



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NAYARA DE SÁ RODRIGUES

ESTUDO DO METABOLOMA SALIVAR EM PACIENTES
COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER BUCAL

2020

NAYARA DE SÁ RODRIGUES

**ESTUDO DO METABOLOMA SALIVAR EM PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e Reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Janete Dias Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Levy Anderson César Alves

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Rodrigues, Nayara de Sá

Estudo do metaboloma salivar em pacientes com diagnóstico de câncer bucal /
Nayara de Sá Rodrigues. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia
Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e
Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Janete Dias Almeida

Coorientador: Levy Anderson César Alves

1. Metabolômica. 2. Câncer bucal. 3. Saliva. 4. Cromatografia gasosa. 5.
Espectrometria de Massas. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Alves, Levy
Anderson César, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade
Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Tit. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Dra. Emília Angela Lo Schiavo Arisawa

Universidade do Vale de Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de maio de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Maria Divina e Benedito Eros, pela criação que me deram, por sempre me ensinarem com amor e acima de tudo, com exemplo, a ser uma pessoa forte, com caráter e um ser humano melhor. Eles que sempre me apoiaram em todos os passos da minha caminhada, que choravam de emoção cada vez que alguém ligava em casa perguntando da “Drª Nayara”, mesmo eu não sendo doutora. O orgulho que vocês demonstram por mim sempre serviu para me alavancar, para me impulsionar para frente, mesmo que o medo batesse em minha porta. Serei grata por toda a minha vida e, a cada novo passo que eu der, sempre trarei vocês comigo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira e do vice-coordenador Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado no período de maio/2018 a abril/2020.

Ao Dr Celso Muller Banderia, pelas amostras dos pacientes com CCE, por contribuir para que esse estudo acontecesse.

À minha querida orientadora e quase “mentora espiritual”, Profa Janete Dias Almeida. Serei eternamente grata por ter me aceitado “no meio do caminho” como sua orientada e, mais que isso, por ter aberto os braços de uma forma tão generosa, tão amorosa (marca registrada sua). Obrigada por me ensinar todos os dias a ser uma pessoa mais humana, amorosa. Com você comecei a enxergar os problemas de outra forma, agora eles são chamados de desafios, os quais irei tratar com mais paciência, amorosidade, aceitação, calma e claro, sempre respirando! Sempre terei em meu coração muito carinho, gratidão e admiração por você! Pela professora impecável, pessoa altruísta e ser humano cheio de luz! Obrigada por tudo!

Ao meu querido coorientador Levy Anderson César Alves, que aceitou prontamente “embarcar” nessa aventura metabolômica conosco. Por nos ensinar tanto sobre as “ômicas”, por nos receber com tanto carinho em São Paulo, por nos apresentar a querida Profa Maria Anita Mendes. Muito obrigada por resolver cada dúvida “na madrugada”, por muitas vezes deixar inúmeros afazeres para dar total atenção a esse trabalho. Como já disse algumas vezes, você é maravilhoso e figura-chave para o “nascimento” desse trabalho. Gratidão eterna, querido mestre!

Ao departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, em especial à Profa Maria Anita Mendes, que participou ativamente desse trabalho, sempre disposta a ajudar. Obrigada por nos receber tão bem em São Paulo no Laboratório Dempster. Por compartilhar tanto conhecimento conosco, por ter “rodado” as amostras e nos ajudar com os resultados. Esse trabalho jamais se concretizaria sem a sua participação. Obrigada por tudo!

À querida Profa Estela Kaminagakura Tango, que me recebeu com tanto entusiasmo no início do mestrado. Minha primeira orientadora, que me mostrou cada pedacinho do prédio da FOSJC, que “nos deixou” para brilhar no MD Anderson. Com ela aprendi a ser mais organizada, disciplinada e a acreditar mais no meu potencial. Minha querida professora, sou tão grata por nossos caminhos terem cruzado, por todo aprendizado, por você ter me ensinado desde como montar uma aula a Imuno-histoquímica, sempre preocupada para que a nossa (minha e dos outros orientados) formação fosse a melhor possível. Sempre trarei comigo muito carinho e admiração por você!

À minha “musa inspiração” Profa. Ana Lia Anbinder. Sempre escutei muitos elogios a respeito dela antes mesmo de conhecê-la e, posso dizer com propriedade, ela é muito mais! Querida professora, poderia escrever uma tese de doutorado

com todas qualidades que tanto admiro em você, porém serei breve. Você é incrível! Hoje tenho você como “modelo” de professora, aquela que me espelho antes de cada aula. Obrigada por sempre me tratar com tanto carinho, por acreditar tanto no meu potencial, por me “levantar” em cada tombo e também por cada crítica construtiva, afinal quem realmente se importa quer que o outro cresça. Seu “diamante bruto” jamais esquecerá de você!

A todos os funcionários do ICT, Carla, Ana Lourdes, Maria Salete, Carol, Bruno, Sandra e em especial ao Sérgio, que sempre terei um carinho especial, o qual fiz amizade e sentirei muita falta! Obrigada por cada risada e momentos de descontração, você não imagina o quanto isso trazia leveza aos meus dias!

Aos colegas que me receberam tão bem no início dessa caminhada: Carlos Mateus, Camila, Fernanda, Victor e Lígia. Obrigada por toda ajuda, por cada dúvida de “caloura” que vocês me ajudavam a solucionar e principalmente pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas integrantes da “família Anbinder”: Noala, Renatinha e Jaque. Obrigada pela amizade que foi construída durante esses anos, por toda ajuda em relação ao mestrado e também pelos momentos de risada, pebolim e cafés! Um agradecimento especial à minha querida conterrânea Jaqueline, um dos maiores presentes que o mestrado (e Deus) me deu! Obrigada por essa amizade tão forte que construímos ao longo dessa caminhada, por cada conselho, risada, choro, refeição e passeios ao shopping. Sua amizade e fé trouxeram leveza e força para o meu dia a dia, provavelmente sem isso a caminhada seria ainda mais difícil. Obrigada por entrar em minha vida!

Aos amigos que desde o processo seletivo entraram em minha vida: Anderson, Chey, Hanna, Keila e Bruna. Anderson me ensinou a ser menos agitada e também a ser fera no pebolim; Chey sempre me salvou com suas “mãos de fada”, quando minha coluna “pedia socorro”, além das várias risadas por bobeira; Hanna me ensinou a ser forte independente de “crises de ansiedade” ou problemas na vida pessoal, essa menina-mulher que admiro muito pela garra e coração enorme, sempre estará no meu coração; Keila, que também foi minha “irmã” de orientadora, é uma das pessoas que mais criei admiração, sempre forte, determinada e disposta a me ajudar, desde coisas complexas à fazer tabela no excel, independente de também estar com os prazos “apertados”, ela é uma das amizades que levarei para sempre na minha vida!

Agradeço de forma especial à minha querida “irmã”, amiga, confidente Bruna Fernandes, a qual dei um apelido muito carinhoso por ter esse coração tão “mole” apesar dos 1,82m de altura. Querida amiga, Deus foi tão generoso em me dar um anjo pra me acompanhar nessa caminhada. Só nós sabemos tudo que passamos juntas, tantos momentos bons que levarei sempre comigo e também muitos desafios, os quais sempre pude contar com você! Meu maior presente que o mestrado (Deus) me deu! E que presente grande, hein! Brincadeiras à parte, quero apenas registrar aqui que minha admiração por você, tanto pela profissional brilhante quanto pelo humano incrível que é, é muito maior do que eu posso demonstrar! Obrigada de coração! Você é uma das melhores amigas que tenho em minha vida!

Às amigas que “chegaram depois”, Mariana e Juliani. A Mari me ensinou a ter mais fé, em Deus, na vida e em mim! Com seu jeito meigo e carinhoso, sempre esteve ao meu lado. Nossas “aventuras” em São Paulo jamais serão esquecidas, assim como os tantos momentos maravilhosos que passei com você! Obrigada

pela amizade sincera que construímos tão rápido! Conte sempre comigo pra tudo! À Juliani, conhecida também como “Juriani”, mulher forte que tanto admiro! Obrigada pelas caronas, conselhos e conversas. Você é uma menina brilhante, determinada e que eu sempre levarei com muito carinho no meu coração!

As minhas companheiras de “Rep”: Jéssica e Fernanda. Obrigada por tantos momentos maravilhosos ao lado de vocês! Por terem sido família no meu dia a dia!

Aos meus queridos alunos, que tive a oportunidade em ser “professora” pela primeira vez. Obrigada por tanto carinho e aprendizado. Levarei para sempre com muito carinho, cada um de vocês!

Ao querido Marcos, psicólogo do ICT, quem eu recorria nos momentos de “apuros”. Excelente profissional que sempre me tratou com carinho e prontidão, sempre que eu precisava. Obrigada por tanto!

Aos meus pais Renata e Renato (sim, eles têm o “mesmo” nome), que me deram a vida. Palavras sempre me irão faltar para agradecer todo apoio e amor incondicional que recebi de vocês! Espero sempre lhes dar muito orgulho em forma de gratidão! Eternos amores da minha vida!

A toda minha família, minhas melhores amigas e irmãs de sangue Rayssa e Mariah, por sempre acreditarem no meu potencial e me verem muito além do que realmente sou. Aos meus avós Cida e Moacyr, pelos momentos maravilhosos nos finais de semana, sempre preocupados com as minhas “olheiras”. Sempre serei grata por tanto carinho e amor! Ao meu querido padrasto Gustavo, o qual carinhosamente chamo de “pai Gu”, obrigado pelo apoio de sempre, por me ajudar

com todas as “mudanças” e por, acima de tudo, ser tão amoroso comigo, com as minhas irmãs e minha mãe!

Às minhas tias Juliana e Bruna, que participaram ativamente da minha criação e sempre me apoiaram incondicionalmente! Amo vocês! Agradeço de forma especial as minhas queridas, tia Sandra e prima/irmã Giovanna, por sempre me receberem com tanto carinho e amor em sua casa. O amor e apoio de vocês foram essenciais nessa jornada. Obrigada por tanto!

Aos meus amigos da vida toda: Jéssica, Nathan, Bruna, Letícia e Luísa. Obrigada por me apoiarem em todas as fases da minha vida e por serem os melhores amigos do mundo. Amo vocês!

Ao meu namorado, companheiro, parceiro Mateus Pera. Em meio a tanta “loucura” eu te encontrei, e você trouxe paz para minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional que você sempre me dá, por acreditar mais no meu potencial do que eu mesma acredito, por aguentar meu mau humor e sempre conseguir melhorá-lo. Quero agradecer de forma especial por toda ajuda que você me deu agora na reta final, por aliviar meu fardo e “pegar” um pouco para você parte das minhas angústias e preocupações. Eu te amo demais, sou muito grata e feliz em ter você na minha vida!

À família “Pereira Leite de Jesus”, o grande presente que Deus me deu junto com o Mateus. Obrigado por sempre me receberem tão bem. Por todo carinho, preocupação, marmitinhas e risadas. Deus foi realmente muito generoso comigo! Um agradecimento especial à minha querida cunhada Vanessa, que me ajudou na tradução do artigo para inglês. Vocês são sensacionais!

Enfim, quero agradecer à Deus pelo dom da minha vida, por ter permitido que tantas coisas maravilhosas acontecessem. Pela minha saúde física e emocional, por todas as pessoas maravilhosas que sempre cruzam o meu caminho. Gratidão pela minha vida, por tudo!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl Jung

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS.....	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo geral	22
2.1.1 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Comitê de ética.....	23
3.2 Seleção das amostras.....	23
3.2.1 Grupo 1 – CCE.....	23
3.2.2 Grupo 2 – controle.....	24
3.3 Exame clínico.....	24
3.4 Avaliação do perfil tabágico e grau de dependência nicotínica	25
3.5 Coleta de saliva.....	26
3.6 Metaboloma	27
3.7 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterização da amostra.....	31
4.2 Análise dos dados clínicos.....	32
4.2.1 Pacientes do Grupo CCE	32
4.2.2 Pacientes do Grupo Controle	33
4.3 Análise do perfil metabólico	35
5 DISCUSSÃO	41

6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES.....	59
ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de extração e derivatização de metabólitos salivares.....	29
Figura 2 - Fluxograma esquemático com os componentes da amostra	32
Figura 3 - Diagrama de Venn para os metabólitos salivares dos grupos CCE e controle	35
Figura 4 - Análise de PCA dos metabólitos salivares - Plano fatorial 1 – Grupo controle e grupo CCE	37
Figura 5 - Análise de PCA dos metabolites salivares - Plano fatorial 2 – Grupo controle e grupo CCE	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das variáveis dos grupos CCE e Controle.....	34
Tabela 2 - Auto-valores e porcentagem (%) de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos salivares do grupo CCE e grupo controle	36
Tabela 3 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos CCE e controle e, valor-p do teste de Mann-Whitney	39
Tabela 4 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos CCE e controle e, valor-p do teste de Mann-Whitney	40

Rodrigues NS. Estudo do metaboloma salivar em pacientes com diagnóstico de câncer bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar o metaboloma salivar de pacientes com diagnóstico de câncer bucal ao de pacientes sem histórico de neoplasias malignas. As amostras de interesse foram obtidas por meio da coleta de saliva em dois grupos: Grupo 1 – CCE: constituído de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas que deram entrada para tratamento antineoplásico; e Grupo 2 – Controle: constituído de pacientes sem histórico de neoplasias malignas, emparelhados por idade e sexo aos pacientes do Grupo 1. Os pacientes de ambos os grupos passaram por avaliação do perfil tabágico e grau de dependência nicotínica. As amostras de saliva foram analisadas no Laboratório Demspster de espectrometria de massas do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP por meio de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS). As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de componentes principais (PCA), testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%. Ao todo foram encontrados 467 metabólitos. Desses compostos, 3 foram expressos apenas no grupo CCE, sendo eles: glicina, ácido glioxílico e ácido oxovalérico. A glicina mostrou ligação biossintética com a serina e correlação com a proliferação nas células cancerígenas. O ácido glioxílico e seu efeito antiproliferativo, foi utilizado com fins terapêuticos no câncer de cólon. Não foram encontrados estudos relacionando o ácido oxovalérico com câncer. Devido a sua propriedade acidogênica, sugerimos que este cetoácido possui ligação com a acidificação no microambiente tumoral. A maior parte dos metabólitos significativos foram aminoácidos, que é um importante fator na carcinogênese pela função de síntese de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e ATP. Embora tenha sido utilizada amostra de conveniência para o presente estudo, os resultados demonstraram sinais promissores para a quantificação de metabólitos estatisticamente significativos identificados e relacionados aos processos metabólicos do câncer bucal.

Palavras-chave: Metabolômica. Câncer bucal. Saliva. Cromatografia gasosa. Espectrometria de massas.

Rodrigues NS. Salivar metabolomic study in patients with oral cancer diagnosis.[dissertation].São José dos Campos (SP):São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

The present study aimed to compare the salivary metabolome of patients diagnosed with oral cancer to patients with no history of malignant tumours. The samples of interest were obtained through the collection of saliva in two groups: Group 1 - CCE: comprised patients diagnosed with squamous cell carcinoma who were admitted for antineoplastic treatment; and Group 2 - Control: comprised patients with no history of malignant neoplasms, matched by age and sex to patients in Group 1. Patients in both groups were submitted to the assessment of their smoking profile and degree of nicotine dependence. The salivary samples were analysed in the Dempster Mass Spectrometry Laboratory from the Chemical Engineering Department, Polytechnic School of USP by means of gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS). Statistical analyses were performed through the principal component analysis (PCA) tool, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The level of significance adopted was the conventional value of 5%. Altogether, 467 metabolites were found. Of these compounds, 3 were expressed only in the CCE group: glycine, glyoxylic acid, and oxovaleric acid. Glycine showed a biosynthetic link with serine and correlation with proliferation in cancer cells. Glyoxylic acid and its antiproliferative effect have been used for therapeutic purposes in colon cancer. No studies were found relating oxovaleric acid to cancer. Due to its acidogenic property, we suggest that this keto acid might be linked to acidification in the tumour microenvironment. Most of the significant metabolites were amino acids, which are important factors in carcinogenesis due to protein synthesis, nucleic acids, lipids, and adenosine triphosphate (ATP). Although the convenience sample used for the present study, the results show promising signs for the quantification of statistical significant metabolites identified and related to the metabolic processes of oral cancer.

Keywords: Metabolomics. Oral cancer. Saliva. Gas chromatography-mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa cerca de 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço, sendo o décimo sexto câncer mais comum em todo o mundo (Jemal et al., 2007; Lang et al., 2013). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer bucal é a quarta neoplasia maligna que mais afeta os homens na região sudeste do país, sendo a maioria dos diagnósticos realizados em estágios avançados da doença. Em 2020 foram estimados 15.190 novos casos, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres. Em relação à mortalidade relacionada a essa neoplasia, foram contabilizadas 5.898, sendo 4.672 em homens e 1.226 em mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2020).

Fatores intrínsecos e extrínsecos estão relacionados à etiopatogenia do câncer bucal, sendo o tabaco associado ao etilismo considerado o principal fator etiológico (Blot et al., 1988); porém, os mecanismos patológicos ainda não são totalmente compreendidos (Chen, Yu, 2019). As células cancerígenas possuem vias metabólicas e produtos intermediários alterados, sendo assim, os processos metabólicos diferem das células normais (Mikkonen et al., 2016; Rai et al., 2018).

De maneira geral, estudos que utilizam as “ômicas” como metodologia de investigação têm possibilitado a avaliação de um gene específico ou ainda, a avaliação de um grupo de genes, em função dos metabólitos e substâncias endogenamente produzidas ou, em função das substâncias produzidas ao longo das vias metabólicas de fármacos (Lindon, Nicholson, 2014).

Com os avanços na pesquisa científica e o desenvolvimento de novas técnicas, outras frentes de estudo das “ômicas”, além da biologia molecular por meio da genômica e transcriptômica, têm se destacado. Dentre elas, o estudo de metabólitos que compõem os biofluidos, têm sido de grande valia na identificação de possíveis biomarcadores (Bessonneau et al., 2017; Washio et al., 2016).

A metabolômica, chamada também de perfil metabólico, é a mais recente das tecnologias "ômicas", sendo um estudo sistêmico dos metabólitos gerados a partir dos processos do metabolismo, definida como resposta metabólica multiparamétrica dos sistemas vivos frente a estímulos pato-fisiológicos ou modificações genéticas. Consiste na análise de um grupo de metabólitos de baixo peso molecular presentes em um organismo vivo, que por muitas vezes são produtos finais de expressões gênicas (Mikkonen et al., 2016; Zhao, 2013).

A metabolômica entrega uma descrição analítica dos metabólitos presentes em uma amostra biológica, tendo como principal objetivo identificar novos biomarcadores metabólicos, atuando na detecção de vias metabólicas alteradas que, por muitas vezes indicam a presença de determinadas patologias (Beger, 2013; Nicholson, Lindon, 2008).

O estudo das metabolômicas pode ser realizado em amostras de tecido e de biofluidos (Rai et al., 2018; Shin et al., 2016). Urina e sangue são os fluidos corporais mais usuais, sendo suco pancreático, fluido cefalorraquidiano e saliva as amostras mais recentemente utilizadas (Alves, 2016; Mandel et al., 1967).

A avaliação das amostras é feita através de técnicas analíticas do estado da arte, tal como espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS), espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Markley et al., 2017; Rai et al., 2018).

Espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica que ioniza espécies químicas e classifica os íons com base na sua taxa de massa e carga, produzindo um espectro de massa; geralmente é associada à cromatografia ou outras técnicas de separação para melhoria na determinação e capacidade de resolução de massa (Ohshima et al. 2017; Ye et al. 2014). A aplicabilidade dessas técnicas foi demonstrada em diferentes condições patológicas, tais como doenças renais

crônicas, carcinoma hepatocelular e cânceres colorretais (Alves, 2016; Beger, 2013).

As concentrações dos metabólitos variam frequentemente em resposta a um tratamento ou doença em questão. Os biomarcadores carregam informações sobre os locais acometidos e mecanismos da doença, além de atuarem como indicadores para suscetibilidade individual ou como sinalizador de alguma patologia já existente (Nicholson, Lindon, 2008).

A metabolômica tem sido aplicada amplamente em estudos relacionados ao câncer, bem como em sua fisiopatologia, na resposta ao tratamento e principalmente na descoberta de biomarcadores com a finalidade de rastreamento ou diagnóstico precoce (Backshall et al., 2011; Roodhart et al., 2011; Tan et al., 2012; Weaver et al., 2012; Ye et al., 2012). No estudo de Sugimoto et al. (2010) foram identificados vinte e oito metabólitos diferenciais nas amostras de saliva de pacientes com diagnóstico de câncer bucal em relação às amostras de controle, além de níveis significativamente mais elevados de poliaminas, taurina e piperidina no grupo de estudo.

A metabolômica salivar também foi aplicada em estudo para o diagnóstico precoce e monitoramento da evolução de acordo com o estadiamento de pacientes com CCE bucal (Wang et al., 2014a).

A saliva é um fluido biológico ligeiramente ácido (pH 6.0–7.0), constituído por água (99%), proteínas (0,3%), substâncias inorgânicas (0,2%) e substâncias orgânicas (Liu, Duan, 2012). Possui uma variedade de compostos, como proteínas/peptídeos, ácidos nucleicos, eletrólitos, hormônios e uma variedade de imunoglobulinas (Chiappin et al., 2007; Humphrey, Williamson, 2001).

A saliva é secretada pelas glândulas salivares maiores e menores, sendo que até 90% do volume total é secretado pelas glândulas salivares maiores (Humphrey, Williamson, 2001). Sua principal função, além de iniciar o processo

digestivo, auxiliando na deglutição, lubrificação e promoção da degustação, é atuar como barreira protetora contra patógenos e toxinas (Humphrey, Williamson, 2001).

Por ser um biofluido de coleta fácil, simples, não invasivo e de baixo custo, a saliva apresenta-se com alto potencial de monitoramento da saúde e vem despertando grande interesse na comunidade científica (Bessonmeau et al., 2017; Washio et al., 2016). A avaliação de seus metabólitos, através de marcadores específicos, pode permitir o monitoramento de resultados terapêuticos, diagnóstico e progressão de doenças (Mikkonen et al., 2016; Zhang et al., 2012).

O estudo da metabolômica salivar demonstrou ser uma ferramenta útil para o diagnóstico de diversas doenças sistêmicas e outras neoplasias malignas, incluindo a síndrome de Sjögren (Hu et al., 2010; Mikkonen et al., 2013), câncer de mama (Bigler et al., 2002), câncer de pulmão (Xiao et al., 2012; Zhang et al., 2012) e câncer pancreático (Lau et al., 2013; Sugimoto et al., 2010).

A literatura sugere que a abordagem metabolômica pode apresentar-se como complementar ao exame clínico, contribuindo para melhorar o diagnóstico e o prognóstico de diversas doenças (Wei et al., 2011). A elucidação das alterações metabólicas no câncer de boca é de grande importância, seja para a identificação de novos biomarcadores bem como a compreensão do desenvolvimento e progressão da doença (Chen, Yu, 2019).

Ressalta-se que para os pacientes com câncer, o diagnóstico precoce está diretamente relacionado a um melhor prognóstico. Assim sendo, a detecção das vias metabólicas alteradas, bem como seus respectivos biomarcadores, podem fornecer o diagnóstico de câncer em seu estágio inicial, aumentando as chances de um prognóstico favorável, proporcionando um aumento da taxa de sobrevida, consequentemente contribuindo para tratamentos menos mutilantes, preservando assim também a qualidade de vida do paciente.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o metaboloma salivar de pacientes com diagnóstico de câncer bucal e de pacientes sem histórico de neoplasias malignas.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) identificar possíveis biomarcadores relacionados ao CCE;
- b) identificar, interpretar e comparar os metabólitos endógenos na saliva dos pacientes diagnosticados com câncer bucal e de pacientes sem histórico de neoplasias malignas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos (ICT), Unesp, como parte do estudo “Tabagismo e sua interrelação com leucoplasia e carcinoma de células escamosas bucal: análise metabólica e citomorfológica”, parecer número 3.334.281/2019 (ANEXO B).

Após terem sido esclarecidos sobre as condições deste trabalho, os pacientes que aceitaram participar da pesquisa como voluntários, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em duas vias, sendo uma do pesquisador (APÊNDICE A).

3.2 Seleção das amostras

As amostras de interesse foram obtidas por meio da coleta de saliva, entre dois grupos:

3.2.1 Grupo 1 – CCE

Constituiu-se de pacientes, com idade acima de 18 anos, com diagnóstico de CCE bucal que deram entrada para tratamento antineoplásico nos serviços de

Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Municipal José Carvalho de Florence na cidade de São José dos Campos/SP, do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (PUC-Campinas) e do Hospital Municipal Mário Gatti de Campinas/SP.

3.2.2 Grupo 2 – controle

Constituiu-se de pacientes atendidos no ICT Unesp, pareados por idade e sexo aos pacientes do Grupo CCE, sem histórico de neoplasias malignas.

Para o Grupo CCE foram considerados como critérios de inclusão: pacientes acima de 18 anos diagnosticados com CCE, fumantes, ex-fumantes e não fumantes. Os critérios de não inclusão: pacientes previamente submetidos a qualquer tipo de tratamento antineoplásico, quer seja cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia em qualquer órgão ou sistema, bem como casos de CCE de lábio.

Para o Grupo Controle foram considerados como critérios de inclusão: pacientes acima de 18 anos sem histórico de neoplasias malignas. Os critérios de não inclusão foram os mesmos adotados para o grupo de estudo.

3.3 Exame clínico

Todos os pacientes foram submetidos ao exame físico extra e intra-bucal e responderam ao questionário sob forma de entrevista, no qual foram abordadas questões como a frequência e quantidade consumida de cigarros e bebidas alcoólicas. Nos casos dos pacientes com CCE, foi anotado o estadiamento clínico (TNM) e o tratamento oncológico ao qual o paciente seria submetido – dados

esses coletados do prontuário médico. Os dados obtidos foram armazenados em uma ficha de coleta (APÊNDICE B).

3.4 Avaliação do perfil tabágico e grau de dependência nicotínica

Para a análise do perfil tabágico foram analisados dados referentes ao consumo de tabaco, o tipo de cigarro consumido, a quantidade e tempo de consumo. A carga tabágica, ou seja, a quantificação de quanto o indivíduo fumou até a presente data, foi calculada por meio do cálculo da relação anos/maço (*pack-years*) que é o número de cigarros fumados por dia, dividido por vinte e multiplicado pelo número de anos que o indivíduo fumou (Reichert et al., 2008).

Foram consideradas as seguintes definições relacionadas ao consumo de tabaco:

- a) tabagistas ativos ou fumantes: indivíduos que fumaram ao menos 100 cigarros durante a vida e que, durante o período em que foi realizada a entrevista, permaneciam fumando diariamente ou ocasionalmente;
- b) não fumantes: indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos que 100 cigarros durante a vida e que não estavam fumando no período em que foi realizada a entrevista;
- c) ex-fumantes: indivíduos que fumaram ao menos cem cigarros na vida e que não estavam fumando no período em que foi realizada a entrevista (Reichert et al., 2008).

A avaliação da dependência nicotínica foi realizada por meio do Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros (TFDC), composto por seis questões que

são pontuadas segundo as respostas. De acordo com a pontuação obtida, os pacientes são incluídos em cinco categorias distintas em relação à dependência nicotínica: muito baixa (0 a 2 pontos), baixa (3 a 4 pontos), moderada (5 pontos), elevada (6 a 7 pontos) e muito elevada (8 a 10 pontos) (Heatherton et al., 1991; Fagerström, 2012) (APÊNDICE B).

3.5 Coleta de saliva

As coletas das amostras de saliva foram realizadas no período da manhã para minimizar os efeitos das variações salivares na sua composição. Foram realizadas em no mínimo 60 minutos após a ingestão de alimentos e em no mínimo 12 horas após consumir bebidas alcoólicas. Os pacientes foram instruídos a não ingerirem quaisquer alimentos, nem realizar escovação dentária, pelo tempo mínimo de duas horas, antes dos procedimentos de coleta da saliva.

Para a coleta de saliva, os indivíduos permaneceram sentados de forma ereta, em ambiente arejado e calmo. A coleta da saliva foi feita de forma não estimulada e sem esforço em um tubo plástico descartável (Falcon®, Rio de Janeiro) de acordo com o método modificado de Navazesh (Navazesh et al., 2008). Os pacientes foram orientados a expectorar 3 mL de saliva nos tubos plásticos. Após a coleta, os tubos foram fechados e transportados submersos por gelo em um bolsa térmica por um período de no máximo 1 hora até o laboratório e armazenados a -80°C até o momento da análise.

3.6 Metaboloma

A análise do metaboloma salivar das amostras foi realizada no Laboratório Dempster de Espectrometria de Massas do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Poli-USP.

As amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente, e 300 µL secos em aparelho *Speedvac*. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de metanol, agitados em agitador do tipo vórtex por 2 segundos(s), e novamente secados em aparelho *Speedvac*. Seguido ao processo de extração, foi realizada a derivatização adicionando a cada eppendorf 150 µL de partes iguais de uma solução de bistrimetilsilil-trifluoroacetamida (250 µL) e uma mistura de solventes: acetonitrila (125 µL), diclorometano (100 µL) e ciclohexano (25 µL) (v/v 5:4:1) com 5% de trietilamina (25 µL), homogeneizado em agitador do tipo vórtex novamente por 2 s e mantida em banho térmico a 60°C por 1 hora. As amostras foram retiradas do banho térmico e novamente agitadas e centrifugadas (13000 rpm por 2 s). O sobrenadante foi transferido para um tubo Vial com insert (CMS 123TAT, Brasil) transparente de 2 mL com tarja, para posterior injeção de 2 µL da amostra em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, QP 2010Plus, Shimadzu do Brasil), coluna DB-1, 50 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 1,20 µm (Alves, 2016).

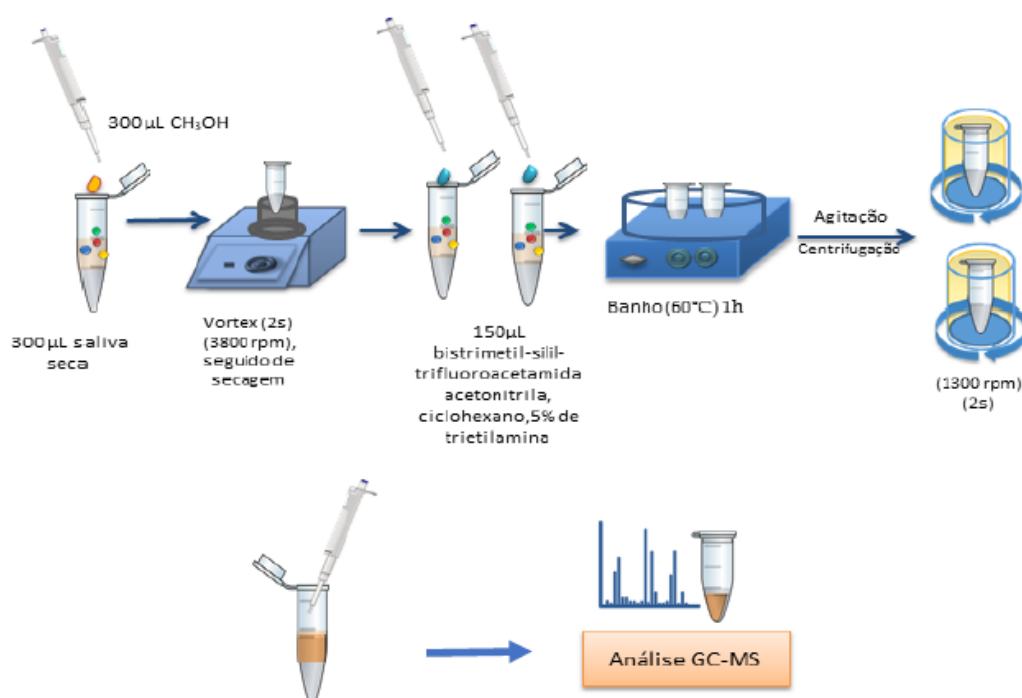
As amostras foram submetidas às seguintes condições:

- a) temperatura do injetor de 280°C;
- b) temperatura inicial da coluna de 50°C;
- c) taxa de aquecimento de 5°C por min até 300°C, permanecendo a essa temperatura por 10 min;
- d) tempo total de corrida de 60 min;

- e) temperatura da fonte de ionização de 300°C;
- f) corte de solvente de 5 min; e temperatura de interface de 290°C (Alves, 2016).

Dessa forma, um cromatograma de íons total (TIC) com intervalo de massa de 40 a 600 Da foi obtido. A segunda etapa consistiu em uma nova extração seguida de derivatização com hexano para extração das moléculas apolares presentes na saliva. Foi adicionado 1 mL de hexano à amostra no tubo plástico e agitado em agitador do tipo vórtex por 2 s. Foi acrescentado 200 µL de solução de hidróxido de sódio metanólico 2 N sob agitação. O tubo foi colocado por 20 s em um banho à 50°C com agitação manual por um minuto. Foi adicionado 200 µL de solução de ácido clorídrico metanólico (2N) com agitação em agitador do tipo vórtex por 2 s, seguida de centrifugação. Houve a formação de duas fases, sendo a fase superior a camada orgânica que contém lipídios esterificados solubilizados em hexano. O produto sobrenadante dessa reação foi transferido para um novo *ependorf*, seco em aparelho *Speedvac*, onde foi resuspendido em 250 µL de hexano. O novo produto sobrenadante foi transferido para um tubo Vial, por meio de uma micropipeta eletrônica para posterior análise de GC-MS, sob as mesmas condições anteriores (Figura1) (Alves, 2016).

Figura 1 - Processo de extração e derivatização de metabólitos salivares



Fonte: Alves, 2016.

3.7 Análise estatística

Os dados clínicos foram analisados a partir da descrição de variáveis categóricas com contagens e proporções, foram descritas variáveis quantitativas de distribuição normal e assimétrica como média, desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil), respectivamente. Para consideração da normalidade, foi utilizada inspeção visual de histogramas ou aplicação de teste de normalidade D'agostino et al. (1990), quando adequado. Consideramos o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para todos os testes estatísticos. As análises estatísticas dos dados

foram realizadas com a utilização do *software* R (R Foundation, Vienna, Austria) (Horton; Kleinman, 2015, Horton, Kleinman, 2010, Boshnakov, 2012).

Para verificar a associação entre variáveis categóricas em tabelas de contingência maiores que 2x2 foi utilizado o teste exato de Fisher-Freeman-Halton, e o teste t-Student para comparação de variáveis quantitativas de distribuição normal entre 2 grupos independentes.

Para a comparação de variáveis quantitativas com distribuição assimétrica – ou quando o tamanho da amostra observada era consideravelmente reduzido nos grupos – foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Foi utilizado também para pesquisa dos metabólitos a base de dados *The Human Metabolome Data Base version 4.0* (HMDB, 2020).

4 RESULTADOS

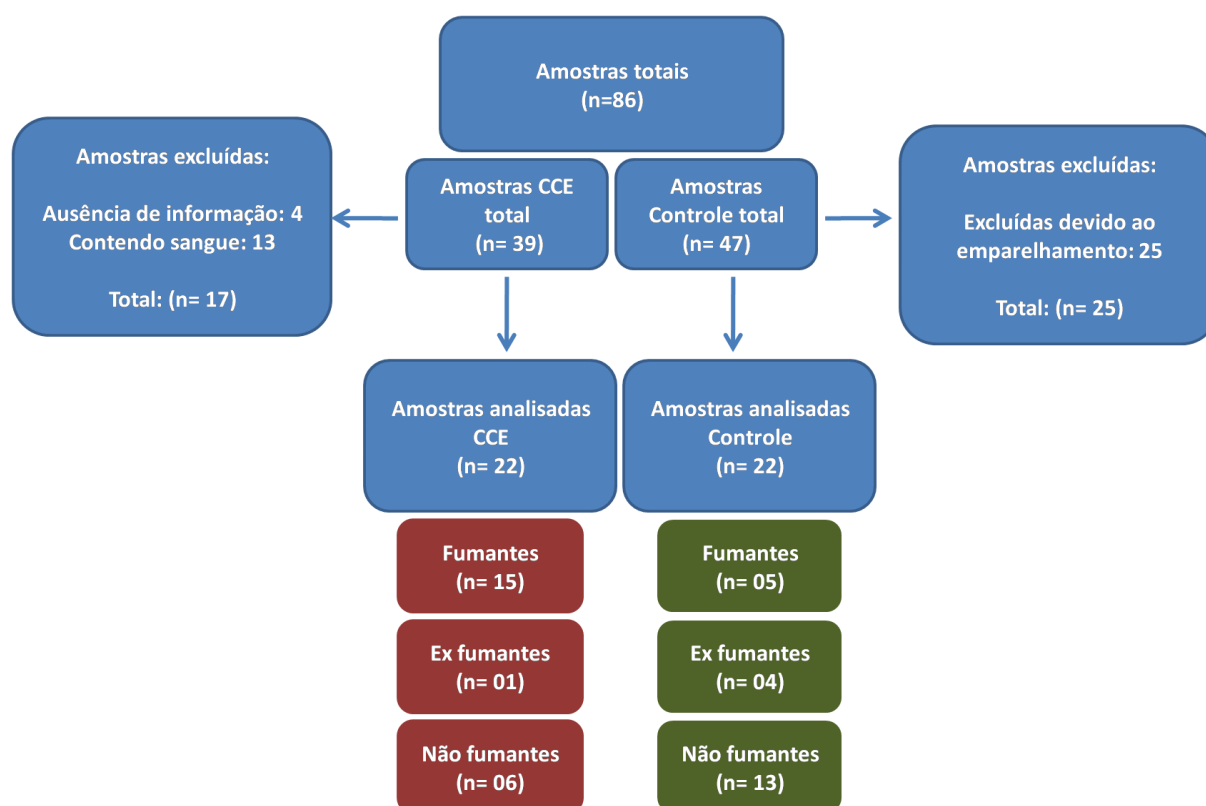
4.1 Caracterização da amostra

Foram coletadas 86 amostras ao todo, sendo 39 de pacientes pertencentes ao Grupo CCE e 47 pertencentes ao Grupo Controle.

As amostras analisadas foram de 44 indivíduos, divididas em 22 do Grupo CCE e 22 do Grupo Controle. Algumas amostras de ambos os grupos não foram incluídas. Do Grupo CCE, 4 por falta de informação e 13 não foram válidas. As amostras do Grupo Controle foram emparelhadas por sexo e idade, perfazendo 22 amostras analisadas (Figura 1).

Em relação ao sexo, ambos os grupos foram compostos por 5 (23%) voluntários do sexo feminino e 17 (77%) do sexo masculino.

Figura 2 - Fluxograma esquemático com os componentes da amostra



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Análise dos dados clínicos

A análise dos dados clínicos está apresentada abaixo de forma descritiva.

4.2.1 Pacientes do Grupo CCE

Os 22 pacientes do Grupo CCE apresentaram faixa etária de 35-80 anos e idade média de $56,3 \pm 10,3$ anos.

Em relação ao tabagismo, 15 (68,2%) responderam ser fumantes, 1 (4,5%) ex-fumante e 6 (27,3%) nunca fumaram. A média de cigarros fumados por dia foi de $18,2 \pm 13,7$ cigarros, o tempo de consumo de cigarros foi de $27,7 \pm 21,9$ anos, e a média da carga tabágica foi de $35,1 \pm 13,7$ maços/ano.

O TFDC realizado para os pacientes fumantes revelou uma média de $3,9 \pm 3,1$ pontos que representa baixo nível de dependência nicotínica (Fagerström, 2012).

Em relação ao estágio de câncer dos pacientes, 11 (50%) foram diagnosticados no estágio 4, 3 (13,6%) no estágio 3, 5 (22,7%) no estágio 2, 1 (4,5%) no estágio 1; 2 (9%) pacientes sem informação no prontuário.

4.2.2 Pacientes do Grupo Controle

Os 22 indivíduos do Grupo Controle apresentaram média de idade de $55,1 \pm 10,2$ anos de 32 a 79 anos.

Em relação ao tabagismo, 5 (22,7%) pacientes declararam ser fumantes, 4 (18,3%) ex-fumantes e 13 (59%) nunca fumaram. A média de cigarros fumados ao dia foi de $9,5 \pm 15,6$ cigarros, o tempo de consumo de cigarros foi de $14 \pm 18,1$ anos e a carga tabágica foi de $17,6 \pm 32,4$ maços/ano. O TFDC teve como média $1,2 \pm 2,3$ pontos que representa nível muito baixo de dependência nicotínica (Fagerström, 2012).

4.2.3 Análise comparativa entre os grupos

A análise dos dados demográficos de ambos os grupos e a relação quantos aos hábitos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das variáveis dos grupos CCE e Controle

Variáveis	Grupo CCE n total = 22	Grupo controle n total = 22
Sexo		
Homens	17 (77%)	17 (77%)
Mulheres	5 (23%)	5 (23%)
Idade (anos)	56,3 ± 10,3	55,1 ± 10,2
Cigarros/dia	18,2 ± 13,7	9,5 ± 15,6
Tempo de uso (anos)	27,9 ± 23,0	14 ± 18,1
Carga tabágica (maços/ano)	35,1 ± 13,7	17,6 ± 32,4
TFDC (pontos)	3,8 ± 3,1	1,2 ± 2,3

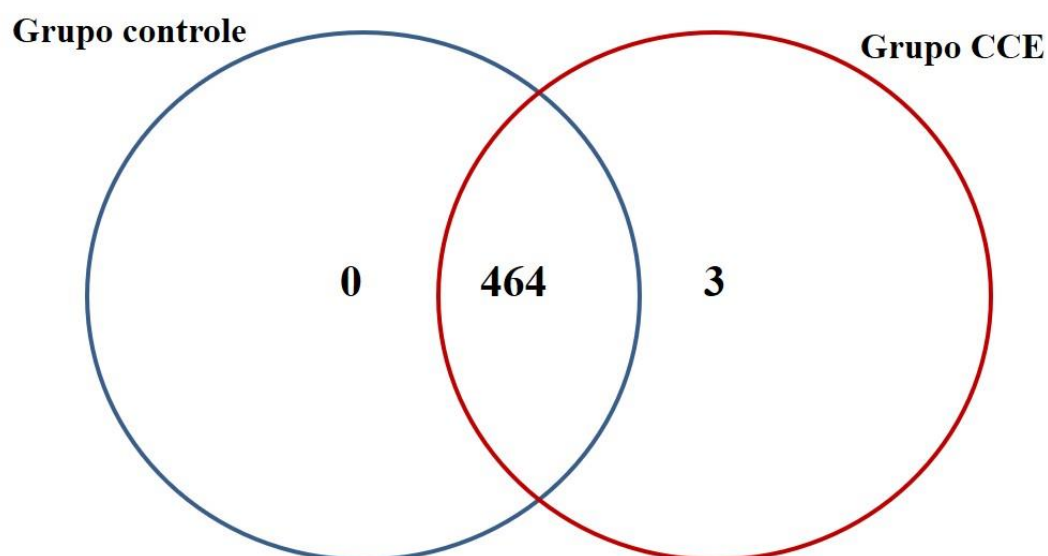
Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Análise do perfil metabólico

Foi utilizado o *software* R (R Foundation, Vienna, Austria) para a análise dos metabólitos de ambos os grupos CCE e controle.

Todos os metabólitos salivares foram colocados em um diagrama de Venn para a avaliação de distribuição por grupo. A partir desse diagrama (Figura 3), observamos que o grupo que apresentou maior número de metabólitos específicos foi o grupo CCE, que obteve 467 metabólitos, 3 compostos a mais que o grupo controle (Glicina, ácido glioxílico e ácido oxovalérico), o qual apresentou os mesmos 464 metabólitos presentes no grupo CCE.

Figura 3 - Diagrama de Venn para os metabólitos salivares dos grupos CCE e controle



Fonte: Elaborado pela autora.

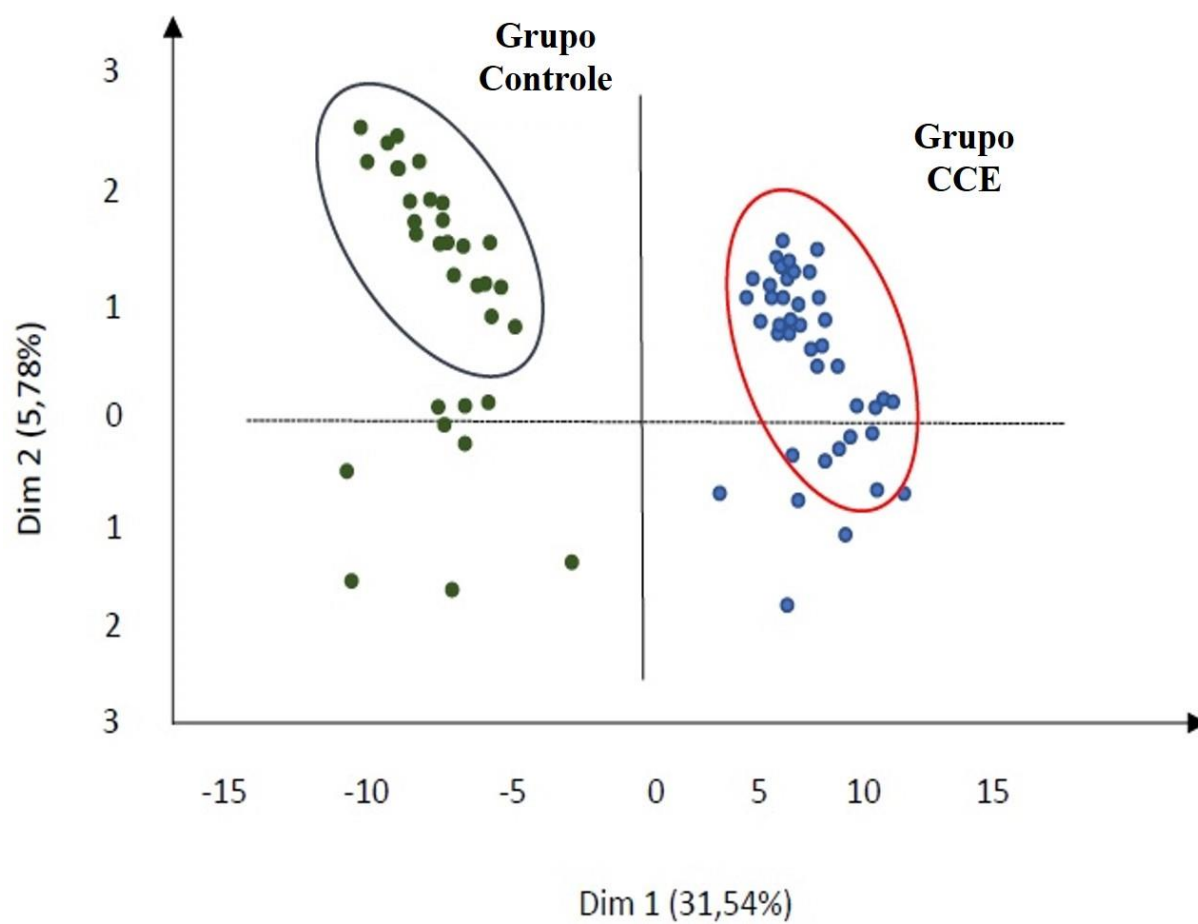
Após a separação dos metabólitos em cada grupo, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) aplicando-se um filtro para os metabólitos de intersecção entre os grupos. Autovalores maiores que 1 foram considerados como o número de componentes principais.

Tabela 2 - Auto-valores e porcentagem (%) de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos salivares do grupo CCE e grupo controle

Componente	Auto-valor	% variabilidade
1	12,35	45
2	11,43	36
3	10,32	35
4	9,55	42
5	8,76	34
6	7,97	67
7	6,65	78
8	5,32	65
9	4,67	77
10	3,21	72

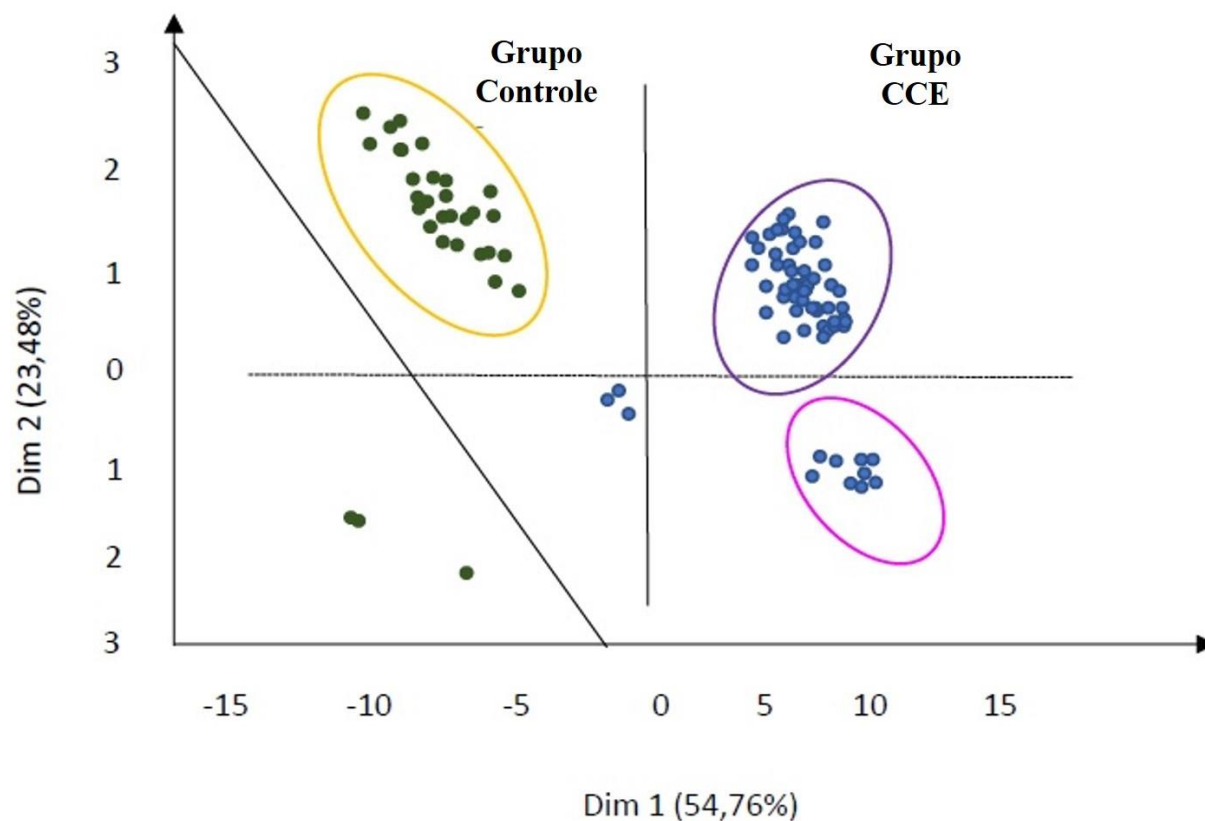
Fonte: Elaborado pelo autora.

Figura 4 - Análise de PCA dos metabólitos salivares - Plano fatorial 1 – Grupo controle e grupo CCE



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 - Análise de PCA dos metabólitos salivares - Plano fatorial 2 – Grupo controle e grupo CCE



Fonte: Elaborado pela autora.

Realizamos a análise estatística da quantificação relativa de cada metabólito salivar e, para abrangermos aqueles que estavam presentes em ao menos 80% da amostra, utilizamos um filtro com esse percentual. As tabelas 3 e 4 mostraram apenas os metabólitos salivares que foram estatisticamente significantes, comparando os grupos CCE e controle. Foi utilizado o teste de Mann-Withney para ambos os grupos.

Tabela 3 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos CCE e controle e, valor-p do teste de Mann-Whitney

Metabólito Salivar	Grupo CCE			Grupo Controle			valor-p
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
Dimetilglicina	5,55	5,46	2,44	15,76	8,43	3,12	<0.0001
Ácido glioxílico	4,44	4,76	1,56	10,45	2,56	2,58	<0.0002
Ácido glicólico	6,89	2,36	1,67	17,56	3,88	1,09	<0.0001
Sarcosina	3,67	0,87	3,11	18,45	4,55	3,55	<0.0001
Dihidroxiacetona	4,32	10,34	2,44	34,7	2,98	4,12	<0.0001
Ácido benzóico	5,67	10,51	3,11	11,8	5,22	3,12	<0.0001
Ácido octanóico	8,99	25,65	1,23	9,76	8,45	2,58	<0.0002
Ácido nicotínico	5,55	9,66	2,44	17,89	8,77	0,75	<0.0004
Ácido fenilacético	4,44	2,36	1,56	3,78	1,35	1,25	<0.0001
Ácido pelargônico	6,89	31,8	1,67	21,24	12,87	1,55	<0.0001
Ácido capríco	5,77	0,87	1,09	2,55	2,33	1,45	<0.0001
O-fosfoetanolamina	3,67	10,34	3,11	15,76	11,31	0,65	<0.0002
Trietanolamina	11,56	10,51	1,23	10,45	1,23	2,35	<0.0002
Ácido ureidopropiônico	33,87	29,3	1,45	28,56	21,21	1,45	<0.0004
Ácido Láurico	21,78	19,56	1,21	18,45	12,67	0,65	<0.0001
Ribulose	45,78	41,23	0,87	34,7	23,1	2,35	<0.0001
Ribonolactona	13,56	11,54	2,13	11,8	12,6	0,32	<0.0001
2-Fosfato de glicerol	3,45	3,74	0,23	10,7	8,54	0,65	<0.0002
2-desoxilglucose	4,90	2,56	2,10	2,89	1,23	1,45	<0.0003
Arginina	6,88	5,61	2,56	2,67	2,31	2,35	<0.0001
Ornitina	4,66	1,44	3,43	1,56	1,81	0,65	<0.0002
Mevalonolactona	21,78	19,56	1,21	18,45	12,67	0,65	<0.0001

Legenda: DP: desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos CCE e controle e, valor-p do teste de Mann-Whitney

Metabólito Salivar	Grupo CCE			Grupo Controle			valor-p
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
2-Propil-5-hidroxiácido pentanoico	3,55	15,43	2,44	15,76	8,43	1,09	<0.0001
Ácido citramálico	4,44	23,5	1,56	10,45	2,56	0,75	<0.0002
Isovalerilglicina	5,77	11,31	1,09	28,56	2,11	1,55	<0.0004
Eritrulose	3,67	10,21	3,11	18,45	4,55	1,45	<0.0001
N-butilglicina	4,32	14,67	2,44	34,7	2,98	0,65	<0.0001
Ácido antranílico	5,67	11,3	3,11	11,8	5,22	2,35	<0.0002
Ácido L-málico-13C4	8,99	3,56	1,23	9,76	8,45	0,65	<0.0002
Ácido 2-aminooctanóico	2,55	23,5	2,44	17,89	8,77	1,09	<0.0001
Di-hidrouracilo	4,44	12,43	1,56	3,78	1,35	1,25	<0.0001
Ácido adípico	6,89	31,8	1,67	21,24	12,87	2,35	<0.0001
Treitol	5,77	0,87	1,09	2,55	2,33	0,32	<0.0002
N-acetilserina	1,67	10,34	3,11	15,76	11,31	0,65	<0.0003
Isovaleroilglicina	11,56	10,51	1,23	10,45	1,23	1,45	<0.0001
Éster 5-metilico do ácido glutâmico	32,7	25,65	2,31	17,56	3,56	0,23	<0.0001
Ácido 3-aminoglutárico	33,87	29,3	1,45	28,56	21,21	2,10	<0.0004
Meso-eritritol	21,78	19,56	1,21	13,56	12,67	1,12	<0.0001
Ácido L-aspartico-d3	45,78	41,23	0,87	3,45	23,1	2,56	<0.0001
Ácido L-aspartico	13,56	11,54	2,13	4,90	12,6	3,43	<0.0001
Metionina	3,45	3,74	0,23	1,89	8,54	0,65	<0.0002
Citosina	4,90	2,56	2,10	6,88	1,23	1,45	<0.0003
5-Oxoprolina	1,89	3,71	1,12	0,88	2,44	0,65	<0.0001
Ácido tioglicólico	6,88	5,61	2,56	2,67	2,31	2,35	<0.0001
4-hidroxiprolina	4,66	1,44	3,43	1,56	1,81	0,65	<0.0002
Ácido 3-metiladípico	21,78	19,56	1,21	18,45	12,67	0,65	<0.0001

Legenda: DP: desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

A carcinogênese é um processo complexo no qual ocorrem eventos celulares e moleculares que resultam na transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica maligna (Hanahan, Weinberg, 2011; Klaunig, 2018). O processo de carcinogênese, que envolve intensa proliferação celular desordenada, necessita de grande quantidade de energia, para isso as células cancerígenas sofrem reprogramações metabólicas, a fim de acumular elementos como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Cairns, 2011; Schulze, Harris, 2012), além de utilizarem redes metabólicas semelhantes aos tecidos normais dos quais têm origem (Jang et al., 2013).

Para o presente estudo foram coletadas primeiramente as amostras de saliva de pacientes diagnosticados com CCE antes do início do tratamento antineoplásico, para depois serem coletadas, de forma a emparelhar conforme sexo e idade, as amostras de saliva dos pacientes do grupo controle.

Assim como na epidemiologia descrita na literatura, os pacientes diagnosticados com CCE em nosso estudo também se mostraram ser em sua maioria homens (77%), tabagistas (68,2%), na sexta década de vida ($56,3 \pm 10,3$ anos). Em relação ao estágio da doença no qual os pacientes do grupo CCE se encontravam no momento do diagnóstico, foi observado que 50% dos casos receberam o diagnóstico no estágio 4 e apenas 4,5% no estágio 1. É de suma relevância discutir o diagnóstico tardio de CCE em estágios mais avançados (Bandeira et al., 2017), sendo desfavorável o prognóstico da doença, qualidade de vida dos pacientes, alto custo do tratamento para o sistema de saúde e, não menos importante a sobrevida.

Avaliando os hábitos tabágicos, o grupo CCE apresentou uma maior média de fumantes (50%) em relação ao grupo controle (22,7%), o qual mostrou

que a grande maioria dos participantes nunca fumaram (59%). A média de cigarros fumados por dia no grupo CCE também se mostrou mais elevada ($18,2 \pm 13,7$) comparada ao grupo controle ($9,5 \pm 15,6$), bem como o tempo de consumo em anos, o qual foi de $27,7 \pm 21,9$ anos no grupo CCE e $14 \pm 18,1$ anos no grupo controle, o que resultou consequentemente em uma maior carga tabágica no grupo CCE ($35,1 \pm 13,7$ maços/ano) em comparação ao grupo controle ($17,6 \pm 32,4$ maços/ano).

Quando aplicado o TFDC, o qual indica o nível de dependência nicotínica, foi revelado que no grupo CCE o nível foi baixo, sendo de $3,9 \pm 3,1$ pontos e muito baixo no grupo controle, $1,2 \pm 2,3$ pontos.

Novas abordagens diagnósticas para CCE têm sido estudadas em busca de realizar o diagnóstico precoce e, a partir deste pensamento, atualmente, o câncer bucal é a doença maligna com maior número de estudos por meio da metabolômica salivar (Gardner et al., 2020). A análise metabolômica fornece informações detalhadas sobre sistemas e *insights* relacionados ao estado de saúde em que o indivíduo se encontra (Fiehn, 2002; Spratlin et al., 2009; Lohavanichbutr et al., 2018).

Um biomarcador de câncer refere-se a uma substância ou processo indicativo da doença no indivíduo, podendo ser um produto liberado pela própria neoplasia ou uma resposta específica do corpo frente à doença (Wagner, Srivastava, 2012). Gardner e seus colaboradores, através de uma revisão sistemática, demonstraram que existem na literatura aproximadamente 72 estudos que aplicam metabolômica à saliva humana, nos quais a maioria se concentrou na descoberta de biomarcadores de diversas doenças, como câncer bucal, doenças periodontais e Alzheimer (Gardner et al., 2020). Em relação aos biomarcadores de CCE, foram descritos 49 metabólitos superexpressos: alanina, taurina, leucina/isoleucina, histidina, valina, triptofano, glutamato, treonina, carnitina, ácido pipecólico (Sugimoto et al., 2010); pipecolato, s-adenosilmetionina

(Ishikawa et al., 2016); lactato, ácido n-eicosanóico (Wei et al., 2011); propionilcolina, ácido succínico, ácido láctico (Wang et al., 2014b); 1-metil-histidina, 1,3,4-trifosfato de inositol, d1glicerato-2-fosfato, 4-nitroquilonina-1-óxido, 2-oxoarginina, nitróxido de norcocaína, esfinganina-1-fosfato, pseudouridina (Sridharan et al., 2017); colina, ácido hidroxifenilacético, ácido 2-hidroxi-4-metilvalérico, ácido 3-fenilático, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido tereftálico, butirobetaina, ácido 3-4-hidroxifenil-propiónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido butírico, cadaverina, ácido 2-oxoisovalérico, trimetil-lisina, ácido glicólico, ácido 3-hidroxibutírico, ácido heptanóico (Oshima et al., 2017); Guanosina-3-monofosfato, uracil, espermidina, 3-glicosil triptofa (Mukherjee et al., 2017); e 16 componentes subexpressos: 3-fosfoglicerato, carnosina, fosfoenolpiruvato, dihidroxiacetona fosfato (Ishikawa et al., 2016); gama-aminobutírico (GABA); fenilalanina, valina (Wei et al., 2011); acetilfenilalanina, carnitina, fitosfingosina (Wang et al., 2014b); glicina, prolina (Lohavanichbutr et al., 2018); ácido L-homocisteico, ubiquinona, ácido neuramínico, valerato de estradiol (Sridharan et al., 2017) e ureia (Ohshima et al., 2017).

A análise metabolômica não direcionada foi aplicada neste estudo, sendo utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), que permite a identificação dos metabólitos através de um banco de dados. As vantagens da espectrometria de massas são a alta sensibilidade e produtividade, permitindo a detecção e identificação de metabólitos. Além disso, a combinação de técnicas de separação como a cromatografia, a qual utilizamos no presente estudo, expande a capacidade da análise de amostras biológicas altamente complexas (Villas-Bôas et al., 2005).

Em nosso estudo foram encontrados 467 metabólitos diferentes nas amostras analisadas. No grupo controle foram encontrados 464 metabólitos, os mesmos encontrados também no grupo CCE, o qual apresentou mais 3 compostos

que não foram expressos no grupo controle. Foi realizada então a análise estatística na qual filtramos para obter os compostos mais significativos para ambos os grupos (Tabela 3).

Após a separação dos componentes no diagrama de Venn, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) e foi aplicado um filtro para os metabólitos que estavam em área de intersecção entre os grupos. Autovalores maiores que 1 foram considerados como o número de componentes principais. Para o presente estudo, o modelo desenvolvido para análise dos grupos I e II, mostrou por meio da tabela de autovalores uma porcentagem de variabilidades. Foi possível então verificar que 10 componentes principais demonstraram valor de variabilidade igual a 72%, sendo que os dois primeiros componentes principais apresentaram uma variabilidade de 36%.

Num primeiro plano fatorial, observou-se que vários valores ficaram em evidente separação entre os metabólitos excretados pelos grupos I e II, no entanto, ainda foi possível observar uma dispersão significativa entre eles quando avaliados intragrupos. Foi então realizada uma nova avaliação, porém, num plano fatorial 2, onde foi possível verificar uma menor dispersão entre pontos intragrupos. No entanto, é possível observar uma maior concentração de pontos do lado direito do gráfico (grupo CCE), e também há alguns valores anômalos ao lado esquerdo do gráfico, o que demonstra uma determinada variabilidade, mesmo que pequena.

A maior separação dos pontos no grupo controle, mostra que esse grupo apresenta alteração na concentração dos metabólitos salivares, o que é inerente frente à variabilidade apresentada por esses indivíduos, seja em função da dieta ou até mesmo do perfil fisiológico de cada um, dados esses diferentes do grupo estudo, onde os pontos no gráfico estão mais próximos, o que indica que há maior semelhança entre os metabólitos salivares relacionados ao câncer bucal.

A base de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) foi utilizada para obter a identificação e os dados dos metabólitos de estudo. Em relação aos biomarcadores para CCE, foram encontrados nas amostras analisadas, com resultados significativos os seguintes compostos: glicina, ácido octanóico e ácido glicólico. Outros compostos considerados biomarcadores para CCE também foram encontrados, apesar de sem significância estatística, os quais são: taurina, leucina, valina, glutamato, ácido láctico e colina. Os compostos expressos apenas no grupo CCE foram: glicina, ácido glioxílico e ácido oxovalérico.

A glicina é um aminoácido simples e não essencial. Um indivíduo adulto ingere em média de 3 a 5 gramas de glicina diariamente. A glicina está envolvida na produção do corpo do DNA, fosfolipídios e colágeno e, na liberação de energia (Human Metabolome Database, 2020). Possui uma ligação biossintética com a serina. Em conjunto, fornecem precursores essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, essenciais para o crescimento das células cancerígenas.

Em estudo relacionado ao metabolismo da glicina e serina no câncer, Amelio e colaboradores em 2014, relataram que a hiperativação da via biossintética da glicina/serina impulsiona a oncogênese e que a captação e o catabolismo de glicina são capazes de promover a carcinogênese. Ainda, a biossíntese de serina modula a capacidade antioxidante celular, implicando na manutenção da homeostase do tumor (Amelio et al., 2014).

Jain e seus colaboradores desenvolveram um estudo com células cancerígenas de linhagens de rápida e lenta proliferação, foi investigado de forma comparativa o efeito da glicina sobre essas linhagens. Foi observado então que nas células cancerígenas da linhagem de rápida proliferação, a glicina foi consumida, enquanto na linhagem de proliferação lenta a glicina foi sintetizada. A partir dos resultados obtidos, foi possível afirmar que a forma como as células

cancerígenas interagem com a glicina pode ser utilizada para selecionar células cancerígenas de rápida proliferação (Jain et al., 2012).

Em um estudo realizado com amostras de saliva, pacientes com estágios mais avançados de CCE mostraram subexpressão de glicina em comparação com pacientes do grupo controle (Lohavanichbutr et al., 2018). Entretanto, na análise de soro sanguíneo realizada por Tiziani e colaboradores, amostras de pacientes em estágio inicial foram comparadas com amostras de pacientes em estágio avançado, nas quais os níveis de glicina se mostraram superexpressos. Segundos os autores, a análise pôde distinguir pacientes com doença de controles e também discriminar os estágios no qual o paciente com CCE se encontrava (Tiziani et al., 2009).

Redução significativa nos níveis de glicina no plasma sanguíneo de pacientes em estágio inicial de câncer de cabeça e pescoço foram relatadas (Ching et al., 1984; Kubota et al., 1992), porém, a subexpressão não foi atribuída à própria doença, mas à disfagia e consequente ingestão alimentar insuficiente.

Alguns trabalhos relacionaram também a glicina ou seus metabólitos e vias associadas, com o processo de carcinogênese (Locasele et al., 2011; Possemato et al., 2011; Zhang et al., 2012) e metástases (Sreekumar et al., 2009).

Outro composto metabólico também expresso no grupo CCE foi o ácido glioxílico ou ácido oxoacético. Este composto orgânico que é um aldeído e também um ácido carboxílico, permite a conversão de ácidos graxos em carboidratos (Human Metabolome Database, 2020). A base conjugada do ácido glioxílico é conhecida como glioxilato (Popov, 2005). Sob certas circunstâncias, o glioxilato pode se comportar como uma nefrotoxina ou metabotoxina, podendo causar danos aos tecidos renais ou efeitos adversos à saúde em níveis cronicamente altos (Milliner, Wilson, 2001; Human Metabolome Database, 2020).

Contrapondo os resultados aqui demonstrados, um estudo utilizando o glioxilato supra-fisiológico como tentativa terapêutica foi descrito. O efeito antiproliferativo do glioxilato foi avaliado através de um estudo *in vitro* com células de carcinoma de cólon (Patra et al., 2018). A realização de ensaio MTT, bem como ensaio de beta-hexosaminidase indicaram que o tratamento com glioxilato inibiu significativamente a proliferação de células HT-29 e HCT-116 (células do câncer de cólon) devido ao estresse oxidativo. Diante dos resultados obtidos, os autores sugeriram que a concentração supra-fisiológica de glioxilato pode ser considerado como uma nova estratégia terapêutica para o câncer de cólon (Patra et al., 2018).

O ácido 3-metil-2-oxovalérico ou ácido oxovalérico, apesar de expresso no grupo CCE, não foi considerado estatisticamente significativo. É um metabólito anormal que surge da decomposição incompleta de aminoácidos de cadeia ramificada. Este cetoácido é considerado uma neurotoxina, acidogênica e metabotoxina, causa danos às células e tecidos nervosos e, induz a acidose, o que gera múltiplos efeitos adversos. Níveis anormalmente elevados, levam à acidose metabólica geral (Human Metabolome Database, 2020).

Não foram encontrados na literatura estudos relacionando o ácido oxovalérico ao CCE ou qualquer outra neoplasia. Encontramos um estudo no qual foi utilizada a análise metabolômica não direcionada utilizando como material de análise plasma sanguíneo, a fim de explorar os metabólitos relacionados à diabetes tipo 2. O ácido oxovalérico, foi um dos compostos metabólicos que apresentaram superexpressão conforme a progressão da doença (Shi, 2018).

Um estudo utilizando GC-MS em amostras de urina, também envolvendo o ácido oxovalérico e patologias distintas do câncer, foi apresentado por Lehnert e colaboradores (Lehnert et al., 1978). Neste estudo, o ácido oxovalérico foi considerado como valor diagnóstico para acidemia propiônica.

Sugerimos então, a partir da propriedade acidogênica presente no ácido oxovalérico, que essa acidose favorece o microambiente tumoral, uma das características da carcinogênese (Hanahan, Weinberg, 2011).

Em relação aos metabólitos que obtiveram valores estatísticos significativos ($p < 0,005$), os quais estão listados na tabela 3, dos 46 metabólitos, 15 pertencem à subclasse dos aminoácidos, 7 são ácidos graxos, 5 carboidratos, 2 piridinas, 2 ácidos benzóicos, 2 diéter cíclico, 3 ácidos carboxílico, 1 alfa hidroxiácido, 1 amina, 1 beta hidroxiácido, 1 cetona, 1 éster de fostato, 1 glicerofosfato, 1 benzeno, 1 ureia e de 3, as vias metabólicas não foram encontradas.

Como mostrado acima, a maioria dos metabólitos significativos pertencem à subclasse dos aminoácidos.

Alterações patológicas são frequentemente acompanhadas de reprogramações metabólicas, incluindo modificações no metabolismo de aminoácidos e proteínas. O processo de carcinogênese, bem como sua progressão, é dependente da presença de aminoácidos. As células cancerígenas aumentam a captação de aminoácidos para obter maior síntese de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e gerar ATP (Hosios et al., 2016; Ananieva, Wilkinson, 2018). As superexpressões de vários aminoácidos podem ser atribuídas então a essas necessidades metabólicas devido à rápida proliferação celular.

Revisão sistemática sobre estudos que utilizou análises metabolômicas não direcionadas para identificação do valor de metabólitos salivares no diagnóstico de câncer, obtiveram o resultado de 140 metabólitos salivares com diferença estatisticamente significativa entre pacientes com câncer e controles. Dentre esses compostos, a grande maioria pertencia à subclasse dos aminoácidos (Assad et al., 2020). Estes metabólitos foram relacionados com diversas vias, dentre elas a via da glicina/serina, mencionada em nosso estudo.

Embora no presente estudo tenha limitações pelo tamanho relativamente pequeno da amostra, haja vista que foi utilizada uma amostra de conveniência, porém, com poder da amostra calculado em 85% ao final da análise estatística, e, portanto, obtivemos resultados relevantes que poderão servir como base para que estudos futuros possam analisar profundas concentrações de cada um dos metabólitos superexpressos no presente estudo. Mais estudos utilizando análise metabolômica são necessários, independentemente do material de amostra, seja tecido, saliva ou sangue.

A avaliação metabolômica pode representar uma janela de oportunidade para o desenvolvimento de medicamentos, identificação de biomarcadores, além de possivelmente fornecer terapia direcionada de acordo com a necessidade de cada indivíduo. O estudo do metaboloma salivar, nesse contexto, é um forte candidato por ser um meio rápido, facilmente acessível e não invasivo, podendo ser útil também durante o acompanhamento de diversas patologias, além de ser um estudo não oneroso, comparado a outras técnicas analíticas.

Compreender a regulação metabólica do câncer é desafiador, mas de extrema necessidade. Para obter novas abordagens diagnósticas precisamos entender a causa de células cancerígenas serem mais dependentes de determinadas vias metabólicas do que de outras. A longo prazo, favorecerá o diagnóstico precoce de neoplasias malignas, bem como a descoberta precoce de eventuais recidivas da doença, contribuindo para a redução da mortalidade relacionada.

6 CONCLUSÃO

A análise metabolômica comparativa de amostras de saliva de pacientes diagnosticados com CCE a de pacientes sem histórico de neoplasias malignas evidenciou 3 metabólitos, glicina, ácido glioxílico e ácido oxovalérico, que têm relação com a carcinogênese, atividade antiprolifertativa e acidogênese do microambiente tumoral expressos no grupo CCE.

Já está bem consolidado na literatura que em processos neoplásicos, há a presença de processos oxidativos, os quais podem sintetizar metabólitos capazes de potencializar complicações dos casos de neoplasias, dentre eles vários aminoácidos, metabólitos esses encontrados no presente estudo.

A presença de hidrocarbonetos assim como de alguns aminoácidos, permite inferir que parte desses metabólitos podem ser provenientes de vias metabólicas de microrganismos encontrados na cavidade bucal.

Apesar das análises de PCA permitir a discriminação do perfil metabólico entre os grupos controle e de pacientes, estudos com uma maior população amostral, e talvez até maior replicação de resultados, são necessários para a identificação de biomarcadores específicos relacionados aos perfis de neoplasias bucais.

REFERÊNCIAS*

- Alves, LAC. Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e sua associação com a doença periodontal [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de odontologia; 2016 [cited 2019 Apr 01]. Available from: <https://bit.ly/3gm3DeT>
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):191-8. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.004. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24657017
- Ananieva EA, Wilkinson AC. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018 Jan;21(1):64-70. doi: 10.1097/MCO.0000000000000430. PMID: 29211698.
- Assad DX, Mascarenhas ECP, de Lima CL, de Toledo IP, Chardin H, Combes A, et al. Salivary metabolites to detect patients with cancer: a systematic review. *Int J Clin Oncol*. 2020 Mar 27. doi: 10.1007/s10147-020-01660-7. Epub ahead of print. PMID: 32221803.
- Backshall A, Sharma R, Clarke SJ, Keun HC. Pharmacometabonomic profiling as a predictor of toxicity in patients with inoperable colorectal cancer treated with capecitabine. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):3019-28. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2474.
- Bandeira CM, de Almeida AA, Carta CFL, Almeida JD, Kaminagakura E. How to improve the early diagnosis of oral cancer? *Braz Dent Sci*. 2017 Oct-Dec;20(4): 25-31. doi: 10.14295/bds.2017.v20i4.1439.
- Beger RD. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*. 2013 Jul 5;3(3):552-74. doi: 10.3390/metabo3030552.
- Bessonneau V, Pawliszyn J, Rappaport SM. The Saliva Exposome for Monitoring of Individual Health Trajectories. *Environ Health Perspect*. 2017 Jul 20;125(7):077014. doi: 10.1289/EHP1011.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bigler LR, Streckfus CF, Copeland L, Burns R, Dai X, Kuhn M, et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002 Aug;31(7):421-31.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988 Jun 1;48(11):3282-7.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85-95. doi: 10.1038/nrc2981. PMID: 21258394.

Chen X, Yu D. Metabolomics study of oral cancers. *Metabolomics*. 2019 Feb 8;15(2):22. doi: 10.1007/s11306-019-1483-8

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007 Aug;383(1-2):30-40.

Ching N, Grossi C, Jham G, Angers J, Zurawinsky H, Ching CY, et al. Plasma amino acid and serum unesterified fatty acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment. *Surgery*. 1984 Jun;95(6):730-8. PMID: 6427962.

Fagerström K. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerström Test for Cigarette Dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012;14(1):75-8.

Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002 Jan;48(1-2):155-71. PMID: 11860207.

Gardner A, Carpenter G, So PW. Salivary Metabolomics: From Diagnostic Biomarker Discovery to Investigating Biological Function. *Metabolites*. 2020 Jan 26;10(2):47. doi: 10.3390/metabo10020047. PMID: 31991929.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230

Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, et al. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*. 2016 Mar 7;36(5):540-9. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.012. PMID: 26954548.

- Hu S, Gao K, Pollard R, Arellano-Garcia M, Zhou H, Zhang L, et al. Preclinical validation of salivary biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Nov;62(11):1633-8. doi: 10.1002/acr.20289.
- Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162–9.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) [Internet]. Rio de Janeiro (Rio de Janeiro): Ministério da saúde [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.inca.gov.br/>
- Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, Sugano A, Nakamura M, Kaneko M, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31520. doi: 10.1038/srep31520. PMID: 27539254.
- Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*. 2012 May 25;336(6084):1040-4. doi: 10.1126/science.1218595. PMID: 22628656.
- Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med*. 2013 Oct 4;45(10):e45. doi: 10.1038/emm.2013.85. PMID: 24091747.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):43-66.
- Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(40):4771-8. doi:10.2174/1381612825666190215121712. PMID:30767733.
- Kubota A, Meguid MM, Hitch DC. Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors. *Cancer*. 1992 May 1;69(9):2343-8. doi: 10.1002/1097-0142(19920501)69:9<2343::aid-cnrcr2820690924>3.0.co;2-s. PMID: 1562982.
- Lang J, Gao L, Guo Y, Zhao C, Zhang C. Comprehensive treatment of squamous cell cancer of head and neck: Chinese expert consensus 2013. *Future Oncol*. 2014 Mar 17;10(9):1635-48. doi: 10.2217/fon.14.44.

Lau C, Kim Y, Chia D, Spielmann N, Eibl G, Elashoff D, et al. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26888-97. doi: 10.1074/jbc.M113.452458.

Lehnert W, Schuchmann L, Urbánek R, Niederhoff H, Böhm N. Excretion of 2-methyl-3-oxovaleric acid in propionic acidemia. *Eur J Pediatr.* 1978 Jul 3;128(3):197-205. doi: 10.1007/bf00444305. PMID: 668727.

Lindon JC, Nicholson JK. The emergent role of metabolic phenotyping in dynamic patient stratification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014 Jul;10(7):915-9. doi: 10.1517/17425255.2014.922954.

Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol.* 2012 Jul;48(7):569-77. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.01.021.

Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet.* 2011 Jul 31;43(9):869-74. doi: 10.1038/ng.890. PMID: 21804546.

Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, et al. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One.* 2018 Sep 20;13(9):e0204249. doi: 10.1371/journal.pone.0204249. PMID: 30235319.

Mandel ID, Kutscher A, Denning CR, Thompson RH, Zegarelli EV. Salivary studies in cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1967 Apr;113(4):431-8.

Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 Feb;43:34-40. doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.

Mikkonen JJ, Singh SP, Herrala M, Lappalainen R, Myllymaa S, Kullaa AM. Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 2016 Aug;51(4):431-7. doi: 10.1111/jre.12327.

Mikkonen JJW, Herrala M, Soininen P, Lappalainen R, Tjäderhane L, Seitsalo H, et al. Metabolic profiling of saliva in patients with primary Sjögren's syndrome. *Metabolomics.* 2013;3:128.

Milliner DS, Wilson DM, Smith LH. Phenotypic expression of primary hyperoxaluria: comparative features of types I and II. *Kidney Int.* 2001 Jan;59(1):31-6. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00462.x. PMID: 11135054.

Mukherjee PK, Funchain P, Retuerto M, Jurevic RJ, Fowler N, Burkey B et al., Metabolomic analysis identifies differentially produced oral metabolites, including the oncometabolite 2-hydroxyglutarate, in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BBA Clin.* 2016 Dec 18;7:8-15. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.12.001. PMID: 28053877.

Nicholson J K, Lindon JC. Systems biology: metabonomics. *Nature.* 2008; 455(7216):1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>.

Ohshima M, Sugahara K, Kasahara K, Katakura A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2017 May;37(5):2727-34. doi: 10.3892/or.2017.5561. PMID: 28393236.

Patra T, Ghosh P, Alam N, Murmu N. Supra-physiological concentration of glyoxylate inhibits proliferation of human colon cancer cells through oxidative stress. *Life Sci.* 2018 Aug 15;207:80-89. doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.047. PMID: 29852189.

Popov VN, Moskalev EA, Shevchenko MIu, Eprintsev AT. Comparative analysis of the glyoxylate cycle clue enzyme isocitrate lyases from organisms of different systemic groups. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 2005 Nov-Dec;41(6):507-13. Russian. PMID: 16396466.

Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K et al., Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature.* 2011 Aug 18;476(7360):346-50. doi: 10.1038/nature10350. PMID: 21760589.

Rai V, Mukherjee R, Ghosh AK, Routray A, Chakraborty C. “Omics” in oral cancer: new approaches for biomarker discovery. *Arch Oral Biol.* 2018 Mar;87:15-34. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.003.

Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell.* 2011 Sep 13;20(3):370-83. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.010.

Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012 Nov 15;491(7424):364-73. doi: 10.1038/nature11706. Erratum in: *Nature*. 2013 Feb 7;494(7435):130. PMID: 23151579.

Shin JM, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Metabolomics of Head and Neck Cancer: A Mini-Review. *Front Physiol*. 2016 Nov 8;7:526.

Shi L, Brunius C, Lehtonen M, Auriola S, Bergdahl IA, Rolandsson O et al., Plasma metabolites associated with type 2 diabetes in a Swedish population: a case-control study nested in a prospective cohort. *Diabetologia*. 2018 Apr;61(4):849-861. doi: 10.1007/s00125-017-4521-y. PMID: 29349498.

Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(2):431–40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059> PMID: 19147747.

Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J et al., Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. 2009 Feb 12;457(7231):910-4. doi: 10.1038/nature07762. Erratum in: *Nature*. 2013 Jul 25;499(7459):504. PMID: 19212411.

Sridharan G, Ramani P, Patankar S. Serum metabolomics in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2017 Jul-Sep;13(3):556-561. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_1233_16. PMID: 28862226.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Version 2. *Metabolomics*. 2010 Mar;6(1):78-95. doi: 10.1007/s11306-009-0178-y. Epub 2009 Sep 10. PMID: 20300169.

Tan Y, Yin P, Tang L, Xing W, Huang Q, Cao D, et al. Metabolomics study of stepwise hepatocarcinogenesis from the model rats to patients: potential biomarkers effective for small hepatocellular carcinoma diagnosis. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Feb;11(2):M111.010694. doi: 10.1074/mcp.M111.010694.

The Human Metabolome Data Base version 4.0 [Internet]. [cited 2020 Apr 01]. Available from: <https://hmdb.ca/>

Tiziani S, Lopes V, Günther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using ¹H NMR-based metabolomics. *Neoplasia*. 2009 Mar;11(3):269-76. doi: 10.1593/neo.81396. PMID: 19242608.

Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2005 Sep-Oct;24(5):613-46. doi: 10.1002/mas.20032. PMID: 15389842.

Wagner PD, Srivastava S. New paradigms in translational science research in cancer biomarkers. *Transl Res*. 2012 Apr;159(4):343-53. doi: 10.1016/j.trsl.2012.01.015. PMID: 22424436.

Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2014a Jan 1;427:79-85. doi: 10.1016/j.cca.2013.10.004.

Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep*. 2014b Oct 30;4:6802. doi: 10.1038/srep06802. PMID: 25354816.

Washio J, Takahashi N. Metabolomic Studies of Oral Biofilm, Oral Cancer, and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 2;17(6). pii: E870.

Weaver Z, Difilippantonio S, Carretero J, Martin PL, El Meskini R, Iacovelli AJ, et al. Temporal molecular and biological assessment of na erlotinib-resistant lung adenocarcinoma: model reveals markers of tumor progression and treatment response. *Cancer Res*. 2012. Nov 15;72(22):5921-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0736.

Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, Chen T, Su M, Zhao A, Jia W. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer*. 2011 Nov 1;129(9):2207-17.

Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DTW. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Feb;11(2):M111.012112. doi: 10.1074/mcp.M111.012112.

Ye G, Zhu B, Yao Z, Yin P, Lu X, Kong H, et al. Analysis of urinary metabolic signatures of early hepatocellular carcinoma recur

rence aftersurgical removal using gas chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012 Aug 3;11(8):4361-72. doi: 10.1021/pr300502v.

Ye G, Liu Y, Yin P, Zeng Z, Huang Q, Kong H, et al. Study of induction chemotherapy efficacy in oral squamous cell carcinoma using pseudo targeted metabolomics. *J Proteome Res.* 2014 Apr 4;13(4):1994-2004. doi:10.1021/pr4011298.

Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012 Nov;168(6):1718-27.

Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB, et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Oct;69(19):3341-50. doi: 10.1007/s00018-012-1027-0.

Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell.* 2012 Jan 20;148(1-2):259-72. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.050. PMID: 22225612.

Zhao YY. Metabolomics is chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2013 Jun 25;422:59-69. doi: 10.1016/j.cca.2013.03.033.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a)

Eu, JANETE DIAS ALMEIDA, Professora Titular da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do registro no Conselho Regional de Odontologia CROSP 40.530, telefone para contato (12) 3947 9078, irei coordenar um projeto de pesquisa cujo título é “ANÁLISE DO METABOLOMA E MICROBIOMA SALIVAR DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER BUCAL”. O projeto será desenvolvido pelas pesquisadoras: Cirurgiãs Dentistas Mariana de Sá Alves CROSP 130.004 e Nayara de Sá Rodrigues CROSP 120.220. O objetivo é realizar uma pesquisa sobre câncer bucal e a relação com os microrganismos e metabólitos salivares. Estudos no mundo todo, inclusive no Brasil, estão sendo realizados com o objetivo de se estudar as amostras salivares para identificar possíveis biomarcadores para auxiliar no diagnóstico precoce do câncer bucal, a fim de melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos pacientes. Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que tem a finalidade de estudar as características genéticas e biológicas do câncer bucal e compará-las com pessoas sem este tipo de câncer. Pode ser que você não seja diretamente beneficiado, mas futuros pacientes poderão ter algum tipo de benefício com o estudo. Sua participação neste projeto é totalmente voluntária, não existindo nenhum tipo de compensação, privilégio ou benefício. Caso você não aceite participar também não existe nenhum tipo de sanção ou prejuízo à sua avaliação e tratamento, sendo que você será acompanhado da mesma forma. Não existe

nenhum tipo de remuneração, exceto, alguma cobertura de custo com alimentação ou transporte caso você seja procurado durante a pesquisa para algum tipo de esclarecimento e precise vir até nós. Você poderá contatar os pesquisadores através de telefone de nossa faculdade para esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca da pesquisa. Caso você aceite participar da pesquisa, você responderá a um questionário, com algumas perguntas sobre o uso de cigarro e de bebidas alcoólicas, alimentação, atividade profissional, hábitos sociais. Tais informações são CONFIDENCIAIS, e o sigilo absoluto está garantido.

Para o estudo, será necessário coletar cerca de 3,0 mL de saliva que você irá cuspir em um pote de plástico, para os pacientes com diagnóstico de câncer bucal e também para os pacientes sem diagnóstico de câncer bucal (grupo de pacientes controle). Para os pacientes com diagnóstico de câncer bucal, além da coleta da saliva será realizada também um raspado de células do interior da sua boca, que será feita com uma escova e um fragmento de 0,5 cm do tumor que será retirado durante o procedimento cirúrgico para diagnóstico e/ou tratamento. Pacientes sem lesão bucal serão convidados a participar para que as suas amostras salivares servirão de comparação com pacientes com câncer de boca. O material será adequadamente armazenado para ser utilizado posteriormente. Não existe risco de contaminação, uma vez que o material utilizado para coleta de saliva é descartável e o material utilizado nos procedimentos cirúrgicos é esterilizado. Em decorrência do procedimento cirúrgico, que poderá ser uma biópsia ou mesmo o tratamento você poderá sentir um pouco de dor, ter ferimento na boca semelhante a uma afta, irritação no local, infecção, ou ainda sangramento. Tais sintomas são os próprios sintomas decorrentes do procedimento, não havendo um agravamento pela participação no estudo. Você sairá do procedimento com receita e orientação para dor ou sangramento. Caso haja algum problema maior, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, e os mesmos o atenderão rapidamente para a resolução do problema. Na grande maioria das vezes isto não lhe trará nenhum

prejuízo, pois não são complicações graves e nem vão alterar o seu tratamento. O material coletado será analisado nos laboratórios de Patologia Bucal, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia, ICT-UNESP, assim como no Laboratório Dempster de espectrometria de massas da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, USP. O material será armazenado em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Além disso, alguns materiais serão armazenados em blocos de parafina e ficará guardado por muitos anos, e poderá ser utilizado em outras pesquisas do mesmo tipo. Em nenhum momento da pesquisa será realizado algum tipo de manipulação genética ou modificação do DNA. Sua participação é voluntária e poderá trazer benefícios diretos para os estudos do impacto do tratamento do câncer, do tabagismo, etilismo ou outros fatores relacionados à doença. As informações obtidas serão analisadas sem que seu nome apareça. O Sr (a) tem o direito de ser informado acerca dos resultados finais ou parciais. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética do desenvolvimento do projeto, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética (CEP) do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, situado na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, São José dos Campos-SP, telefone (12) 39479028, e-mail cep@fosjc.unesp.br e comunicar-se com a Coordenadora Profa. Dra. DENISE NICODEMO. Informo ainda, que está garantida a sua liberdade de retirada do consentimento e de participação a qualquer momento. Também não haverá custo nem pagamento pela sua participação voluntária.

Eu, portador do RG de _____ número declaro que, o pesquisador _____ me convidou a participar dessa pesquisa, tendo me explicado detalhadamente a finalidade, e lido comigo este termo de consentimento. Minhas dúvidas foram esclarecidas.

Autorizo a utilização das informações que serão por mim fornecidas ao responder os questionamentos e dos resultados obtidos. Declaro conhecer o que será feito, que foi garantida a confidencialidade e o acesso permanente aos esclarecimentos, e que minha participação não implicará em nenhum custo. Sendo assim, ACEITO participar. Caso seja de minha vontade posso desistir a qualquer hora sem que haja nenhum prejuízo ao meu tratamento.

Assinatura do paciente _____

Assinatura do Pesquisador _____

São José dos Campos, ____ de _____ de 20__.

APÊNDICE B – Ficha de coleta de dados sobre o estudo

Parte I – Identificação e questões relacionadas à frequência e quantidade consumida de cigarros e bebidas alcoólicas

Nome:	
Sexo:	Cor:
Idade:	Data Nasc:
Residência:	
Bairro:	Cidade:
Estado:	Fone:
Profissão:	
Você fuma?	
Se fuma, qual o tipo?	
Há quanto tempo?	
Qual a frequência do seu consumo de cigarros?	
Quantos cigarros/dia?	
Caso ex-fumante, parou há quanto tempo?	
Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?	
Sim	Não
Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?	
Diário (>1x/dia)	Diário (1 x ao dia)
1 a 3 vezes por semana	Mensal
Que tipo de bebida você consome quando bebe?	
Cerveja	Uísque
Batida	Vinho
Caipirinha	Outras
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
1 a 2	10 ou mais
3 a 4	Cerveja 350 ml
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
5 a 6	Vinho 120 ml
7 a 9	Destilado (<i>whisky</i> , <i>vodca</i> , <i>pinga</i>) 36 ml
Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?	
Sim	Não
Quando você bebe, consome mais cigarro?	

Sim	Não
Quanto a mais você consome?	
Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas?	
Sim	Não
Quais?	
Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?	
Diário (>1x/dia)	1 a 3 vezes por semana
Diário (1 x ao dia)	Mensal
Faz uso de algum medicamento?	
Sim	Não
Qual(is)?	

Fonte: Bandeira, 2018.

Exame clínico:

1) Extra-bucal:

2) Intra-bucal:

Parte II - Estadiamento (TNM) e tratamento oncológico

Neoplasia de cavidade bucal		
Sítio primário (epicentro da lesão)	Palato duro	
	Soalho	
	Soalho Língua	Direito
		Esquerdo
		Anterior
	Língua	Ventre
		Dorso
		Bordo D
		Bordo E
	Gengiva	Superior
		Inferior
		Direita
		Esquerda
	Área retromolar D	
	Jugal D	
	Jugal E	
	Retromolar E	
Tratamento	Cirúrgico Exclusivo	
	Radioterápico Exclusivo	
	Quimioterápico Exclusivo	
	Cirurgia + Radioterapia Complementar	
	Cirurgia + Radioterapia E Quimioterapia Complementar	
	- Radioterapia + quimioterapia - Dose Radioterapia - Quimioterápicos utilizados - Protocolo Utilizado	
Estadiamento	TNM pré-operatório	
	TNM pós-operatório - Achados patológicos:	
	Margem livre X comprometida	
	Linfonodos livres X comprometidos	
	Extravasamento extra capsular	
	Estágio Clínico	

Fonte: Bandeira, 2018.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (1)

“Estudo genético dos principais fatores de risco no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal”

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42387315.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.033.312

Data da Relatoria: 17/04/2015

Apresentação do Projeto:

O trabalho ora apresentado pretende realizar estudos direcionados ao conhecimento genético individual na tentativa de novas classificações das diversas apresentações das neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Estudos de genotipagem, metilação e expressão gênica tem sido o direcionamento dos atuais estudos, em conjunto com o conhecimento dos efeitos do tabaco e do perfil tabágico, juntamente com outros fatores como uso abusivo de álcool dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, podem direcionar a uma melhor compreensão do problema resultando a promoção de tratamentos mais eficazes, menos invasivos e principalmente mais eficientes.

Cumpriu todas as etapas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar a metilação dos genes supressores de tumor, expressão gênica relacionados ao metabolismo do tabaco, análise da ploidia do DNA, análise da saliva e de células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) intra-bucal em busca de correlação clinicopatológica entre tabagismo e o prognóstico da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O benefício para o participante do estudo é indireto, existindo o benefício relevante de participar

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF: 09218849824	Nome: JANETE DIAS ALMEIDA
Telefone: (12) 3947-9078	E-mail: janete@fosjc.unesp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 48.031.918/0014-49	Nome da Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF	Nome
291.777.128-38	Celina Faig Lima Carta

Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
75335247649	ADRIANA ÁVILA DE ALMEIDA
29177712838	Celina Faig Lima Carta
62817795687	CELSO MULLER BANDEIRA
00442145373	Monica Ghislaine Oliveira Alves

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Outros

Título Público da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Contato Público

CPF	Nome	Telefone	E-mail
09218849824	JANETE DIAS ALMEIDA	(12) 3947-9078	janete@fosjc.unesp.br

Contato Celina Faig Lima Carta

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

correspondentes a avaliação prospectiva (amostras salivares), o voluntário terá o desconforto de ser submetido a um exame clínico intra e extrabucal e deverá depositar (cuspir) a saliva em um recipiente estéril, conforme instruções do pesquisador. A coleta da saliva não oferece riscos físicos, químicos ou biológicos ao paciente, pois não se trata de um procedimento invasivo, mas conforme mencionado anteriormente, poderá gerar algum

constrangimento. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a estar em ambiente privado (consultório) para a realização da coleta e ainda, a resguardar a confidencialidade dos dados obtidos.

Benefícios:

Identificar fatores prognósticos e possíveis biomarcadores, bem como auxiliar para o melhor entendimento da relação entre os metabólitos e a microbiota na carcinogênese bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa com 120 amostras de alíquotas de RNA e material salivar, parte já coletada e armazenada em nossa instituição, e parte a ser coletada de pacientes do ambulatório de propedêutica do ICT/UNESP São José dos Campos e da Universidade de Santiago de Compostela. Material já coletado com TCLE aprovado em nossa Instituição e material externo aprovado pelo Comitê de ética da Universidade de Santiago de Compostela.

A proposta da pesquisa é clara, com objetivo definido e com parceria internacional de qualidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos anexados estão em conformidade com as exigências da Plataforma Brasil.

TCLE, claro, conciso e adequado.

Cronograma bem programado

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://plataforma.brasil.br>

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (2)

“Tabagismo e sua interrelação com leucoplasia e carcinoma de células escamosas bucal: análise metabolômica e citomorfogenética”

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TABAGISMO E SUA INTERRELAÇÃO COM LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: ANÁLISE METABOLÔMICA E

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13282819.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.334.281

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem como proposição avaliar a expressão gênica e proteica de componentes da via de sinalização WNT e de DNA

metiltransferases (DNMTs) e, bem como o Metaboloma e Microbioma salivar, em casos de leucoplasia e carcinoma de células escamosas (CCE)

buciais. Para a análise de expressão dos genes WNT1, WNT5A, APC, CTNNB1, CCDN1, MYC, WIF1, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, por meio de

RTq-PCR

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo

A presente proposta contempla a expressão gênica e protéica de integrantes das vias DNMTs e Wnt, o Metaboloma e Microbioma salivar que possam estar presentes no CCE e leucoplasia, afim de correlacioná-los ao perfil tabágico, etílico, sócio-demográfico e clínico dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para as amostras correspondentes a avaliação retrospectiva (alíquotas de RNA), os riscos são mínimos, sendo relativos a perda de confidencialidade das informações. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a manter os dados em sigilo e segurança. Para as amostras

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

correspondentes a avaliação prospectiva (amostras salivares), o voluntário terá o desconforto de ser submetido a um exame clínico intra e extrabucal e deverá depositar (cuspir) a saliva em um recipiente estéril, conforme instruções do pesquisador. A coleta da saliva não oferece riscos físicos, químicos ou biológicos ao paciente, pois não se trata de um procedimento invasivo, mas conforme mencionado anteriormente, poderá gerar algum

constrangimento. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a estar em ambiente privado (consultório) para a realização da coleta e ainda, a resguardar a confidencialidade dos dados obtidos.

Benefícios:

Identificar fatores prognósticos e possíveis biomarcadores, bem como auxiliar para o melhor entendimento da relação entre os metabólitos e a microbiota na carcinogênese bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa com 120 amostras de alíquotas de RNA e material salivar, parte já coletada e armazenada em nossa instituição, e parte a ser coletada de pacientes do ambulatório de propedêutica do ICT/UNESP São José dos Campos e da Universidade de Santiago de Compostela. Material já coletado com TCLE aprovado em nossa Instituição e material externo aprovado pelo Comitê de ética da Universidade de Santiago de Compostela.

A proposta da pesquisa é clara, com objetivo definido e com parceria internacional de qualidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos anexados estão em conformidade com as exigências da Plataforma Brasil.

TCLE, claro, conciso e adequado.

Cronograma bem programado

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://plataforma.brasil.br>

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

//www2.ict.unesp.br/ – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1350479.pdf	07/05/2019 19:21:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/05/2019 19:13:32	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/05/2019 19:07:55	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Dispensa.pdf	06/05/2019 18:31:53	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/05/2019 18:30:28	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	06/05/2019 18:07:39	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_colaboracao.pdf	06/05/2019 17:56:04	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Maio de 2019

**Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br