BF, Valença AMG, de Oliveira NFP*

José Maria Chagas Viana Filho¹ (ORCID: 0000-0002-5922-1217), Marina de Castro Coêlho¹ (ORCID:0000- 0002-2007-8863), José Nunes de Queiroz Neto² (ORCID: 0000-0001-6344-9794), Beatriz Fernandes de Souza¹ (ORCID: 0000-0001-9500-1273), Ana Maria Gondim Valença¹ (ORCID: 0000-0001-8460-3981), Naila Francis Paulo de Oliveira^{1,2*} (ORCID: 0000-0002-0855-2518)

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, - UFPB, João Pessoa, PB-Brasil

² Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, - UFPB, João Pessoa, PB-Brasil

***Corresponding Author:**

Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

Federal University of Paraíba, Centre of Exact and Natural Sciences, Molecular Biology Department, Cidade Universitária – Campus I, 58051-900, João Pessoa-PB/ Brazil, Phone: +55 83 3216-7643, nailafpo@dbm.ufpb.br

Keywords: Oral mucositis; DNA methylation; Epigenetic, oxidative stress, inflammation

ABSTRACT

Background: The molecular study of the inflammatory mechanisms and oxidative stress of oral mucositis represents a promising alternative for the identification of biological markers involved in this disease. Therefore, the aim of this study was to investigate the DNA methylation profile in genes encoding catalase (*CAT*) and superoxide dismutase (*SOD3*) enzymes, which are involved in oxidative stress mechanisms, as well as genes encoding pro-inflammatory cytokines, interleukin-6 (*IL-6*) and tumor necrosis factor-alpha (*TNF-α*) in the oral mucosa of oncopediatric patients treated with methotrexate (MTX®).

Methods: The population comprised 85 healthy patients and those with hematological malignancies aged between 5 and 19 years. Oral conditions were evaluated using the Oral Assessment Guide. Methylation of DNA from oral mucosal cells was evaluated using the Methylation-Specific PCR technique (MSP).

Results: Females predominated (54.1%), with a mean age of 11.1 years. Most cancer patients (75.0%) developed oral mucositis. For *CAT*, the partially methylated profile was the most frequent and for *SOD3* and *IL-6*, the hypermethylated profile was the most frequent, with no differences between groups. For *TNF-α*, the hypomethylated profile was more frequent in the group that had had mucositis but recovered prior to sample collection, compared to the groups that did not have mucositis or that had mucositis at the time of sample collection.

Conclusion: The methylation profiles of *CAT*, *SOD3* and *IL-6* at the studied CpG sites are common profiles for oral cells of children and adolescents and have no association with oral mucositis or exposure to chemotherapy involving MTX®. The hypomethylated profile of *TNF-α* is associated with the occurrence of oral mucositis.

INTRODUCTION

Pediatric patients with hematological tumors receiving chemotherapy treatment involving methotrexate (MTX®) are frequently affected by oral mucositis. This inflammation is characterized as an ulcerative lesion associated with pain, resulting in difficulties in eating, drinking and speaking, and requiring nutritional support (nasogastric tube) in cases of severe oral mucositis.^{1,2} It can worsen the patient's

cachexia, decrease their quality of life and lead to the temporary interruption of chemotherapy treatment for the recovery of the oral mucosa, which negatively impacts the patient's treatment.^{1,3}

The pathobiology of oral mucositis has five phases, starting with stimulation by chemotherapy and ending with healing. In the initiation phase (1), chemotherapy induces the formation of reactive oxygen species, causing cellular damage to the epithelium and subepithelial mucosa. In the message generation phase (2), a series of transcription factors are activated along with the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, interleukin-6 and C-reactive protein. In the signal amplification phase (3), inflammatory modulators are activated and released into the interstitial space and edema is observed. In the ulceration phase (4) cytotoxic agents reduce mitosis of dividing epithelial cells in the oral cavity causing atrophy and ulceration, exacerbating the pain, and impairing the patient's life. Opportunistic microorganisms in the oral cavity rapidly colonize these areas, increasing the risk of superinfection. In the healing phase (5) epithelial cells begin to proliferate and differentiate, initiating healing of the mucosal tissue.^{4,5} Two aspects are important for the development of mucositis, especially in phases 1, 2 and 3, that is, in the phases' initial stages, namely: oxidative stress and the production of inflammatory cytokines.

Oxidative stress occurs as a state of disturbance between the free radicals (oxidants) produced and the ability of the antioxidant system to neutralize them.⁶ Regarding the relationship between oxidative stress and oral mucositis, oxidative stress has been proposed as a mediator of MTX[®] toxicity. Ahmed et al.⁷ observed a reduction in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the oral mucosa of rats. The authors showed that MTX[®] could result in impairment of the endogenous antioxidant defense system (antioxidant enzymes), thus exposing cells to free radicals, indicating that MTX[®] can evoke extensive tissue damage mediated by oxidative stress.

Phases 2 and 3 of oral mucositis are related to the activation and production of cytokines and this seems to be mediated by oxidative stress.⁵ The contemporary pathobiological model includes activation of the nuclear transcription factor (NF- κ B), which in turn positively regulates up to 200 genes, including genes encoding pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6).^{4,8}

The genes that encode the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase, and the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-6, are regulated by epigenetic mechanisms and are associated with disease.⁹⁻¹² Epigenetics is information that is “above the DNA”, which controls gene expression, and is both heritable and reversible. Epigenetic marks include DNA methylation, chemical changes in histones, and small non-coding RNAs. These marks are associated with a variety of tumor, inflammatory and mental diseases and are modulated by extrinsic factors including drugs, being a target for these agents or a product of adverse reactions.¹³

DNA methylation is the most studied epigenetic marker and is associated with a complete decrease or inhibition of gene expression. The methyl radical (CH₃) is present mainly in cytosines that precede guanines (CpG dinucleotides), which are prevalent in gene promoter regions, and acts by inhibiting the binding of transcription factors to DNA. Changes in this profile are associated with changes in gene expression, which may be associated with diseases.¹⁴

Little is known about the DNA methylation profile in oncopediatric populations with oral mucositis. A study evaluating the effect of chemotherapy involving MTX[®] in oncopediatric children detected changes in the global methylation profile in blood cells, however, it did not find any association of this profile with mucositis, indicating that global methylation is a marker of exposure to chemotherapy but not of inflammation.¹⁵ Another study evaluated the methylation profile in oral cells in the gene encoding the vitamin D receptor (VDR) and found no association with inflammation or chemotherapy.¹⁶

Based on the existing gaps regarding the DNA methylation profile in the context of chemoinduced oral mucositis and the importance of genes involved in oxidative and inflammatory stress mechanisms in the pathobiology of this condition, our objective was to investigate the DNA methylation profile in *CAT*, *SOD3*, *IL-6* and *TNF- α* genes in the oral mucosa of oncopediatric patients treated with MTX[®] in an attempt to identify markers of oral mucositis or exposure to chemotherapy.

MATERIAL AND METHODS

Study design and research ethics

The study population comprised children and adolescents aged between 5 and 19 years of both sexes, including cancer patients and healthy patients. Oncological children and adolescents were recruited at the reference hospital for cancer treatment in Paraíba, Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa/PB). Patients diagnosed with leukemias or lymphomas and treated with a chemotherapy protocol involving MTX[®] were included. Healthy patients were recruited from a Private Pediatric Dental Clinic (João Pessoa/PB). This group included patients without a diagnosis of neoplasms and without alterations in the oral mucosa. Patients were excluded if they had cognitive or motor alterations that made collection procedures difficult, a compromised or isolated health status with restricted contact (making it impossible to carry out the collection) or any other oral inflammation other than oral mucositis; or if they were being treated with a combination of chemotherapy and radiotherapy. Demographic and oral health data of the patients were collected from medical and dental records and transcribed.

All procedures complied with the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments to comparable ethical standards. This research was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (UFPB) (Opinion No. 4,878,034).

Assessment of oral condition

The assessment of the patients' oral condition was performed by previously calibrated subjects (Kappa = 0.87) using the modified Oral Assessment Guide (OAG), an instrument that measures changes in the oral mucosa of pediatric patients resulting from chemotherapy. The instrument has scores ranging from 1 to 3, where 1 indicates normal mucosa, 2 indicates mild and/or moderate alterations and 3 indicates severe complications.¹⁷ Eight items were evaluated: voice, swallowing, lips, tongue, saliva, labial mucosa/palate, labial mucosa and gingiva.

Sample selection and sample calculation

The selection of cancer patients for the collection of biological samples occurred in the first 60 days of treatment, based on the state of the disease in this period (individuals without oral mucositis and individuals with oral mucositis). Data from patients who did not develop mucositis were followed up until the last session to ensure

this condition. This period was chosen because mucositis usually appears in the first weeks of treatment, as previously addressed in a methylation study.^{1,16}

The study population was allocated into four groups: Group 1 – individuals without cancer; Group 2 – individuals without oral mucositis during chemotherapy treatment; Group 3 – individuals without oral mucositis at the time of collection, but who had already presented mucositis during chemotherapy treatment; Group 4 – individuals with oral mucositis at the time of collection.

Sample size calculation was performed on the website Cálculo Amostral – USP Statistics (<http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/index.php>), using the difference parameters between two variables. The following were considered: Pearson's correlation coefficient $r=0.3$ (average coefficient, absence of previous studies); error α of 5% and β of 80%. The calculation estimated an n of 17 patients per group.

Methylation analysis in CAT, SOD3, IL-6, TNF- α genes in oral mucosa

Oral mucosal cells were obtained by rinsing with 5 mL of sterile 3% dextrose solution, followed by DNA extraction with 8 M ammonium acetate and 1 mM EDTA as previously described.¹⁸ The quantification and purity of the DNA was measured in a spectrophotometer with the OD ratio of DNA of 260/280. Values above 1.8 were considered pure (NanoDrop® 2000). The samples were kept at -20°C until the methylation analyses. Methylation at specific sites was performed using methylation-specific PCR (MSP), which requires treatment of DNA with sodium bisulfite to transform unmethylated cytosines into uracil in order to differentiate methylated and unmethylated sites. To perform this technique, 1000 ng of previously purified DNA was treated with the EZ Methylation Gold Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Differences in DNA sequences after bisulfite treatment were detected by amplification with specific primers for methylated and unmethylated sequences as previously described, with modifications in PCR annealing conditions when necessary (Table 1).¹⁹⁻²² Treated DNA was amplified in 20 μ L reactions containing 10 μ L of GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega Corporation), forward and reverse primers, 50 ng of bisulfite-transformed DNA, and nuclease-free water. After amplification, methylation profiles were visualized by vertical electrophoresis of 10 μ L of amplified DNA on 6% polyacrylamide gels, followed by silver

nitrate staining. The specificity of the methylated and unmethylated reactions was guaranteed by the use of fully methylated (Universal Methylated Human DNA Standard, Zymo Research) and fully unmethylated DNA (EpiTect Control DNA, Qiagen), bisulfite-transformed as mentioned above, and PCR was performed (Fig. 1A-D). Profiles were categorized as methylated (also known as hypermethylated), with amplification only in the methylated condition; unmethylated (also known as hypomethylated), with amplification in the unmethylated condition; and partially methylated, when amplification was observed in both conditions.

Table 1. Methylation Specific PCR (MSP) conditions for DNA methylation analysis.

GENE/ CPG SITE	PRIMERS	PRIMER/ VOLUME	ANNEALING (°C)/TIME	CICLES	PRODUCT (BP)
CAT 112, 118, 372					
M	F: GTAGACGTATATTCGTTGTCGTTATTC R: AAAAATCTCATTACCAAACACTTCG	10µM/1 µL	55°/40sec	35	255
U	F: AGATGTATATTTGTTGTTGTTATTTGT R: AAAATCTCATTACCAAACACTTCAAA	10µM/1 µL	59°/40sec	35	261
SOD3 -173,-35					
M	F: GTAGACGTATATTCGTTGTCGTTATTC R: AAAAATCTCATTACCAAACACTTCG	10µM/0,8 µL	60°/40sec	40	138
U	F: AGATGTATATTTGTTGTTGTTATTTGT R: AAAATCTCATTACCAAACACTTCAAA	10µM/0,8 µL	63°/ 60sec	40	137
IL-6 -628, -610, -574, -491					
M	F: GTAGACGTATATTCGTTGTCGTTATTC R: AAAAATCTCATTACCAAACACTTCG	10µM/1 µL	60°/60sec	35	104
U	F: AGATGTATATTTGTTGTTGTTATTTGT R: AAAATCTCATTACCAAACACTTCAAA	10µM/1 µL	61°/60sec	35	104
TNF-α -245,-239					
M	F: GTAGACGTATATTCGTTGTCGTTATTC R: AAAAATCTCATTACCAAACACTTCG	17µM/0,7 µL	61°/40sec	38	120
U	F: AGATGTATATTTGTTGTTGTTATTTGT R: AAAATCTCATTACCAAACACTTCAAA	17µM/0,7 µL	61°/40sec	38	120

Statistical analysis

Data were categorized and organized in a database to allow for analysis. Data normality was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. The relationships between the variables were measured using the Chi-Square test and Fisher's Exact test, followed by the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) test for multiple comparisons, adopting $\alpha < 0.05$, in the Jamovi 2.3.12 software (Stats Open Now, Sydney, Australia).

RESULTS

Demographic and clinical data

A total of 85 individuals participated in the study, most of them female (n = 46; 54.1%), with a mean age of 11.1 (± 4.3) years, diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (n = 48; 56.5%) or without any type of cancer (n = 21; 24.7%). Of the individuals who had cancer (n = 64), most developed oral mucositis during chemotherapy treatment (75.0%, n = 48). Of these, 48.4% had already recovered at the time of collection of biological material (n = 31) and 26.6% had inflammation during collection (n = 17) (Table 2).

Table 2. Demographic, clinical and DNA methylation data of the population studied. João Pessoa, Paraíba, Brazil. 2022

VARIABLE	CATEGORY	GROUPS			
		Healthy (n=21)	No mucositis (n=16)	Mucositis before sample collection (n=31)	Mucositis during sample collection (n=17)
Demographic & Clinical	Sex – n (%)	Girls	14 (66.7)	14 (45.2)	07 (41.2)
		Boys	07 (33.3)	17 (54.8)	10 (58.8)
	Age – average ($\pm$ SD)		10.19 (± 3.26)	10.06 (± 3.64)	12.71 (± 4.73)
	Underlying disease – n (%)	LLA	0	25 (80.6)	12 (70.6)
		LMA	0	02 (6.5)	02 (11.8)
		LPA	0	02 (6.5)	0
		LMC	0	01 (3.2)	0
		LH	0	0	0
		LNH	0	01 (3.2)	03 (17.6)
		No cancer	21 (100.0)	0	0
DNA Methylation	CAT – n (%)	M	0	0	0
		M and U	19 (90.5)	30 (96.8)	16 (94.1)
		U	02 (9.5)	01 (3.2)	01 (5.9)
	SOD3 – n (%)	M	20 (95.2)	28 (90.3)	15 (88.2)
		M and U	01 (4.8)	03 (9.7)	02 (11.8)
		U	0	0	0
	IL-6 – n (%)	M	21 (100.0)	31 (100.0)	17 (100.0)
		M and U	0	0	0
		U	0	0	0
	TNF- α – n (%)	M	0	0	0
		M and U	17 (80.0)	16 (51.7)	16 (94.1)
		U	04 (20.0)	13 (48.3) *	01 (5.9)

G1: individuals without cancer; **G2:** oncopediatric patients who did not develop oral mucositis; **G3:** oncopediatric patients who developed oral mucositis, but had already recovered at the time of sample collection; **G4:** oncopediatric patients with oral mucositis at the time of sample collection. ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; ALI – acute promyelocytic leukemia; CML – chronic myeloid leukemia; HL – Hodgkin's lymphoma; NHL – non-Hodgkin lymphoma. M – fully methylated (hypermethylated); M and U – partially methylated; U – totally unmethylated (hypomethylated). Some samples were excluded from the methylation analysis due to the lack of amplification in the PCR. * p = 0.002; Fisher's exact test.

DNA methylation data

For *CAT*, there was a prevalence of the partially methylated profile in the four groups (G1: 90.5%; G2: 81.3%; G3: 96.8% and G4: 94.1%). The fully methylated profile was not detected in any of the children and a small percentage of individuals had a unmethylated profile (G1: 9.5%; G2: 18.7%; G3: 3.2% and G4: 5.9%). No significant difference was identified between groups ($p = 0.302$; Fisher's exact test). For *SOD3*, a higher frequency of the fully methylated profile was observed in all groups (G1: 95.2%; G2: 100.0%; G3: 90.3% and G4: 88.2%), with no unmethylated profiles and a few individuals with a partially methylated profile (G1: 4.8%; G3: 9.7% and G4: 11.8%). Again, no significant difference was detected between groups ($p = 0.622$; Fisher's exact test) (Table 2 and Fig. 1E, F).

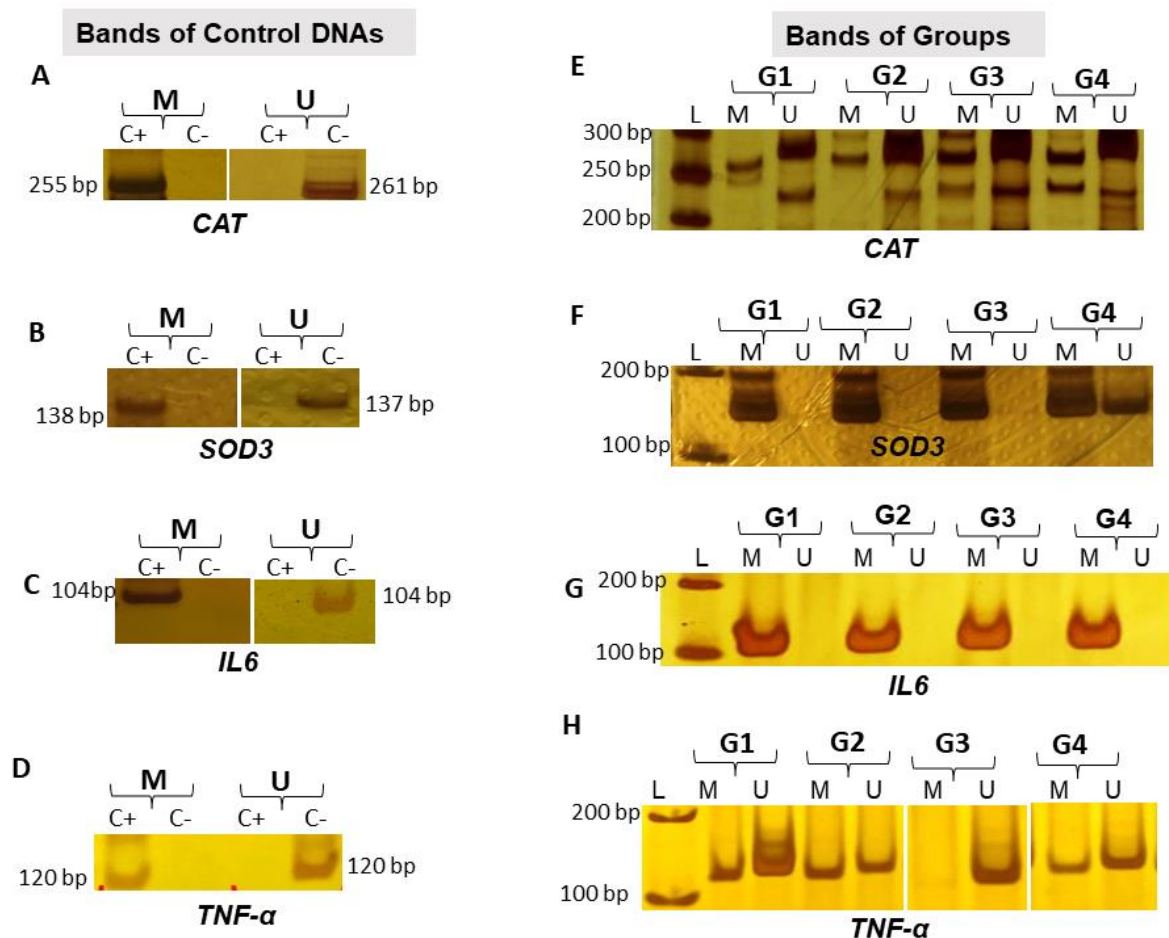


Figure 1- (A-D) Representative bands of Control DNAs, showing the specificity of MSP reactions with fully methylated (C+) and fully unmethylated (C-) control DNAs. (E-H) Representative bands of groups, showing *CAT*, *SOD3*, *IL-6*, *TNF-α* MSP reactions. L – DNA ladder. M: methylated; U: unmethylated; G1: healthy; G2: oncopediatric patients without oral mucositis during chemotherapy; G3: oncopediatric patients with oral mucositis during chemotherapy and before sample collection; G4: oncopediatric patients with oral mucositis during sample collection. MSP fragments (bp): *CAT*= 255 (M) and 261 (U); *SOD3*= 138 (M) and 137 (U); *IL-6* = 104 (M and U); *TNF-α* = 120 (M and U). Note: The methylated and unmethylated profiles are also commonly known as hypermethylated and hypomethylated respectively.

For *IL-6*, the fully methylated profile was found in all investigated individuals (100.0%). As for *TNF- α* , although a higher frequency of the partially methylated profile was observed in the four groups (G1: 80.0%; G2: 93.3%; G3: 51.7% and G4: 94.1%), there was a higher frequency of the unmethylated profile in group 3 ($p = 0.002$; Fisher's exact test), especially when compared in isolation with group 4 ($p = 0.018$; Dwass-Steel-Critchlow-Fligner multiple comparisons test) and with group 2 ($p = 0.032$; Dwass-Steel-Critchlow-Fligner multiple comparisons test) (Table 2 and Fig. 1G,H).

DISCUSSION

The pathobiology of chemo-induced oral mucositis involves the mechanisms of oxidative stress and inflammation^{4,5} and, in addition, the DNA methylation profile has been identified as a marker of oral inflammation and exposure to chemotherapy.^{15,23} In this context, our objective was to evaluate the methylation profile of genes involved in mechanisms of oxidative stress and inflammation in oncopediatric patients with chemo-induced oral mucositis.

In the context of oxidative stress, the enzymes catalase and superoxide dismutase 3 are important antioxidant agents that are located in the peroxisome and in the extracellular environment, respectively. During oxidative stress, cells respond to ROS (reactive oxygen species) with SOD, which is responsible for destroying superoxide radicals (O_2^-), converting these radicals to molecular oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Catalase, in turn, converts H_2O_2 into O_2 and H_2O .⁶ The *CAT* and *SOD3* genes that encode catalase and superoxide dismutase 3, respectively, are expressed in the oral mucosa,²⁴ and since they can be epigenetically regulated and are associated with diseases,^{11,12} are interesting targets of investigation in chemo-induced oral mucositis.

Genetic polymorphisms in the *CAT* and *SOD* genes have already been addressed in oncopediatric patients with oral mucositis, and an association with the *CAT* rs7943316 polymorphism was found in patients who developed the severe form of the disease.²⁵ The methylation profile was examined here for the first time in this context.

Regarding the *CAT* methylation profile, our data show a higher frequency of the partially methylated profile in all groups, with no association being detected with

inflammation or exposure to chemotherapy (Table 2 and Fig. 1E). The CpG sites investigated in the present study, 112, 118 and 372, were previously analyzed by Ding et al.,¹⁹ who observed a unmethylated profile for healthy liver cells and a partially methylated profile in hepatocellular carcinoma. The methylation profile at the CpG -47 site of *CAT* was studied in oral cells of adult subjects and the unmethylated and partially methylated profile were the most frequent in healthy subjects, while an increase in methylation frequency was a trend for the group with periodontitis.²³ Comparing the data of Ding et al.¹⁹ and Coêlho et al.,²³ it is clear that the frequency of *CAT* methylation, even considering different CpG sites, tended to increase in the tumor condition in the case of the study by Ding et al. and in an inflammatory condition in the case of Coêlho et al. Methylation may be associated with a decrease in gene expression and, consequently, a lower level of catalase, causing accumulation of H₂O₂, which leads to tissue damage. However, in the present study, we did not observe an increase in methylation tendency in the mucositis group, with the majority of individuals having the partially methylated profile.

Although studying the same cell types, the differences found in the study by Coêlho et al. (unmethylated and partially methylated profile) and the present study (partially methylated profile) can be explained by the analysis of different CpG sites and the age of the population studied, since these factors are associated with the methylation profile.^{13,14,26} Thus, we suggest that the partially methylated profile at CpG sites 112, 118 and 372 of *CAT* is a common profile for cells in the oral mucosa of children and adolescents and has no association with inflammation or chemotherapy exposure. In addition, according to the studies mentioned above, the fully methylated condition is not frequent at these sites nor in these cell types, as observed in the present study.

For *SOD3*, the fully methylated profile was the most frequent in the population studied and no significant differences were found between groups (Table 2 and Fig. 1F). The *SOD3* CpG sites considered in the present study were previously analyzed by Kamiya et al.,²⁰ who also observed a fully methylated profile in human monocytes of the THP-1 type. The authors treated the cells with 12-O-tetra decanoylphorbol-13-acetate (TPA), and also found no alteration in the DNA methylation profile, but detected *SOD3* expression in THP-1 cells, indicating that *SOD3* expression can be induced but is not related to the change in the methylation profile at these CpG sites in these cells.

On the other hand, Griess et al.¹² observed significant differences in the expression of the *SOD3* gene in breast neoplasms between healthy breast tissues and those affected by tumors, where they observed, in the former, low levels of methylation at six CpG sites of the promoter, including -35, differing from what was seen in neoplastic cells, where methylation levels were high, which resulted in the correlation between the methylation profile of the samples, the histological condition and its expression in healthy breast and tumor cells. Comparing the studies by Kamiya et al.²⁰ and Griess et al.¹² we see that the methylated profile is common for neoplastic cells, contrary to our findings in which the methylated profile was frequent in non-tumor oral cells. It is known that the methylation profile is tissue-, site- and age-specific^{13,14,26} and to the best of our knowledge there is no other study in the literature showing the methylation profile of *SOD3* in oral cells for comparison. Thus, we suggest that the methylated profile at the CpG -173 and -35 sites of *SOD3* is a common profile for oral epithelial cells in children and adolescents.

In addition to oxidative stress, another important factor in the pathobiology of mucositis is the pro-inflammatory markers, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , which seem to be mediated by oxidative stress.⁵ The *IL-6* and *TNF- α* genes that encode interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , respectively, are expressed by the oral mucosa,²⁷ and since they can be epigenetically regulated and are associated with diseases,^{9,10} they are interesting targets to investigate in chemoinduced oral mucositis.

As for *CAT* and *SOD*, genetic polymorphisms in the *IL-6* and *TNF- α* genes have already been investigated in oncopediatric children with oral mucositis, but no association was detected, although the authors state that polymorphisms in *TNF- α* should be further explored as the data were inconclusive.²⁵ In terms of the methylation profile in these genes, this is the first study in this context.

For *IL-6*, the fully methylated profile at CpG sites -628, -610, -574, and -491 was found in all subjects and no association with inflammation or chemotherapy exposure was detected (Table 2 and Fig. 1G). The same CpG sites were previously studied in adult gingival tissue by Stefani et al.²¹ and the partially methylated profile was the most frequently observed in individuals with and without periodontitis, thus indicating, as in our work, that the methylation profile at these sites is not associated with inflammation. The difference in methylation profiles compared with the study by

Stefani et al. (partially methylated) and the data from the present study (fully methylated) may be due to the use of different cell types and the age of the population studied.

In blood cells from adults with and without periodontitis, high levels of methylation at the -491 site and unmethylation at the -610 site were observed and no association with inflammation was detected.⁹ In blood cells from adults with and without autoimmune disease, moderate methylation was observed at site -491 and a very low level of methylation was observed at -610.²⁸ When comparing the aforementioned studies and the present study, it can be seen that the level of methylation varies at sites -491 and -610 depending on the tissue and age of the population, however, all studies showed no association with inflammation. Thus, our data show that the fully methylated profile at CpG sites -628, -610, -574, and -491 is a common feature of oral cells in children and adolescents and that there is no association with inflammation and exposure to chemotherapy.

For *TNF- α* , the partially methylated profile at CpG sites -245 and -239 was the most frequent in the investigated individuals. However, there was a significant difference between the groups regarding the occurrence of the unmethylated profile. Subjects who had oral mucositis during treatment, but who had recovered and were not inflamed at the time of collection, were more often associated with the unmethylated profile compared with the other groups. These results suggest that the occurrence of inflammation can modify the *TNF- α* methylation profile at the sites analyzed in the long term. That is, during the acute phase of oral mucositis, the process of DNA demethylation can begin, which, in turn, increases over time, until the establishment of the unmethylated profile. In fact, Zhang et al.¹⁰ evaluated the methylation profile of *TNF- α* in the course of periodontal disease. The authors did not observe a change in the methylation profile during the acute phase (gingivitis), but saw that this profile changed over time, indicating that epigenetic alterations might be locally sustained for some mediators even after the elimination of inflammation.

The same CpG sites studied in the present work were evaluated by Gomes et al.,²² who observed hypomethylation in blood cells of individuals infected with the dengue virus. This profile was associated with increased levels of *TNF- α* mRNA, indicating an association between methylation profile at CpG sites -245 and -239 and gene expression. Another study showed hypomethylation at CpG sites -55, -89, -132,

–189, –237, and –298 in cartilage cells from individuals with osteoarthritis,²⁹ which was also associated with increased levels of both mRNA and cytokine. Taken together, these data show that the CpG sites of the *TNF-α* promoter region are likely to be modulated by inflammation, and are associated with gene expression, where hypomethylation is associated with increased expression of *TNF-α*, a pro-inflammatory cytokine that is important in phase 2 oral mucositis.^{4,5}

The limitations of this study include the inability to separate individuals by disease severity for statistical analysis or associate severity with the methylation profile, due to the small sample size. In addition, a quantitative methylation analysis technique would be needed to show whether, in fact, changes in the methylation profile of *TNF-α* can be detected at the time of mucositis, which is our hypothesis. Even with these limitations, our unpublished data contribute to the understanding of molecular mechanisms involved in chemo-induced oral mucositis and indicate that the *TNF-α* gene is important in this process. In addition, we bring up interesting questions: how long is the *TNF-α* profile found after mucositis resolution? Is this profile associated with the expression of *TNF-α*? These questions can be answered with long-term follow-up of patients, including studies before and after chemotherapy and quantification of mRNA and *TNF-α* levels.

The first study addressing the methylation profile in oncopediatric patients treated with MTX[®] showed a change in the global methylation profile in blood cells after treatment, but found no association with oral mucositis.¹⁵ The second study investigated site-specific methylation in the gene that encodes the vitamin D receptor (*VDR*) in oral cells and found no association with treatment or mucositis.¹⁶ This is the third study in this context and differences were found in the methylation profile of the *TNF-α* gene in oral cells associated with individuals who had mucositis during chemotherapy treatment. Although we did not find differences in the methylation profile of all of the genes studied, it is possible that other CpG sites in these genes could be modulated by inflammation or exposure to chemotherapy, since studies have shown that oral inflammation as well as the effect of chemical agents might be associated with site-specific changes.^{9,30} In addition to DNA methylation being a potential biomarker of inflammation, data from these studies have great potential to be both diagnostic and therapeutic tools.

It is concluded that the partially methylated profile at CpG sites 112, 118 and 372 of *CAT*, the hypermethylated profile at CpG sites –173 and –35 of *SOD3* and the hypermethylated profile at CpG sites –628, –610, –574, and –491 of *IL-6* are common profiles for cells in the oral mucosa of children and adolescents and there is no association with mucositis or exposure to chemotherapy involving MTX[®]. For *TNF- α* , the hypomethylated profile at CpG sites –245 and –239 is associated with the occurrence of oral mucositis.

Acknowledgements: This work was financial supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (434392/2018-9) and Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Federal da Paraíba, Brazil. BFS and MCC were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). JNQN was supported by Universidade Federal da Paraíba, Brazil.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions: José M.C. Viana-Filho: Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft; Marina C. Coêlho, José N. Queiroz-Neto and Beatriz F. Souza: Data curation, Formal analysis, Writing - review and editing; Ana M.G. Valença: Methodology, Supervision, Writing - review and editing. Naila F.P. de Oliveira: Conceptualization, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Funding acquisition, Writing - review and editing.

REFERENCES

- 1- Villa A, Sonis ST. Mucositis: Pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 2015; 27(3):159–164.
- 2- McGrath KH, Evans V, Yap J. Indications and Patterns of Use for Parenteral Nutrition in Pediatric Oncology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2020;44(4):632-638.
- 3- Qutob AF, Gue S, Revesz T, Logan RM, Keefe D. Prevention of oral mucositis in children receiving cancer therapy: a systematic review and evidence-based analysis. *Oral Oncol*. 2013;49(2):102-7.
- 4- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury:

- pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100(9 Suppl):1995-2025.
- 5- Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Robles-García M, Pachón-Ibáñez J, González-Padilla D, Gutiérrez-Pérez JL. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(2):225-38.
 - 6- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.
 - 7- Ahmed AA, Selim MA, El-Sayed NM. α -Lipoic acid ameliorates oral mucositis and oxidative stress induced by methotrexate in rats. Histological and immunohistochemical study. *Life Sci*. 2017;171:51-59.
 - 8- Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(7):1139-45.
 - 9- Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(7):917-25.
 - 10- Zhang S, Barros SP, Moretti AJ, Yu N, Zhou J, Preisser JS, Niculescu MD, Offenbacher S. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. *J Periodontol*. 2013;84(11):1606-16.
 - 11- Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*. 2015;87:84-97.
 - 12- Griess B, Klinkebiel D, Kueh A, Desler M, Cowan K, Fitzgerald M, Teoh-Fitzgerald M. Association of SOD3 promoter DNA methylation with its down-regulation in breast carcinomas. *Epigenetics*. 2020;15(12):1325-1335.
 - 13- Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3-55.
 - 14- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
 - 15- Oosterom N, Griffioen PH, den Hoed MAH, Pieters R, de Jonge R, Tissing WJE, van den Heuvel-Eibrink MM, Heil SG. Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2018;13(7):e0199574.
 - 16- Viana Filho JMC, de Souza BF, Coêlho MC, Valença AMG, Persuhn DC, de Oliveira NFP. Polymorphism but not methylation status in the vitamin D receptor gene contributes to oral mucositis in children. *Oral Dis*. 2022. Epub ahead of print.
 - 17- Cheng KK, Chang AM, Yuen MP. Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy; a randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. *Eur J Cancer*. 2004;40(8):1208-16.
 - 18- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
 - 19- Ding S, Gong BD, Yu J, Gu J, Zhang HY, Shang ZB, Fei Q, Wang P, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(23):3433-40.
 - 20- Kamiya T, Machiura M, Makino J, Hara H, Hozumi I, Adachi T. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes. *Free Radic Biol Med*. 2013;61:197-205.
 - 21- Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JA, Gomez RS, da Costa JE, Moreira PR. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology*. 2013;218(7):1012-7.

- 22- Gomes AV, de Souza Morais SM, Menezes-Filho SL, de Almeida LG, Rocha RP, Ferreira JM, Dos Santos LL, Malaquias LC, Coelho LF. Demethylation profile of the *TNF- α* promoter gene is associated with high expression of this cytokine in Dengue virus patients. *J Med Virol*. 2016;88(8):1297-302.
- 23- Coêlho MC, Queiroz IC, Viana Filho JMC, Aquino SG, Persuhn DC, Oliveira NFP. miR-9-1 gene methylation and DNMT3B (rs2424913) polymorphism may contribute to periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:e20190583.
- 24- Pedro NF, Biselli JM, Maniglia JV, Santi-Neto D, Pavarino ÉC, Goloni-Bertollo EM, Biselli-Chicote PM. Candidate Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: Differential Expression of Oxidative Stress-Related Genes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(5):1343-1349.
- 25- Coêlho MC, Viana Filho JMC, Souza BF, Valença AMG, Persuhn DC, Oliveira NFP. Genetic polymorphisms of genes involved in oxidative stress and inflammatory management in oncopediatric patients with chemo-induced oral mucositis. *J Appl Oral Sci*. 2022;30:e20210490.
- 26- Bezerra, Stephane Flaviane de Oliveira et al. Age-related Changes in DNA Methylation Status of *hTERT* Gene Promoter of Oral Epithelial Cells. *Braz Arch Biol Technol*. 2015;58(1):82-89.
- 27- Groeger S, Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2019;10:208.
- 28- Hirai N, Watanabe M, Inoue N, Kinoshita R, Ohtani H, Hidaka Y, Iwatani Y. Association of IL-6 gene methylation in peripheral blood cells with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2019;52(7-8):251-255.
- 29- Zhang Q, Ouyang Z, Song X, Zhu W, Tang X, Liu Z, Chen X. Epigenetic modifications of tumor necrosis factor- α in joint cartilage tissue from osteoarthritis patients - CONSORT. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(51):e27868.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados dos artigos aqui apresentados sustentam a ideia de que a investigação de marcadores genéticos e epigenéticos envolvidos na mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos podem contribuir para o desenvolvimento de uma terapia personalizada. A ocorrência dos polimorfismos *BsmI* G>A (rs1544410) e *FokI* C>T (rs2228570) em *VDR* aumentaram as chances da ocorrência da forma severa da doença. Bem como, o perfil de metilação na região promotora de *TNF- α* modificou após o cessar da inflamação, indicando que essa região possivelmente é modulada pela inflamação e está associada à expressão gênica durante a fase de produção da mensagem e amplificação dos sinais na patogênese da mucosite oral.

O conhecimento de biomarcadores no tratamento do câncer já é uma realidade (56), com a intenção de minimizar efeitos colaterais e o sofrimento dos indivíduos submetidos a terapias antineoplásicas. Ao contrário do que se pensa, a utilização desse tipo de tecnologia em saúde promove a identificação rápida, não-invasiva e traz benefícios econômicos para o curso do tratamento, uma vez que a identificação de alvos favorece a seleção mais precisa de fármacos, evitando, por exemplo, a resistência à quimioterápicos, ajustes excessivos de doses e aumento de efeitos adversos (109).

Além dos nossos achados encontrarem fatores preditivos no aparecimento da mucosite oral grave, os polimorfismos *BsmI* G>A (rs1544410) e *FokI* C>T (rs2228570) em *VDR*, a modificação do perfil de metilação na região promotora de *TNF- α* nos mostra uma outra forma de utilização desse tipo de tecnologia, dessa vez para o acompanhamento do tratamento, com o intuito de verificar se fatores inflamatórios e/ou medicamentosos podem modificar o curso do tratamento. A avaliação do perfil de metilação em *TNF- α* identificou que o fator inflamação pode modular sítios CpG e levar à hipometilação, o que sugere aumento da expressão dessa citocina pró-inflamatória exacerbando a resposta inflamatória nas fases iniciais da mucosite oral.

Portanto, a investigação dos marcadores biológicos *BsmI* G>A (rs1544410) e *FokI* C>T (rs2228570) previamente ao tratamento quimioterápico poderia auxiliar aos médicos na montagem dos protocolos medicamentosos com MTX, a fim de reduzir a ocorrência da mucosite oral grave, uma vez que eles aumentam as chances de

desenvolver a forma mais severa dessa inflamação. Além disso, como visto na discussão do capítulo 1, a observação dos resultados promissores de um gel de vitamina D sobre a mucosite oral (110), parece ser particularmente importante e indicado para esses indivíduos que apresentaram polimorfismos do gene *VDR*.

Em relação aos resultados das alterações epigenéticas, a observação das modificações no perfil de metilação durante o tratamento poderiam auxiliar como uma espécie de termômetro para a ocorrência desse efeito adverso, já que esse perfil é capaz de modificar pelo uso no quimioterápico (22–24).

Tratamentos preventivos já são realidade para estes pacientes. O Grupo de Atenção Odontológica ao Paciente Oncopediátrico (GAOPO), formado por professores e alunos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), desenvolvem um projeto de extensão universitária no Hospital Napoleão Laureano. Dentro dos tratamentos preventivos realizados, estão a remoção de focos infecciosos prévio e durante o tratamento oncológico, orientações em saúde bucal e utilização da laserterapia preventiva aplicada uma vez por dia durante os 5 dias iniciais da quimioterapia (comprimento de onda=650 nm, potência=100 mW, tempo=5s/ponto, diâmetro da fibra ótica=0,028 cm² e densidade de energia=70J/cm²). Somado a isso, a avaliação de variações genéticas e epigenéticas poderiam ser incorporadas.

Os dois artigos produzidos e divulgados nesta tese revelam resultados inéditos na investigação de polimorfismos no gene *VDR* e perfil de metilação em *VDR*, *CAT*, *SOD3*, *IL-6* e *TNF-α* no contexto da mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos. Antes destes, apenas um trabalho tinha utilizado a epigenética, mais precisamente a metilação global do DNA, como preditor da mucosite oral (12), e somente dois estudos brasileiros, do nosso grupo de pesquisa (7,13), avaliaram a associação entre polimorfismos genéticos e mucosite oral em pacientes oncopediátricos.

O interesse pelo estudo de variações genéticas no contexto da mucosite oral surgiu de uma provocação na defesa da tese intitulada “Modelos estatísticos para a ocorrência de mucosite oral grave em pacientes pediátricos oncológicos durante o tratamento quimioterápico” (111). Nesta ocasião, vários fatores foram associados à mucosite oral, entretanto foi sugerido que estudos futuros investigassem se polimorfismos genéticos estariam no *hall* multifatorial de agentes etiológicos.

A princípio, foi conduzido, durante o meu mestrado, um estudo investigando polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do MTX. Para tanto, investigou-se os genes *MTHFR*, *DNMT3B*, *ABCC2* e *ABCG2* (em dois *loci*). Os resultados mostraram que o polimorfismo *ABCG2* C421A (rs2231142) aumenta a probabilidade de ocorrência da mucosite oral (7).

Em seguida, polimorfismos em outros genes foram avaliados, desta vez em genes envolvidos no estresse oxidativo (*SOD2* e *CAT*) e em citocinas inflamatórias (*IL-6* e *TNF- α*), tendo em vista as fases 2 e 3 da fisiopatologia da mucosite oral (46). Os resultados mostraram que o polimorfismo *CAT* A-21T (rs7943316) pode contribuir para a ocorrência da mucosite oral grave (13). E a partir deste, surgiu a necessidade da investigação das modificações epigenéticas. Já a investigação das alterações genéticas e epigenéticas em *VDR* se deu pela importante atuação da vitamina D em processos inflamatórios (15) e por um curioso estudo que associou os baixos níveis de vitamina D ativa com a mucosite oral (16). Logo, imaginou-se que isso poderia estar relacionado com modificações genéticas e epigenéticas no gene codificador do seu receptor, que é necessário para sua ativação.

A condução desses dois estudos contou com uma amostragem diferente em decorrência das análises realizadas, que necessitava de uma alocação específica dos pacientes por grupo. Para o estudo de polimorfismos genéticos, considerou-se a presença ou ausência da mucosite oral durante o período de vigilância do tratamento quimioterápico. Em seguida, categorizava-se a mucosite de acordo com sua severidade, a fim de investigar se havia associação com a doença e com a sua gradação. Já para análise de metilação, os pacientes foram comparados de acordo com a ocorrência e presença da mucosite oral no momento da coleta. Um grupo de crianças saudáveis, sem câncer, foi utilizado para comparar se os protocolos quimioterápicos envolvendo o MTX eram capazes de interferir no perfil de metilação. Dessa forma, o objetivo para essa parte do trabalho era identificar se o perfil de metilação estava associado à mucosite e/ou à exposição ao MTX.

Durante a realização destes últimos dois estudos, algumas limitações foram encontradas, como a pandemia da COVID-19, que impactou diretamente na captação de novos pacientes. A nossa população já é bem restrita e uma vez composta por indivíduos imunodeprimidos, diante do cenário pandêmico, precisavam estar em total isolamento de contato. Nesta fase, as coletas de dados foram suspensas e,

certamente, diminuiu as chances de alcançar outros indivíduos que se encaixavam nos critérios de inclusão dos estudos. Entretanto, o número de amostras apresentou poder estatístico significativo, mostrando que os resultados aqui reportados são robustos.

Outra limitação é a miscigenação brasileira. Como visto, a variabilidade étnica da nossa população pode influenciar as frequências alélicas (58), o que, dentre outros fatores, pode explicar porque diferentes populações apresentam maior ou menor suscetibilidade a uma mesma doença (59). Dessa forma, análises de combinação de genótipos também se tornam uma perspectiva interessante, sendo necessários tamanhos amostrais maiores que o do presente estudo para a sua realização.

Trabalhos futuros podem investigar se a utilização do MTX em pacientes oncológicos pode alterar o perfil de metilação dos genes avaliados, comparando os momentos: antes e após a quimioterapia. Além disso, analisar se a expressão de citocinas inflamatórias, de enzimas do estresse oxidativo e os níveis de vitamina D estão relacionadas com polimorfismos genéticos e o perfil de metilação do DNA. Outra possibilidade seria a verificação de todos os polimorfismos já investigados por este grupo de pesquisa e associados à mucosite oral (*BsmI* G>A (rs1544410), *FokI* C>T (rs2228570), *ABCG2* C421A (rs2231142) e *CAT* A-21T (rs7943316)) em uma única análise, para verificar se a ocorrência conjunta deles poderia representar um modelo preditivo com tendência a esse efeito adverso e a sua severidade.

Esse trabalho ressalta a importância da continua investigação das modificações genéticas e/ou epigenéticas em pacientes com mucosite quimioinduzida, para a identificação de marcadores biológicos e um tratamento individualizado e eficiente no controle da doença e efeitos adversos.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que:

a) O genótipo CT do polimorfismo *FokI* C>T (rs2228570) em *VDR* aumenta a chance de pacientes oncopediátricos tratados com MTX desenvolverem mucosite oral grave quimioinduzida;

O alelo raro G do polimorfismo *BsmI* G>A (rs1544410) em *VDR* aumenta a chance da ocorrência de mucosite oral grave quimioinduzida em pacientes oncopediátricos;

O polimorfismo *TaqI* T>C (rs731236) em *VDR* não está relacionado a ocorrência de mucosite oral quimioinduzida em pacientes oncopediátricos;

b) O perfil parcialmente metilado no gene *VDR* é um perfil comum para células da mucosa oral dos indivíduos investigados e não há associação com mucosite ou exposição à quimioterapia envolvendo MTX;

c) O perfil hipermetilado nos sítios CpG -628, -610, -574 e - 491 de *IL-6* são perfis comuns para células da mucosa oral dos indivíduos investigados e não há associação com mucosite ou exposição à quimioterapia envolvendo MTX;

Para o *TNF- α* , o perfil hipometilado nos sítios CpG -245 e -239 está associado à ocorrência de mucosite oral, sendo observado nos indivíduos que já haviam se recuperado da mucosite;

d) O perfil parcialmente metilado nos sítios CpG 112, 118 e 372 de *CAT*, o perfil hipermetilado nos sítios CpG -173 e -35 de *SOD3* são perfis comuns para células da mucosa oral dos indivíduos investigados e não há associação com mucosite ou exposição à quimioterapia envolvendo MTX.

REFERÊNCIAS

1. Butler E, Ludwig K, Pacentá HL, Klesse LJ, Watt TC, Laetsch TW. Recent progress in the treatment of cancer in children. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 May 25];71(4):315–32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21665>
2. Johnston WT, Erdmann F, Newton R, Steliarova-Foucher E, Schüz J, Roman E. Childhood cancer: Estimating regional and global incidence. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2021;71:101662. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101662>
3. World Health Organization. CureAll framework: WHO global initiative for childhood cancer: increasing access, advancing quality, saving lives. World Health Organization. 2021. 126 p.
4. Howard SC, McCormick J, Pui C-H, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* [Internet]. 2016;21(12):1471–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27496039> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5153332>
5. Rühle A, Huber PE, Saffrich R, Lopez Perez R, Nicolay NH. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. Vol. 143, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2018. p. 2628–39.
6. Heil SG. Genetics of high-dose methotrexate-induced oral mucositis: Current perspectives. *Pharmacogenomics*. 2019;20(9):621–3.
7. Filho JMCV, De Castro Coelho M, Ribeiro ILA, Persuhn DC, Valenga AMG, De Oliveira NFP. ABCG2 polymorphism, age and leukocyte count may contribute to oral mucositis in oncopediatric patients. *Braz Dent J* [Internet]. 2021 [cited 2022 May 25];32(2):14–26. Available from: <http://www.scielo.br/j/bdj/a/V5bJQJ5XstxdLNmXkPcGt9b/?lang=en>
8. Villa A, Sonis ST. Mucositis: Pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(3):159–64.
9. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 May 8];72(1):57–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21704>
10. Curra M, Gabriel AF, Ferreira MBC, Martins MAT, Brunetto AT, Gregianin LJ, et al. Incidence and risk factors for oral mucositis in pediatric patients receiving chemotherapy. *Support Care Cancer* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 May 8];29(11):6243–51. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-021-06199-5>
11. Maagdenberg H, Oosterom N, Zanen J, Gemmati D, Windsor RE, Heil SG, et al. Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. Vol. 161, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2021. p. 103312.
12. Oosterom N, Griffioen PH, Den Hoed MAH, Pieters R, De Jonge R, Tissing WJE, et al. Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2018;13(7):1–10.
13. Coêlho MC, Viana Filho JMC, de Souza BF, Valença AMG, Persuhn DC, de

- Oliveira NFP. Genetic polymorphisms of genes involved in oxidative stress and inflammatory management in oncopediatric patients with chemoinduced oral mucositis. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2022 [cited 2022 May 25];30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35319668/>
14. Diachkova E, Trifonova D, Morozova E, Runova G, Ashurko I, Ibadulaeva M, et al. Vitamin d and its role in oral diseases development. Scoping review. Vol. 9, *Dentistry Journal*. MDPI; 2021.
 15. Ao T, Kikuta J, Ishii M. The effects of vitamin D on immune system and inflammatory diseases. *Biomolecules*. 2021;11(11):1–9.
 16. Oosterom N, Dirks NF, Heil SG, de Jonge R, Tissing WJE, Pieters R, et al. A decrease in vitamin D levels is associated with methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer* [Internet]. 2019 Jan 19 [cited 2022 May 26];27(1):183–90. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00520-018-4312-0>
 17. Dai Y, Feng Wu ·, Ni S, Guo S, Lu L, Zhao · Xiuli. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk and features of myasthenia gravis in the Han Chinese population. *Immunol Res* [Internet]. 2026 [cited 2023 Jan 30];1:3. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09349-x>
 18. Yu X, Zong X, Pan Y. Associations between vitamin D receptor genetic variants and periodontitis: a meta-analysis. *Acta Odontol Scand* [Internet]. 2019;77(7):484–94. Available from: <https://doi.org/10.1080/00016357.2019.1597160>
 19. Salimi S, Eskandari F, Rezaei M, Sandoughi M. Vitamin D Receptor rs2228570 and rs731236 Polymorphisms are Susceptible Factors for Systemic Lupus Erythematosus. *Adv Biomed Res*. 2019;8(1):48.
 20. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(February).
 21. Sramek M, Neradil J, Veselska R. Much more than you expected: The non-DHFR-mediated effects of methotrexate. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2017;1861(3):499–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.014>
 22. de Andres MC, Perez-Pampin E, Calaza M, Santaclara FJ, Ortea I, Gomez-Reino JJ, et al. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015;17(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0748-5>
 23. Wang X, Guan Z, Chen Y, Dong Y, Niu Y, Wang J, et al. Genomic DNA hypomethylation is associated with neural tube defects induced by methotrexate inhibition of folate metabolism. *PLoS One*. 2015;10(3):1–12.
 24. Forster VJ, McDonnell A, Theobald R, McKay JA. Effect of methotrexate/Vitamin B12 on DNA methylation as a potential factor in leukemia treatment-related neurotoxicity. *Epigenomics*. 2017;9(9):1205–18.
 25. Ahmed AAM, Selim MAA, El-Sayed NM. α -Lipoic acid ameliorates oral mucositis and oxidative stress induced by methotrexate in rats. *Histological and immunohistochemical study*. *Life Sci* [Internet]. 2017 Feb 15 [cited 2022 Nov 30];171:51–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28062278/>
 26. Ramírez-Amador V, Zambrano JG, Anaya-Saavedra G, Zentella-Dehesa A, Irigoyen-Camacho E, Meráz-Cruz N, et al. TNF as marker of oral candidiasis, HSV infection, and mucositis onset during chemotherapy in leukemia patients. *Oral Dis* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Nov 30];23(7):941–8. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403570/>
27. Forrest SJ, Geoerger B, Janeway KA. Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(1):17–24.
 28. Erdmann F, Frederiksen LE, Bonaventure A, Mader L, Hasle H, Robison LL, et al. Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2021;71(PB):101733. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101733>
 29. Atun R, Bhakta N, Denburg A, Frazier AL, Friedrich P, Gupta S, et al. Sustainable care for children with cancer: a Lancet Oncology Commission. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):e185–224.
 30. INCA. Incidência, Mortalidade E Morbidade Hospitalar Por Câncer Em Crianças, Adolescentes E Adultos Jovens No Brasil: INFORMAÇÕES DOS REGISTROS DE CÂNCER E DO SISTEMA DE MORTALIDADE. Rio de Janeiro; 2016. 1–412 p.
 31. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. 2023.
 32. Schüz J, Roman E. Childhood cancer: A global perspective. *Cancer Epidemiol*. 2021 Apr 1;71.
 33. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. INCA, editor. Rio de Janeiro; 2019. 120 p.
 34. Ruhl J, Seer NCI, Adamo MP, Seer NCI, Dickie L, Seer NCI, et al. Hematopoietic and Lymphoid Neoplasm Coding Manual. 2019;(January):1–76.
 35. Moizan H, Schraub S, Mouret P, Hervé C. L'évaluation de la qualité de vie en cancérologie des voies aérodigestives supérieures passées au crible des odontologistes hospitaliers français. *Ethique et Sante*. 2010;7(4):184–90.
 36. Santos TFR dos, Coradini CD-B, Ribeiro DM, Caldo-Teixeira AS. Knowledge and practice of oral health in child patients with cancer. *Arq em Odontol*. 2010;46(01):5–10.
 37. Sandoval R, Koga DH, Buloto LS, Suzuki R, Lauria L. Management of Chemo- and Radiotherapy Induced Oral Mucositis With Low-Energy Laser : Initial. *J Appl Oral Scie*. 2003;11(4):337–41.
 38. Pedrazas CHS, de Azevedo MNL, Torres SR. Oral events related to low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Braz Oral Res* [Internet]. 2010 Jul [cited 2022 Nov 30];24(3):368–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20877977/>
 39. Cao M, Guo M, Wu D-Q, Meng L. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook. *Curr Drug Metab*. 2017;19(14):1182–7.
 40. Inoue K, Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29(1):12–9.
 41. Marin G, Neag M, Burlacu C, Buzoianu A. The Protective Effects of Nutraceutical Components in Methotrexate-Induced Toxicity Models — An Overview. 2022;1–23.
 42. Park JA, Shin HY. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. *Blood Res*. 2016;51(1):50–7.
 43. De Santis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. *Cancer Treatment and Survivorship Statistics*, 2014. 2014;
 44. Bachour PC, Sonis ST. Predicting mucositis risk associated with cytotoxic cancer treatment regimens: Rationale, complexity, and challenges. *Curr Opin*

- Support Palliat Care. 2018;12(2):198–210.
45. Sonis ST, Yuan A. Oral Complications of Cancer and Their Treatment. *Holland-Frei Cancer Med*. 2017;1–13.
 46. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277–84.
 47. Ribeiro ILA, Melo ACR de, Limão NP, Bonan PRF, Neto E de AL, Valença AMG. Oral Mucositis in Pediatric Oncology Patients: A Nested Case-Control to a Prospective Cohort. *Braz Dent J [Internet]*. 2020;31(1):78–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201802881>
 48. Sonis ST. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*. 1998;34(1):39–43.
 49. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;72(1):57–77.
 50. Eilers J, Berger AM, Petersen MC. Development, testing, and application of the oral assessment guide. *Oncol Nurs Forum [Internet]*. 1988 May 1 [cited 2023 Feb 7];15(3):325–30. Available from: <http://europepmc.org/article/MED/3287344>
 51. Cheng KKF, Chang AM, Yuen MP. Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy: A randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. *Eur J Cancer*. 2004;40(8):1208–16.
 52. Qutob AF, Gue S, Revesz T, Logan RM, Keefe D. Prevention of oral mucositis in children receiving cancer therapy: A systematic review and evidence-based analysis. *Oral Oncol [Internet]*. 2013;49(2):102–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.08.008>
 53. Tanaka Y, Shimokawa T, Harada K, Yoshida K. Effectiveness of elemental diets to prevent oral mucositis associated with cancer therapy: A meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN*. 2022 Jun 1;49:172–80.
 54. Viana Filho JMC, de Souza BF, Coêlho M de C, Valença AMG, Persuhn DC, de Oliveira NFP. Polymorphism but not methylation status in the vitamin D receptor gene contributes to oral mucositis in children. *Oral Dis*. 2022;(September):1–12.
 55. Ramaswami R, Bayer R, Galea S. Precision Medicine from a Public Health Perspective [Internet]. Vol. 39, *Annual Review of Public Health*. Annual Reviews; 2018 [cited 2022 Nov 28]. p. 153–68. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-publhealth-040617-014158>
 56. Tsimberidou AM, Fountzilas E, Nikanjam M, Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev [Internet]*. 2020 Jun 1 [cited 2022 Nov 28];86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32251926/>
 57. Hartl D, de Luca V, Kostikova A, Laramie J, Kennedy S, Ferrero E, et al. Translational precision medicine: an industry perspective. *J Transl Med [Internet]*. 2021 Dec 1 [cited 2022 Nov 28];19(1):245. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35179706/>
 58. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. CAPÍTULO 4: Diversidade Genética Humana [Internet]. 7th ed. Elsevier Editora Ltda, editor. 2008 [cited 2023 Feb 3]. 525 p. Available from: <http://dgv.tcag.ca>
 59. Alberts B et al. *Biologia molecular da célula* [Internet]. 6th ed. Andrade AEB, Bizarro CV, Renard G, editors. Porto Alegre: Artmed; 2017 [cited 2022 Nov 30].

- 1–1464 p. Available from:
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4618964/mod_resource/content/1/Bruc e Alberts et al.-Biologia Molecular da Célula-Artmed %282017%29.pdf
60. Mourant A, Kopec A, Domaniewska-Sobczak K. The Distribution of the Human Blood Groups and other Polymorphisms. Oxford Univ Press [Internet]. 1976 [cited 2023 Feb 3];30(4):392. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC476421/>
 61. Chakravorty S, Hegde M. Inferring the effect of genomic variation in the new era of genomics. *Hum Mutat*. 2018;39(6):756–73.
 62. Seo J-Y, Park Y-J, Yi Y-A, Hwang J-Y, Lee I-B, Cho B-H, et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod* [Internet]. 2015 [cited 2022 Nov 30];40(1):14. Available from:
</pmc/articles/PMC4320272/>
 63. Kim H, Wang X, Jin P. Developing DNA methylation-based diagnostic biomarkers. *J Genet Genomics*. 2018 Feb 20;45(2):87–97.
 64. Van Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, De Abreu RA, Van de Putte LBA. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 1998 [cited 2022 Nov 30];27(5):277–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9572710/>
 65. Flanagan JM, Wilhelm-Benartzi CS, Metcalf M, Kaye SB, Brown R. Association of somatic DNA methylation variability with progression-free survival and toxicity in ovarian cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Nov 30];24(11):2813–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24114859/>
 66. Chen H, Orozco LD, Wang J, Rau CD, Rubbi L, Ren S, et al. DNA Methylation Indicates Susceptibility to Isoproterenol-Induced Cardiac Pathology and Is Associated With Chromatin States. *Circ Res* [Internet]. 2016 Mar 4 [cited 2022 Nov 30];118(5):786–97. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26838786/>
 67. Dexheimer GM, Alves J, Reckziegel L, Lazzaretti G, Abujamra AL. DNA Methylation Events as Markers for Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Dis Markers* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 9];2017. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038614/>
 68. Sramek M, Neradil J, Veselska R. Much more than you expected: The non-DHFR-mediated effects of methotrexate. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2017;1861(3):499–503. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.014>
 69. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 May 28];60(3):237–44. Available from: <http://www.pediatr-neonatol.com/article/S187595721830651X/fulltext>
 70. Christakos S, Li S, De J, Cruz L, Bikle DD. New developments in our understanding of vitamin D metabolism, action and treatment. 2019 [cited 2022 May 28]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.06.010>
 71. Krawiec M, Dominiak M. The role of vitamin D in the human body with a special emphasis on dental issues: Literature review. Vol. 55, *Dental and Medical Problems*. 2018. p. 419–24.
 72. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*.

- 2004;338(2):143–56.
73. Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M, Campbell M, Koeffler HP. Vitamin D receptor: No evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997;238(1):77–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.7239>
 74. Ho YP, Lin YC, Yang YH, Chou YH, Ho KY, Wu YM, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and periodontitis in a Taiwanese Han population. *J Dent Sci* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 May 30];12(4):360–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30895076/>
 75. Zhang W t., Jin T f., Chen L. Associations of four common VDR polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: evidence from a meta-analysis. *Lupus*. 2020;29(4):364–70.
 76. Lei W, Tian H, Xia Y. Association between the TaqI (rs731236 T>C) Gene Polymorphism and Dental Caries Risk: A Meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Feb 3];25(5):368–75. Available from: [/pmc/articles/PMC8140352/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34140352/)
 77. Maruthai K, Sankar S, Subramanian M. Methylation Status of VDR Gene and its Association with Vitamin D Status and VDR Gene Expression in Pediatric Tuberculosis Disease. *Immunol Invest* [Internet]. 2022;51(1):73–87. Available from: <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1810702>
 78. Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 May 30];187:28. Available from: [/pmc/articles/PMC7914139/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3414139/)
 79. Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Robles-García M, Pachón-Ibáñez J, González-Padilla D, Gutiérrez-Pérez JL. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2012 [cited 2022 Nov 30];41(2):225–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22071451/>
 80. Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Sonis ST, Keefe DMK. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Nov 30];62(1):33–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703303/>
 81. Morales-Rojas T, Viera N, Morón-Medina A, Álvarez CJ, Álvarez A. Proinflammatory cytokines during the initial phase of oral mucositis in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Paediatr Dent* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Nov 30];22(3):191–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21919984/>
 82. Peterson D, Srivastava R, Lalla R. Oral mucosal injury in oncology patients: perspectives on maturation of a field. *Oral Dis* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Nov 30];21(2):133–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24131518/>
 83. Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer* [Internet]. 2013 Jul [cited 2022 Nov 30];21(7):2075–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23604521/>
 84. Sonis ST. Oral Mucositis in Head and Neck Cancer: Risk, Biology, and Management. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM201333.e236. 2013 May 16;(33):e236–40.

85. Jensen SB, Peterson DE. Oral mucosal injury caused by cancer therapies: current management and new frontiers in research. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Nov 30];43(2):81–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24261541/>
86. Nur'Aeny N, Gurnida DA, Suwarsa O, Sufiawati I. The Impact of DNA Methylation on IL6 mRNA Levels in Hematinic Deficiency and Atopy-Associated Recurrent Aphthous Stomatitis Patients. *Int J Dent* [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 10];2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33936205/>
87. Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2016;69:89–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.018>
88. Cai L, Zhan M, Li Q, Li D, Xu Q. DNA methyltransferase DNMT1 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human dental pulp cells involving the methylation changes of IL-6 and TRAF6. *Mol Med Rep* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 10];21(2):959–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31974603/>
89. Asa'ad F, Bollati V, Pagni G, Castilho RM, Rossi E, Pomingi F, et al. Evaluation of DNA methylation of inflammatory genes following treatment of chronic periodontitis: A pilot case–control study. *J Clin Periodontol*. 2017 Sep 1;44(9):905–14.
90. Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Tumor necrosis factor- α gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *J Periodontal Res* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Feb 10];51(3):350–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26247485/>
91. Barra K, Barbosa F, Maria N, Costa B, De Cássia R, Alfenas G, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Feb 5];23(4):629–43. Available from: <http://www.scielo.br/j/rn/a/Fvg4wkYjZPgsFs95f4chVjx/?lang=pt>
92. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Nov 28];4:180–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25588755/>
93. Mccord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med*. 2000;108:652–9.
94. Souza DG, Vieira AT, Pinho V, Sousa LP, Andrade AA, Bonjardim CA, et al. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Nov 30];145(2):246–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15765103/>
95. Çetin A, Kaynar L, Kocyigit I, Hacıoglu SK, Saraymen R, Ozturk A, et al. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med* [Internet]. 2008 [cited 2022 Nov 30];36(5):861–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19051353/>
96. Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Adhikary A, Manna K, Dey S, et al. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Nov 30];24(12):2040–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24231097/>

97. Ozcicek A, Cetin N, Keskin Cimen F, Tumkaya L, Malkoc I, Gulaboglu M, et al. The Impact of Resveratrol on Oxidative Stress Induced by Methotrexate in Rat Ileum Tissue: Evaluation of Biochemical and Histopathological Features and Analysis of Gene Expression. *Med Princ Pract* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Nov 30];25(2):181–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517535/>
98. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337–49.
99. GeneCards. SOD3 Gene - GeneCards | SODE Protein | SODE Antibody [Internet]. [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOD3&keywords=sod3>
100. GeneCards. CAT Gene - GeneCards | CATA Protein | CATA Antibody [Internet]. [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CAT>
101. Kumar J, Teoh SL, Das S, Mahaknaukrah P. Oxidative Stress in Oral Diseases: Understanding Its Relation with Other Systemic Diseases. *Front Physiol* [Internet]. 2017 Sep 14 [cited 2022 Nov 30];8(SEP). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28959211/>
102. Zhou X, Xu Y, Xie Z, Xu S, Bi J. Association of extracellular superoxide dismutase gene methylation with cerebral infarction. *Chinese J Med Genet*. 2016 Jun 10;33(3):378–82.
103. Griess B, Klinkebiel D, Kueh A, Desler M, Cowan K, Fitzgerald M, et al. Association of SOD3 promoter DNA methylation with its down-regulation in breast carcinomas. *Epigenetics* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Feb 10];15(12):1325–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32508251/>
104. Teoh-Fitzgerald MLT, Fitzgerald MP, Jensen TJ, Futscher BW, Domann FE. Genetic and epigenetic inactivation of extracellular superoxide dismutase promotes an invasive phenotype in human lung cancer by disrupting ECM homeostasis. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 Feb 10];10(1):40–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064654/>
105. Kamiya T. [Regulation of Extracellular Redox Homeostasis in Tumor Microenvironment]. *Yakugaku Zasshi* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 10];139(9):1139–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31474628/>
106. Galasso M, Dalla Pozza E, Chignola R, Gambino S, Cavallini C, Quaglia FM, et al. The rs1001179 SNP and CpG methylation regulate catalase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022;79(10):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04540-7>
107. Coêlho MC, Queiroz IC, Viana Filho JMC, de AQUINO SG, Persuhn DC, de OLIVEIRA NFP. Mir-9-1 gene methylation and dnmt3b (Rs2424913) polymorphism may contribute to periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:1–11.
108. Issa CTMI, Silva AS, Toscano LT, Medeiros MS, Persuhn DC, da Silva Diniz A, et al. Relationship between cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. *Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. Exp Gerontol*. 2016 Aug 1;81:56–64.

109. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2016 Feb 2 [cited 2022 Nov 30];22(5):1745. Available from: [/pmc/articles/PMC4724606/](#)
110. Bakr IS, Zaki AM, El-Moslemany RM, Elsaka RO. Vitamin D oral gel for prevention of radiation-induced oral mucositis: A randomized clinical trial. *Oral Dis*. 2021;27(5):1197–204.
111. Ribeiro ILA. MODELOS ESTATÍSTICOS PARA A OCORRÊNCIA DE MUCOSITE ORAL GRAVE EM PACIENTES PEDIÁTRICOS ONCOLÓGICOS DURANTE O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO. Universidade Federal da Paraíba; 2015.

APÊNDICE A

FICHA PARA COLETA DOS DADOS

INFORMAÇÕES GERAIS		
Nome		
Sexo	(1) Masculino (2) Feminino	Amostra n°:
Idade		
Cor da pele	(1) Branca (2) Negra (3) Amarela (4) Parda (5) Indígena	
Cidade de residência	(1) João Pessoa (2) Interior da Paraíba (3) Demais Estados	
Diagnóstico		Recidiva (1) Sim (2) Não
Tratamento	(1) QT (2) QT + cirurgia (3) QT + RT (4) QT+ RT + cirurgia	
Telefone		

Se fez cirurgia, dizer quantas foram necessárias e a data.

DADOS HEMATOLÓGICOS		
	COLETA BASELINE (DATA: ____/____/____)	COLETA PÓS-QT (DATA: ____/____/____)
Hematócrito (%)		
Hemácias (milhões/mm³)		
Hemoglobina (g/dL)		
Leucócitos totais (/mm³)		
Linfócitos (/mm³)		
Plaquetas (/mm³)		
Creatinina (mg/dL)		
Ureia (mg/dL)		
AST ou TGO (U/L)		
ALT ou TGP (U/L)		
DHL		

COLETA BASELINE			
Data 1ª internação:		Data coleta:	
Medicações + dosagem no dia da coleta			
Horário da coleta:	Paciente em jejum? (1) Sim (2) Não	Volume:	
Condição oral:			
CPO-d:		ceo-d:	
OAG:	OMS:		

COLETA PÓS QT		
Data da 1ª QT:	Data da 2ª coleta:	Nº ciclos:
Laserterapia? (1) Sim (2) Não Qual? (1) LP (2) LT Início: / / Dias:		
Protocolo de QT/RT (medicação + dosagem)		
Duração do ciclo:		
OAG:	OMS:	
Horário da coleta:	Paciente em jejum? (1) Sim (2) Não	Volume:
Condição oral:		
CPO-d:		ceo-d:
OAG:	OMS:	
Mucosite? (1) Sim (2) Não		
Data:		
Grau: (1) Leve (2) Moderada (3) Grave		

Se paciente tiver feito mais de um ciclo de QT, anotar os protocolos de todos os ciclos até o atual.

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PESQUISA:

Análise de polimorfismos genéticos e perfil de metilação em genes de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em pacientes pediátricos com mucosite oral quimioinduzida

João Pessoa, ____/____ de 20__

Prezado(a) Senhor(a),

Estamos realizando uma pesquisa para verificar se fatores genéticos podem influenciar na ocorrência de inflamação da mucosa da boca (mucosite) em crianças e adolescentes atendidos no Hospital Napoleão Laureano (HNL – João Pessoa-PB), Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC – Campina Grande-PB) e Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP – Recife-PE) que fazem uso de quimioterapia para tratamento da Leucemia.

Faremos um exame da boca das crianças e adolescentes no consultório dentário do setor de Pediatria do hospital ou no leito, caso o paciente esteja internado. No exame iremos verificar a situação dos dentes, da gengiva, da bochecha, da língua, do palato e dos lábios. Este exame não representa riscos para quem será examinado, havendo apenas a necessidade de abrir a boca por cerca de 5 minutos.

Também coletaremos a saliva das crianças e adolescentes e na saliva veremos a quantidade de alguns microrganismos. Nesta saliva será verificado, ainda, se existem alterações em alguns genes, pois algumas destas alterações poderiam fazer com que pessoas que fazem quimioterapia venham a ter maior chance de apresentar inflamação na boca.

A saliva será utilizada apenas para fazer os testes que já lhe explicamos e, após os testes serem feitos, o material será descartado. Obteremos informações do prontuário da criança/adolescente sobre a: idade dela, histórico médico e o tratamento que está sendo realizado.

Os dados individuais não serão divulgados em nenhuma hipótese, mas os resultados da pesquisa ajudarão a compreender se alterações genéticas influenciam no aparecimento da inflamação de gengiva e, com isto, identificar quem são as crianças e adolescentes com maior possibilidade de ter inflamação na boca. Por isso, sua colaboração, autorizando no quadro abaixo a realização do exame da pessoa pela qual é responsável, é muito importante.

Esclarecemos que a sua participação nesta pesquisa é decorrente de sua livre decisão após receber todas as informações que julgar necessárias. Nem você nem a criança pela qual é responsável serão prejudicadas de qualquer forma caso sua vontade seja de não colaborar.

A qualquer momento você pode desistir de continuar colaborando na nossa pesquisa e sua decisão não trará quaisquer prejuízos para o paciente pelo qual você é responsável.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos, conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

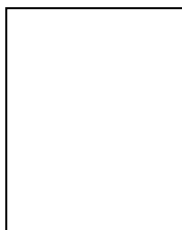
Se quiser mais informações sobre o nosso trabalho, entre em contato com a Profa. Naila Francis Paulo de Oliveira, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária – Campus I, João Pessoa-PB/ Brasil, CEP 58051-900, Phone: +55 83 3216-764, nailafpo@dbm.ufpb.br.

Profa. Naila Francis Paulo de Oliveira
Coordenadora da Pesquisa

AUTORIZAÇÃO

Após ter sido informado sobre as características da pesquisa **Análise de polimorfismos genéticos e perfil de metilação em genes de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em pacientes pediátricos com mucosite oral quimioinduzida**

AUTORIZO a realização do exame em:



Em _____ de _____ de 20____

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Testemunha _____

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – (83) 32167791
Centro de Ciências da Saúde - 1º andar
Campus I - Cidade Universitária CEP: 58.051-900 - João Pessoa-PB
eticaccsufpb@hotmail.com

APÊNDICE C

Termo de Assentimento

PESQUISA:

Análise de polimorfismos genéticos e perfil de metilação em genes de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em pacientes pediátricos com mucosite oral quimioinduzida

João Pessoa, ____/____ de 20__

Você está sendo convidado/a para participar da pesquisa: Análise de polimorfismos genéticos e perfil de metilação em genes de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em pacientes pediátricos com mucosite oral quimioinduzida.

Seus pais permitiram que você participasse.

Com esta pesquisa queremos que colabore conosco permitindo que examinemos sua boca (lábios, dentes, gengiva, língua, palato e bochechas). Também pedimos que você permita que seja feita a coleta de sua saliva.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 19 anos de idade. Caso não queira participar da pesquisa, é um direito seu e não terá nenhum problema em recusar ou desistir.

A qualquer momento você pode nos procurar pelo telefone (83) 999864397 ou pelo e-mail nailafpo@dbm.ufpb.br da pesquisadora Naila Francis Paulo Oliveira. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba pelo telefone (83) 3216-7791.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa vão ser divulgados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa ***Análise de polimorfismos genéticos e perfil de metilação em genes de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em pacientes pediátricos com mucosite oral quimioinduzida***. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva se eu desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

João Pessoa, ____ de _____ de _____.



Assinatura do menor ou impressão dactiloscópica

Assinatura do(a) pesquisador(a)

ANEXO I

Oral Assessment Guide (OAG) Modificado

Escore			
Item	1	2	3
Voz	Normal	Rouca	Dificuldade de falar/dor
Engolir	Normal	Dor ao engolir	Incapacidade de engolir
Lábios	Macio/Dolorido/Úmido	Seco/Rachado	Ulcerado/Sangrante
Língua	Rósea/Úmida	Com ou sem papilas Aparência brilhante Com ou sem vermelhidão	Empolada/Rachada
Saliva	Aguada	Espessa/viscosa	Ausente
Mucosa Jugal/Palato	Rósea/Úmida	Avermelhada/esbranquiçada Sem ulceração	Ulcação com ou sem sangramento
Mucosa labial	Rósea/Úmida	Avermelhada/esbranquiçada Sem ulceração	Ulcação com ou sem sangramento
Gengiva	Rosa/Pontilhada/Firme	Edemaciada com ou sem vermelhidão	Sangramento espontâneo ou sangramento à compressão

Fonte: CHENG; CHANG; YUEN, 2004.

ANEXO II

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil genético e epigenético de pacientes oncopediátricos com mucosite oral quimioinduzida

Pesquisador: Naila Francis Paulo de Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 46855521.1.0000.5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.878.034

Apresentação do Projeto:

A pesquisa levanta a hipótese que a ocorrência de mucosite oral em pacientes oncopediátricos está associada à polimorfismos genéticos e alterações no perfil de metilação de DNA em comparação com pacientes que não desenvolveram a mucosite. Haverá também além dos procedimentos descritos na metodologia, a retenção de amostras para armazenamento em banco, etapa esta já realizada a partir da execução de Projeto original (CAAE: 64574217.3.0000.5188; PARECER: 3.426.233). As amostras de DNA obtidas a partir da coleta de células epiteliais bucais estão mantidas em um banco de amostras no Laboratório de Genética Molecular Humana (DBM -CCEN-UFPB), coordenado pela proponente da presente pesquisa

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o perfil genético e epigenético de crianças e adolescentes com leucemia que desenvolveram mucosite oral decorrente do tratamento quimioterápico com metotrexato.

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



Continuação do Parecer: 4.878.034

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios serão a contribuição para o entendimento do processo de desenvolvimento da doença, visando indiretamente contribuir para desenvolvimento de diagnóstico e tratamento de doenças da boca. Os riscos compreendem os participantes terem seus nomes revelados em função das limitações das tecnologias utilizadas, bem como das limitações dos pesquisadores para assegurar total confidencialidade e potencial risco de sua violação

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Viável e de impacto

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados conforme solicitado por este comitê

Recomendações:

vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se de acordo com as normas da resolução 466/12

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1752667.pdf	05/07/2021 11:29:19		Aceito
Outros	CartaResposta_Mucosite.pdf	05/07/2021 11:28:32	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado	ProjetoMucosite.pdf	05/07/2021	Naila Francis Paulo	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 4.878.034

/ Brochura Investigador	ProjetoMucosite.pdf	11:27:51	de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	05/07/2021 11:27:36	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pais.pdf	05/07/2021 11:27:26	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/07/2021 11:27:19	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3426233_E2.pdf	14/05/2021 10:06:21	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Profa_Naila.pdf	14/05/2021 10:05:47	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Outros	ParecerBiosseguranca.pdf	13/05/2021 10:59:35	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaDepartamento.pdf	13/05/2021 10:08:48	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito
Declaração de concordância	AnuenciaAnaMaria.pdf	12/05/2021 10:20:41	Naila Francis Paulo de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 01 de Agosto de 2021

Assinado por:

**Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))**

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB 4.º Andar
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

ANEXO III

**Comprovante de submissão do artigo intitulado:
“TNF- α promoter hypomethylation is associated with occurrence of oral
mucositis in oncopediatric patients treated with methotrexate” no periódico
Journal of Oral Pathology and Medicine**

07/02/23, 10:42

Gmail - Author Submission Confirmation: JOPM-11-22-ORA-7829



Naila FP de Oliveira <nailafpo@gmail.com>

Author Submission Confirmation: JOPM-11-22-ORA-7829

1 mensagem

JOP Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

18 de novembro de 2022 às 10:37

Responder a: JOPM.office@wiley.com

Para: nailafpo@gmail.com, viana.filho@hotmail.com, marina.castro14@gmail.com, jnqn@academico.ufpb.br, fernandesbioufpb@gmail.com, anamvalenca@gmail.com

18-Nov-2022

Dear Dr de Oliveira,

Your submission entitled "TNF- α promoter hypomethylation is associated with occurrence of oral mucositis in oncopediatric patients treated with methotrexate" has been received by the editorial office of Journal of Oral Pathology and Medicine.

Your manuscript ID is JOPM-11-22-ORA-7829.

You can check on your submission at any time by going to its page in Wiley's Research Exchange submission portal using this link:

<https://wiley.atyponrex.com/submissionBoard/1/7681a2e5-0955-4848-8e8f-48419a975082/current>

If you used ScholarOne directly for your submission, you will not have a link to Wiley's Research Exchange submission portal. Instead, your submission can be checked through the ScholarOne Author Center.

If you DISAGREE with being listed as a co-author, please contact us at:

JOPM.office@wiley.com

Thank you for submitting to Journal of Oral Pathology and Medicine