**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

LUIS FABIANO SOARES SMARRA

**Análise do perfil metabólico e epidemiológico de portadores de
carcinoma epidermoide de cavidade oral**

**Analysis of the metabolic and epidemiological profile of patients
with squamous cell carcinoma of the oral cavity**

**São Paulo
2018**

LUIS FABIANO SOARES SMARRA

Análise do perfil metabólico e epidemiológico de portadores de carcinoma epidermoide de cavidade oral

Analysis of the metabolic and epidemiological profile of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Concentração Biologia/Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva

Co-orientadora: Dr^a Rossana Verónica Mendoza López

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Smarra, Luís Fabiano Soares.

Análise do perfil metabólico e epidemiológico de pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. câncer de cavidade oral 2. metaboloma 3. epidemiologia

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

LUIS FABIANO SOARES SMARRA

**Análise do perfil metabólico e epidemiológico de portadores de
carcinoma epidermoide de cavidade oral**

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Presidente e Orientador

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

São Paulo, ___/___/___.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Eloiza Helena Tajara pela oportunidade da realização deste trabalho, paciência e confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Dr^a Rosana López pela ajuda com os estudos em epidemiologia e pelos cálculos estatísticos.

Aos amigos do Laboratório Tiago, Carolina, Bianca e Ariane, pela companhia e por toda a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Giovana, colega de laboratório que muito gentilmente me ajudou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr^o Fábio pelos testes de ressonância magnética nuclear (RMN) no laboratório multiusuário da UNESP/IBILCE.

Aos voluntários e pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral por aceitar participar deste trabalho.

Aos meus pais Emmanuel e Silvia pelo incentivo de sempre me fazer procurar pelo conhecimento e aprender cada dia mais.

Aos meus irmãos André, Daniel e Adriana (*in memoriam*), por sempre cuidarem de mim e me acompanharem em todos os momentos da minha vida.

À minha esposa Rebeca pelo companheirismo, incentivo e carinho nos momentos em que estive ausente.

Aos meus cunhados Carolina e Silvio pelo apoio e ajuda neste trabalho.

Aos coordenadores e funcionários do programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências da USP.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

Resumo

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO) é um dos tumores mais comuns em câncer de cabeça e pescoço, com aproximadamente 300.000 novos casos e 145.000 mortes em todo o mundo. Apesar da intensa pesquisa e dos avanços recentes no diagnóstico e terapia, a taxa de sobrevivência dos pacientes ainda é baixa. Os estudos da metabolômica levaram a uma melhor compreensão do metabolismo do câncer, no seu desenvolvimento e progressão. Essas descobertas possibilitaram a identificação de biomarcadores metabólicos que podem auxiliar na identificação de doenças e tratamentos. O presente estudo buscou três objetivos: (1) Identificar e quantificar os metabólitos plasmáticos em portadores de CECO e em controles, utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN); (2) Comparar a concentração plasmática de metabólitos de pacientes com CECO com a de seus controles estratificados por variáveis clínicas, patológicas, sociodemográficas e características de estilo de vida; (3) Avaliar se as concentrações de metabólitos estão relacionadas com a presença da doença (CECO), ajustadas pelas variáveis epidemiológicas e características de estilo de vida. Para a análise dos metabólitos, amostras de plasma sanguíneo de 47 casos e de 49 controles foram identificadas, quantificadas e comparadas com variáveis clínicas, patológicas, sociodemográficas e características de estilo de vida por meio de análises estatísticas. Os resultados mostram que todos os indivíduos portadores de CECO estiveram expostos em algum momento da vida aos fatores de risco (álcool, tabaco e má higiene bucal). Além disso, as variáveis mostraram interferir na concentração dos metabólitos, estes que apresentaram-se alterados, principalmente os que possuem relação com as vias metabólicas de obtenção de energia, sugerindo que o metabolismo de pacientes com CECO difere dos indivíduos sem a doença (controles).

Palavras-chave: câncer de cavidade oral, metabólitos, epidemiologia.

Abstract

Squamous cell carcinoma of the oral cavity (SCCOC) is one of the most common tumors in head and neck cancer, with approximately 300,000 new cases and 145,000 deaths worldwide each year. Despite intense research and recent advances in diagnosis and therapy, the patient's survival rate is still low. Metabolism studies have led to a better understanding of the metabolism of cancer in its development and progression. These findings allowed the identification of metabolic biomarkers that may aid to identify diseases and treatments. This current study aimed at three objectives: (1) To identify and quantify plasma metabolites in SCCOC patients and controls using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques; (2) To compare plasma concentration of metabolites of patients with SCCOC and its stratified controls by clinical, pathological, sociodemographics, and lifestyle characteristics; (3) To evaluate whether the metabolic concentrations are related to the presence of SCCOC, adjusted by epidemiological variables and lifestyle characteristics. In order to analyze the metabolites, blood plasma samples from 47 cases and 49 controls were identified, quantified and compared with clinical, pathological, sociodemographic, and lifestyle variables by means of statistical analysis. The results show that all subjects with SCCOC were exposed eventually to risk factors (alcohol consumption, smoking and bad oral hygiene). Furthermore, the variables showed to interfere in the concentration of metabolites, which have been altered, especially those that are related to metabolic pathways of obtaining energy, suggesting that the metabolism of patients with SCCOC differs from the individuals without the disease (controls).

Key words: oral cavity cancer, metabolites, epidemiology.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Aspectos Gerais	1
1.2. Reprogramação metabólica: Métodos de estudo	3
1.3. Efeito de Warburg	5
1.4. Carcinoma de cabeça e pescoço. Aspectos epidemiológicos.....	8
1.5. Caracterização genômica e metabolômica do câncer de cabeça e pescoço e outras ômicas	9
Metabolismo e microambiente oral	11
2. Objetivos.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
Materiais	14
3.1. Critérios de inclusão dos casos	14
3.2. Critérios de inclusão de controles	14
3.3. Questionário sobre hábitos de vida.....	15
3.4. Formulário de dados clinicopatológicos	16
3.5. Aspectos éticos	17
Métodos.....	17
3.6. Processamento de amostras biológicas.....	17
3.7. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	17
3.8. Identificação e quantificação dos espectros	18
3.9. Análise estatística	18
4. Resultados	20
5. Discussão	46
6. Conclusões	51
7. Referências	52
8. Apêndices.....	I

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças cujo fator comum é o crescimento desordenado de células, o que permite a invasão de tecidos saudáveis adjacentes e outras regiões do organismo. Dividindo-se rapidamente, estas células promovem a formação de tumores ou neoplasias malignas. Neoplasias benignas, por outro lado, são massas localizadas de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente comprometendo a vida de seu portador (Ministério da Saúde, 2017).

As causas do câncer são múltiplas, podendo ser internas ou externas ao organismo, ou ambas. Muitas das causas externas estão relacionadas a hábitos de vida, enquanto as causas internas estão relacionadas a fatores genéticos (Ministério da Saúde, 2017).

Para a melhor compreensão da progressão tumoral, Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2000) propuseram há mais de uma década um conjunto de seis *hallmarks* ou características adquiridas durante o desenvolvimento do câncer que estão presentes na maioria ou talvez em todos os tipos de tumores: auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a supressores de crescimento, resistência à morte celular, capacidade ilimitada do potencial replicativo, angiogênese sustentada, invasão e metástase (Figura 1). Esta proposta foi uma tentativa de organizar e minimizar a complexidade da doença neoplásica e das propriedades adquiridas pelas células durante o processo de múltiplas etapas da tumorigênese.

Em uma revisão posterior, Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2011) acrescentaram duas novas características: evasão ao ataque imunológico e capacidade de reprogramar o metabolismo celular para suportar de modo eficiente a proliferação. Além dessas, os autores colocaram duas outras características que facilitam a aquisição dos *hallmarks* principais: instabilidade genômica, que gera diversidade genética, e inflamação, que promove as demais características (Figura 2).

Figura 01. Ilustração original das seis características principais da célula tumoral segundo Hanahan e Weinberg (2000): auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a supressores de crescimento, resistência à morte celular, capacidade ilimitada do potencial replicativo, angiogênese sustentada, invasão e metástase..

Figura 02. Ilustração original das novas características da célula tumoral propostas na revisão de Hanahan e Weinberg (2011).

1.2. Reprogramação metabólica: Métodos de estudo

O progresso no estudo do genoma do câncer que ocorreu nos últimos anos tem sido acompanhado pelo aumento do conhecimento sobre o transcriptoma, permitindo centenas de oportunidades para o desenvolvimento de diferentes tratamentos, embora nem todos com o sucesso inicialmente esperado. Muitos dados já foram obtidos e importantes questões têm sido respondidas em relação à estrutura do gene e sua expressão, revelando novos controles de transcrição e redes de sinalização intrincadas. O estudo do proteoma tem acrescentado informação a este cenário complexo e, em muitos aspectos, tem contribuído para a compreensão da fisiologia normal e patológica (Kim et al., 2014). (Figura 03)

Figura 03. Figura esquemática exemplificando o estudo das ômicas.

Embora as proteínas sejam geralmente consideradas os efetores celulares finais, os metabólitos têm se mostrado como os verdadeiros mediadores capazes de interagir e colaborar com outras moléculas para gerar respostas aos estímulos normais e patológicos e, assim, participar da regulação da atividade celular e afetar a função e o fenótipo (Dunn et al., 2011).

O conjunto de metabólitos em um sistema biológico, definido como metaboloma, muda continuamente em tecidos e fluidos, desde o tipo encontrado até a sua concentração relativa. Estas variações dependem de diversos parâmetros, tais

como sexo, idade, fatores nutricionais, estilo de vida, microbioma e doença (Meurman, 2010; Psychogios et al., 2011).

O estudo do metaboloma tem progredido recentemente com a introdução de espectrometria de massas de alta resolução, cromatografia, espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) multidimensional e estratégias utilizando isótopos radioativos, além de programas computacionais sofisticados. A espectrometria de massas é uma das plataformas mais utilizadas por causa de sua sensibilidade. A espectroscopia por RMN, por outro lado, possui capacidade para detectar, quantificar e caracterizar metabólitos em diferentes tipos de amostras, com a limitação de ter baixa sensibilidade e resolução espectral (Eghbalnia *et al.*, 2017; Kamphorst e Lewis, 2017).

O controle de qualidade dos experimentos é necessário para assegurar que os dados sejam capturados de modo reprodutível e gerem resultados significativos. No caso da RMN, o controle de qualidade analítica pode ser obtido pelo uso de um padrão de *chemical shift* como o 4,4-dimetil-4-silapentane-1-ácido sulfônico (DSS) ou o 3-(trimetilsilil) ácido propiônico (TSP) e um padrão de pH como o imidazole (Beger, 2013).

A RMN analisa as propriedades magnéticas dos núcleos atômicos fornecendo informações para a determinação das estruturas dos compostos, ou ainda, para identificação de moléculas presentes em uma amostra biológica (Beckonert et al., 2007; Smolinska et al., 2012).

As amostras biológicas para os testes de RMN podem ser distintas, sendo possível obter dados de urina, plasma, saliva, tecidos e soro (Wishart et al., 2016). Recentemente, Dunn e colaboradores (Dunn et al., 2015) analisaram o metaboloma do soro de 1.200 adultos sem diagnóstico de doença, utilizando diferentes plataformas. Os resultados constituem um conjunto de dados de referência, que têm sido enriquecidos com os dados de outros importantes estudos (Psychogios et al., 2011; Cheng et al., 2012; Yu et al., 2012).

Com os estudos do metaboloma do câncer, surgiu o termo “oncometabólitos”, que são metabólitos endógenos capazes de sustentar o crescimento tumoral e a metastáse. Alguns oncometabólitos são associados a um ou a alguns tipos de câncer, e têm potencial para serem biomarcadores tumorais. Por exemplo, 2-hidroxiglutarato em gliomas (Ward et al., 2010), isoleucina, fosfocolina, treonina,

glutamato, histidina, acetoacetato, glicerol, manose, fenilalanina e piruvato em câncer de mama (Mimmi et al., 2013; Wei et al., 2013; Jobard et al., 2014) e taurina, lactato, colina, fenilalanina, isoglutamina, tirosina em câncer colorretal (Jiménez et al., 2013; Tan et al., 2013).

1.3. Efeito de Warburg

As células neoplásicas possuem o seu metabolismo biossintético e bioenergético alterado em relação às células saudáveis e isto ocorre devido às necessidades proliferativas destas células. A alteração metabólica mais importante e bem descrita na literatura está relacionada ao consumo de glicose (Vander Heiden *et al.*, 2009; Cairns *et al.*, 2011; Koppenol *et al.*, 2011; Vander Heiden, 2011).

No início do século passado, Otto Warburg observou que muitas células neoplásicas, ao contrário das células normais, metabolizavam a glicose preferencialmente pela glicólise aeróbica, obtendo como subproduto o lactato (Figura 04). Este fato ocorria independentemente da disponibilidade de oxigênio, ao contrário das células saudáveis que metabolizavam a glicose preferencialmente pela fosforilação oxidativa. O fenômeno foi chamado posteriormente de “Efeito Warburg” (Vander Heiden *et al.*, 2009).

Figura 04. Ilustração original da glicólise de tecido normal e tumoral descritos no trabalho de (Vander Heiden *et al.*, 2009).

Recentemente, foi proposto um novo modelo para entender melhor o “Efeito Warburg”. Neste cenário, os fibroblastos do microambiente tumoral estariam sob influência das células tumorais vizinhas e passariam a metabolizar a glicose por meio da glicólise aeróbica como ocorre no “Efeito Warburg”, produzindo lactato. O lactato seria utilizado pelas células tumorais para a realização de fosforilação oxidativa, resultando em uma maior capacidade de proliferação. O processo foi denominado pelos autores de “Efeito Warburg Reverso” (Pavlidis *et al.*, 2009).

Apesar da glicólise fornecer apenas dois ATPs como saldo final energético, esta via torna-se mais eficiente para a proliferação celular, pois a produção de ATP é gerada muito rapidamente, ao contrário da fosforilação oxidativa. Para maximizar a entrada de glicose na célula, a expressão de transportadores de glicose denominados GLUT é aumentada, tornando possível a entrada de glicose de uma forma otimizada e garantindo uma rápida produção de energia (Cairns *et al.*, 2011; Hay, 2016). Além disso, a célula neoplásica necessita de uma grande geração de biomassa e a via glicolítica fornece substrato para a síntese de nucleotídeos, aminoácidos e lipídios. Portanto, se a glicose fosse oxidada totalmente pela fosforilação oxidativa, os intermediários para a produção de biomassa para a célula neoplásica seriam prejudicados (Vander Heiden *et al.*, 2009).

Alguns alvos potenciais para bloqueio da entrada de glicose são conhecidos, como os membros da família de transportadores GLUT. A 2-desoxi-D-glicose, por sua vez, pode ser utilizada para bloquear o metabolismo da glicose, dado que após fosforilação torna-se um inibidor de enzimas que metabolizam a glicose-6-fosfato. A isoforma 2 da piruvato quinase (PKM2) é outro alvo potencial porque esta isoforma promove a glicólise aeróbica e ocorre preferencialmente em células tumorais, ao contrário da isoforma 1 (Mazurek, 2011).

A glutamina é outro nutriente primário utilizado para crescimento celular em células de cultura (Vander Heiden *et al.*, 2009). Ao contrário da glicose que fornece somente carbono para a biossíntese, a glutamina pode fornecer tanto carbono quanto nitrogênio para reações anabólicas, tendo um papel importante no desenvolvimento tumoral (Hensley *et al.*, 2013). A glutamina pode ser metabolizada por um processo enzimático conhecido como glutaminólise. Nesta via, a reação enzimática culmina na produção de alfa-cetoglutarato, uma molécula que participa do ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gerando intermediários para

a produção de energia e síntese de outros produtos metabólicos (Altman *et al.*, 2016).

1.4. Carcinoma de cabeça e pescoço. Aspectos epidemiológicos

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é um dos tipos mais freqüentes de neoplasias, que atinge o trato aerodigestivo superior (lábios, laringe, faringe, nasofaringe e cavidade oral) (Rezende *et al.*, 2010; Pezzuto *et al.*, 2015; Winn *et al.*, 2015) e afeta cerca de 600 mil pessoas no mundo. O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO) é um dos subgrupos mais frequentes, com aproximadamente 300.000 novos casos e 145.000 mortes em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, as estatísticas divulgadas apontam para 15.490 novos casos (11.140 em homens; 4.350 em mulheres) para o ano de 2016 e 5.401 óbitos (4.223 em homens; 1.178 em mulheres) para o ano de 2013 (Ministério da Saúde, 2017).

O carcinoma de cabeça e pescoço é uma doença com etiologia multifatorial, sendo os principais fatores de risco o tabaco e o álcool, que possuem efeitos sinérgicos (Boffetta e Hashibe, 2006; Koontongkaew, 2013). Recentemente, a infecção por HPV foi considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de orofaringe em não fumantes, mas parece também associada a casos de CECO, embora com frequência muito menor (Chaturvedi *et al.*, 2011; Chaitanya *et al.*, 2016). Outros fatores de risco incluem a utilização de próteses dentárias inadequadas (Rotundo *et al.*, 2013), má higiene bucal e consumo de bebidas quentes (Fitzpatrick e Katz, 2010; Loomis *et al.*, 2016).

Enquanto o fumo e o álcool parecem mais relacionados com os casos em países em desenvolvimento, o HPV é predominante em países desenvolvidos e provavelmente ligado a comportamento sexual (Ritchie *et al.*, 2003; Kaminagakura *et al.*, 2012).

De acordo com a classificação de agentes carcinogênicos feita pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2017), o HPV tipo 16, as bebidas alcoólicas, o tabaco e as nozes de betel se enquadram no grupo 01 de carcinógenos relacionados com câncer humano de cavidade oral, tonsila e faringe.

O carcinoma oral afeta principalmente indivíduos do sexo masculino, com idades superiores a 50 anos e que consomem bebidas alcoólicas e tabaco por longos períodos de tempo. Esses indivíduos, em sua maioria, apresentam higiene

bucal em más condições o que pode contribuir para o surgimento da doença (Petti, 2009; Warnakulasuriya, 2009).

Apesar do progresso em técnicas cirúrgicas no desenvolvimento de novas terapias que têm promovido o aumento nas taxas de sobrevivência nas duas últimas décadas, aproximadamente metade de todos os pacientes morrem pela doença. As causas deste insucesso incluem a dificuldade no diagnóstico, que geralmente é obtido quando o tumor atinge estágios avançados. Os pacientes raramente apresentam sintomas nos estágios iniciais, sendo a lesão muitas vezes confundida com outros problemas clínicos, o que contribui para a diminuição da sobrevida (Warnakulasuriya, 2009).

Além dos fatores predisponentes ao CECO acima descritos, uma outra característica frequente dos pacientes é o biótipo corpóreo, cuja classificação depende do índice de massa corporal (IMC), um valor calculado a partir do peso e da altura do indivíduo.

A revisão de Lauby-Secretan e colaboradores (Lauby-Secretan *et al.*, 2016) mostrou a associação entre IMC e câncer, salientando que a manutenção do peso corporal normal pode contribuir para a redução do risco de até 13 tipos de cânceres, enquanto o excesso de peso contribui para o aumento deste risco. A gordura em excesso está subjacente a este fato porque gera um quadro inflamatório que aumenta as chances do desenvolvimento da doença (Crusz e Balkwill, 2015).

1.5. Caracterização genômica e metabolômica do câncer de cabeça e pescoço e outras ômicas

A iniciativa *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) tem gerado a anotação genômica integrada de alterações moleculares em câncer de cabeça e pescoço. Seus dados em quase 300 pacientes mostraram que os casos HPV positivos possuem uma alta frequência de mutações do gene *PIK3CA* e amplificações do gene que atua no ciclo celular *E2F1*. Os casos relacionados com uso do tabaco mostram na grande maioria perda de função do *TP53*, mutações e inativação do *CDKN2A*, enquanto um subgrupo de carcinoma oral com desfecho favorável mostra mutações do *HRAS* e do *PIK3CA*, acompanhadas de mutações inativantes de *CASP8*, *NOTCH1* e *TP53*.

As mutações em *TP53* mais frequentes nesse grupo de tumores, aumentam o consumo de glicose, que é o substrato primário para geração de ATP e uma fonte essencial de carbono para síntese de outras macromoléculas (Kruiswijk *et al.*, 2015). Da mesma forma, a sinalização oncogênica EGFR/Ras também induz o aumento do consumo de glicose (bem como de glutamina) para suportar biossíntese de nucleotídeos, lipídeos e aminoácidos não essenciais, e promove sequestro de proteínas e lipídeos extracelulares e autofagia (White, 2013). A via Ras/Raf/MAPK regula muitas outras vias e promove a fosforilação e a estabilização do fator de transcrição Myc, cujos genes alvos estão conectados à produção de energia (glicólise e glutaminólise) e reações anabólicas (Liu *et al.*, 2008; Rampias *et al.*, 2014).

A fosfatidilinositol quinase (PI3K), codificada pelo gene *PIK3CA*, é um dos importantes efetores de Ras e sua via de sinalização também está frequentemente alterada em tumores de cabeça e pescoço. Entre as proteínas ativadas por PI3K, a melhor caracterizada e associada a câncer é a serina treonina quinase Akt, que é ativada e ativa a quinase mTOR, um importante fator de integração de sinais de crescimento e nutrientes (Stransky *et al.*, 2011; Lui *et al.*, 2013). A quinase Akt promove a glicólise aeróbica e a síntese de ácidos graxos sem afetar as taxas de fosforilação oxidativa, tornando as células neoplásicas dependentes deste processo (revisto por (Elstrom *et al.*, 2004; Shaw e Cantley, 2006). Além disso, Akt e mTOR também acionam o fator de transcrição induzível por hipóxia HIF1, que aumenta a expressão do transportador de glicose GLUT1 e de enzimas glicolíticas e estimula a carboxilação redutiva do alfa-cetoglutarato, com produção de citrato para a lipogênese (revisto por (Elstrom *et al.*, 2004; Shaw e Cantley, 2006; Anderson *et al.*, 2017).

Os dados acima apresentados não devem ser generalizados de forma simplista para todos os tipos de neoplasia. O mapa metabólico de um tumor heterogêneo, como o de cabeça e pescoço, não é único e deve refletir a gama de situações que vão do estado normóxico rico em nutrientes a um estado hipóxico distante de vasos funcionais. Mudanças no comportamento celular impostas pelo microambiente evoluem no tempo e no espaço e podem se tornar permanentes ou transitórias (Strickaert *et al.*, 2017).

Os estudos do perfil metabólico de carcinomas de cabeça e pescoço em tecido tumoral, sangue e saliva têm confirmado esta heterogeneidade, embora sejam referidos alguns padrões comuns. Entre eles, podem ser citados: (a) altas taxas de glicólise aeróbica e oxidação mitocondrial reduzida na maioria dos casos, resultando em acúmulo de lactato no tumor e na saliva e consequente proteção das células malignas de estresse oxidativo (Somashekar *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2012); (b) aumento da conversão de glutamina a glutamato e elevação do influxo de intermediários no ciclo do ácido cítrico/TCA para reforçar a produção de energia pelo TCA (Somashekar *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2012); (c) elevação do metabolismo de colina, que indica proliferação ativa (Mukherji *et al.*, 1997; El-Sayed *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2010; Glunde *et al.*, 2011; Somashekar *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2012; Bag *et al.*, 2015).

Metabolismo e microambiente oral

Uma fonte importante de metabólitos para o organismo é a microbiota que tipicamente existe em uma relação simbiótica com o hospedeiro, fornecendo nutrientes, regulando as funções imunes e dando proteção contra patógenos. A microbiota é encontrada em todas as interfaces com o meio externo (nariz, boca, estômago, intestino, pulmão, pele e vagina. Mudanças na composição da microbiota têm sido associadas com várias doenças, incluindo câncer (Johnson *et al.*, 2016).

As bactérias da microbiota bucal desempenham um papel importantíssimo nos casos de câncer de boca. Existem evidências de sua participação na metabolização de substâncias exógenas em carcinogênicos. Um exemplo é a metabolização do álcool em acetaldeído, um carcinogênico altamente tóxico e mutagênico (Meurman, 2010; Seitz e Stickel, 2010). Este processo pode estar associado à higiene bucal, uma vez que, indivíduos com higiene ruim podem apresentar maiores níveis de acetaldeído quando comparados a indivíduos com boa higiene (Guha *et al.*, 2007; Salaspuro, 2009; Kocaelli *et al.*, 2014). Além disso, etilistas e fumantes com saúde bucal em más condições são candidatos a apresentarem maiores taxas de câncer de cavidade oral (Homann *et al.*, 2000).

Apesar de algumas bactérias estarem associadas ao desenvolvimento de neoplasias, como o *Helicobacter pylori* (Robinson *et al.*, 2017), elas também podem auxiliar no tratamento de tumores. O intestino parece ser um dos responsáveis pela

resposta a alguns tipos de imunoterapia, o que depende da microbiota de cada indivíduo. Na ausência de uma microbiota específica, a terapia não resulta em efeitos significativos (Gopalakrishnan *et al.*, 2018; Matson *et al.*, 2018; Routy *et al.*, 2018).

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar o metaboloma plasmático em pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO) e indivíduos sem a doença (controles), relacionando os dados com variáveis clínicas, patológicas, sócio-demográficas e estilo de vida desses indivíduos. Os objetivos específicos incluem:

1. Identificar e quantificar os metabólitos plasmáticos em portadores de CECO e em controles, utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN);
2. Comparar a concentração plasmática de metabólitos de pacientes portadores de CECO com a de seus controles estratificados por variáveis clínicas, patológicas, sócio-demográficas e características de estilo de vida;
3. Avaliar se as concentrações de metabólitos estão relacionadas com a presença da doença (CECO), ajustadas pelas variáveis epidemiológicas e características de estilo de vida.

3. Materiais e Métodos

Materiais

O objetivo geral deste estudo corresponde ao objetivo 7 do Projeto Temático “Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço” (FAPESP 10/51168-0), conduzido no período de 2011 a 2015 pela sua equipe autodenominada GENCAPO (Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço). O GENCAPO é um consórcio colaborativo de grupos de pesquisa que atuam em hospitais e universidades do estado de São Paulo com o objetivo de desenvolver análises clínicas, genéticas e epidemiológicas de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. O estudo caso-controle incluiu 05 centros clínicos: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Hospital Heliópolis, Instituto de Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital da Faculdade de Medicina do ABC e Hospital do Câncer de Barretos.

Para o presente estudo, foram utilizadas amostras de plasma de indivíduos com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos) e de voluntários sem a doença (controles) provenientes dos seguintes Hospitais: Hospital de Câncer de Barretos, Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho e Hospital Heliópolis.

3.1. Critérios de inclusão dos casos

Os critérios de inclusão de casos no estudo compreenderam:

- Carcinoma epidermoide primário de cavidade oral confirmado por testes clínicos e histológicos (C02 e C04 de acordo com a Classificação Internacional de Doenças, 10ª revisão - CID-10);
- Fumantes e ou etilistas com idades superiores a 40 anos;
- Sem radioterapia ou quimioterapia pré-operatória.

3.2. Critérios de inclusão de controles

Os critérios de inclusão de controles no estudo compreenderam:

- Atendimento no mesmo hospital em que foram assistidos os pacientes;
- Pareamento por sexo, faixa etária ($\pm$ 5 anos); Sem diagnóstico prévio de câncer ou doenças relacionadas com consumo de tabaco e álcool (principais fatores de risco

para câncer de cabeça e pescoço), como por exemplo: (a) doenças endócrinas e metabólicas; (b) doenças do aparelho genito-urinário; (c) doenças de pele, tecido subcutâneo e músculo-esqueléticas; (d) trauma; (e) doenças gastrointestinais; (f) distúrbios circulatórios; (g) doenças de olhos, ouvidos e mastóide; (h) pacientes submetidos a cirurgia plástica; (i) doenças do sistema nervoso; (j) pacientes submetidos a pequenas cirurgias; (k) dor lombar; (l) infecção do trato urinário.

A seleção de controles entre os pacientes hospitalares foi decorrente do fato das taxas de participação serem elevadas e da lembrança sobre os hábitos de vida no passado ser similar à dos pacientes.

3.3. Questionário sobre hábitos de vida

Um questionário sobre hábitos de vida foi aplicado a casos e controles para a obtenção de dados epidemiológicos. O questionário incluiu perguntas sobre: sexo, idade, escolaridade, consumo de tabaco, bebidas alcoólicas, peso e altura. Também incluiu um tópico a ser preenchido por um dentista sobre a condição da higiene bucal.

A partir dos dados fornecidos pelo questionário, foi possível obter o índice de massa corpórea (IMC), tornando possível a inserção de mais uma variável para o estudo. O índice de massa corporal (IMC) é calculado a partir do peso (em quilogramas) dividido pela medida em metros da altura elevada ao quadrado (Ministério da Saúde, 2017) (Tabela 01).

Tabela 01. Classes de IMC, biótipos correspondentes, tipo de obesidade e risco de doença.

IMC (kg/M²)	Classificação	Obesidade grau/classe	Risco de doença
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥ 40	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

3.4. Formulário de dados clinicopatológicos

O formulário de dados clinicopatológicos foi preenchido com informações sobre o estadiamento e o subsítio anatômico, ambos confirmados por avaliações clínicas e histológicas descritas em maiores detalhes a seguir. Para o estadiamento, foi empregada a classificação TNM, que segue os critérios da União Internacional Contra o Câncer – UICC (<https://www.uicc.org/>). Segundo esta classificação, os tumores primários são definidos como T1 a T4 dependendo do seu tamanho, N0 a N3 dependendo do comprometimento dos linfonodos por células neoplásicas, e M1 ou M0, caso estejam presentes ou ausentes, respectivamente, metástases à distância. Neste trabalho, foram empregados os TNMs clínico e patológico (Tabela 02).

Tabela 02. Classificação TNM, de acordo com os critérios da União Internacional Contra o Câncer (UICC), detalhados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC).

Classificação	Característica
Tumor primário (T)	
T1	Tumor de 2 cm ou menos na maior dimensão
T2	Tumor de 2-4 cm na maior dimensão
T3	Tumor maior que 4 cm na maior dimensão
T4	Tumor que invade estruturas adjacentes
Linfonodos (N)	
N0	Linfonodos regionais não comprometidos
N1	Metástase em um único linfonodo ipsolateral ≤ 3 cm
N2a	Metástase em um único linfonodo ipsolateral de 3-6 cm
N2b	Metástases em linfonodos ipsolaterais múltiplos < 6 cm
N2c	Metástases em linfonodos bilaterais ou contralaterais < 6 cm
N3	Metástases em linfonodos ≥ 6 cm
Metástases(M)	
M0	Ausência de metástases distantes
M1	Metástases distantes

Além da classificação TNM, também foi utilizada a Classificação Internacional de Doenças, 10ª revisão - CID-10, para seleção dos casos de interesse procedentes dos subsítios anatômicos C02 e C04 que correspondem, respectivamente, a neoplasias de assoalho de boca e língua.

Todas as informações foram organizadas em uma planilha para facilitar sua associação com as concentrações dos metabólitos dos casos e controles.

3.5. Aspectos éticos

O protocolo do estudo incluindo o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos hospitais participantes e pelo Comitê Nacional em Ética em Pesquisa / CONEP (Parecer 128/2012, Processo nº 25000.084206/2011-76).

Métodos

3.6. Processamento de amostras biológicas

As amostras foram obtidas de 10 mL de sangue coletados entre as 08:00h e as 12:00h (preferencialmente obedecendo jejum), em tubo com EDTA. Após a coleta, o sangue foi centrifugado durante 30 min a 2000 g por 1 hora e o plasma obtido foi dividido em alíquotas, avaliado para hemólise por análise espectrofotométrica no comprimento de onda 414 nm e armazenado a - 80° C até a sua utilização.

3.7. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) explora o comportamento das moléculas quando colocadas em campo magnético, permitindo a identificação de diferentes substâncias com base em sua frequência de ressonância. A técnica de RMN utilizada neste estudo foi ^1H RMN, que explora as propriedades magnéticas do núcleo atômico do isótopo ^1H de hidrogênio presente em um composto. Para esta análise, foram utilizadas 47 amostras de plasma de pacientes apresentando carcinoma epidermoide de cavidade oral (coletadas no momento do diagnóstico) e 49 amostras de controles. Os metabólitos foram individualmente avaliados, 15 casos no espectrômetro *Varian Inova* de 500 MHz (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP, e 32 casos e 49 controles no espectrômetro *Bruker Avance III* de 600MHz (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) do Centro Multiusuário, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Seguindo protocolos descritos por (Beckonert *et al.*, 2007), as amostras de plasma armazenadas a - 80° C foram descongeladas em gelo, filtradas em filtros *Amicon Ultracel 3K Regenerated Cellulose 3000 NMWL* (Millipore Corp., Billerica,

MA, USA) e centrifugadas a 14.000 g por 30 min a 4° C. Para as análises realizadas no espectrômetro *Varian Inova*, 480 µL (80% v/v) do filtrado receberam 60 µL (10% v/v) de uma solução de fosfato (fosfato de sódio 1 M, azida sódica 30 mM, imidazol 100 mM, ácido propanoico trimetilsilil/TSP 5 mM e 60 µL (10% v/v) de óxido de deuterium (D₂O). O TSP foi adicionado à amostra para fornecer uma referência interna para *chemical shift* (deslocamento químico, unidade de frequência) (0 ppm). No caso do espectrômetro Bruker Avance III, 160 µL do filtrado receberam uma solução contendo 60 µL de D₂O, 60 µL de tampão fosfato 200 mM, 1.97 µL de DSS (4,4-dimetil-4-silapentano-1-ácido sulfônico) 15 mM e 320 µL de H₂O, sendo o DSS o indicador de *chemical shift*.

3.8. Identificação e quantificação dos espectros

Os espectros obtidos foram processados e analisados individualmente e manualmente utilizando o *software Chenomx NMR Suite 7.5 Standard* (Chenomx Inc., Calgary, Canada), que permite a identificação e quantificação da composição da amostra utilizando mais de 200 espectros de metabólitos disponíveis na base de dados do próprio programa. Também foi consultada a base de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) (www.hmdb.ca), que fornece posições de picos, formato e características bioquímicas da molécula.

3.9. Análise estatística

Os dados foram agrupados em duas planilhas distintas, uma contendo todas as variáveis epidemiológicas e clínicopatológica, e outra, contendo a identificação e a concentração de cada metabólito. Algumas variáveis como sexo, idade e escolaridade não integraram as análises estatísticas, servindo apenas como um referencial epidemiológico.

A associação entre variáveis qualitativas e metabólitos foi avaliada pelo teste qui-quadrado de Pearson. A comparação entre dois grupos quando os dados não seguiam distribuição normal foi realizada pelo teste Mann-Whitney, e entre três ou mais grupos pela análise de variância (ANOVA). A correlação entre os valores de metabólitos foi feita pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS v.18 for Windows.

Também foi utilizada a plataforma *online MetaboAnalyst* versão 3.5 (<http://www.metaboanalyst.ca/>), que permite o processamento de dados metabolômicos, análise estatística e interpretação funcional.

4. Resultados

Foram analisadas 47 amostras de plasma de pacientes com CECO (casos) e 49 amostras de voluntários sem a doença (controles).

Na Tabela 3, estão descritas as características clinicopatológicas dos 47 pacientes com CECO, incluindo gênero, idade, subsítio anatômico (CID), TNM clínico e TNM patológico (pTNM). Os dados demográficos dos controles são apresentados na Tabela 4.

Os pacientes eram, na sua maioria, do sexo masculino (91,4%) e tinham idades variando de 42 a 76 anos (média = 59 anos). Todos eram fumantes e etilistas ou estiveram expostos no passado ao álcool e ao tabaco. A higiene bucal foi classificada predominantemente como razoável (59,6%), mas com valores significativos para o grupo “ruim/péssima” (31,9%). O nível de escolaridade foi baixo em sua maioria, com predominância do ensino fundamental incompleto (66,0%). O IMC obtido teve valores variando de 13.6 a 32.3 (média = 22.8) (Tabela 5). O subsítio anatômico mais frequente foi C04 (53,2%). Em relação ao TNM, as classes mais frequentes foram cT2 (36,2%), cN0 (61,8%), pT4 (29,8%), pN0 (55,3%). Nenhum dos pacientes apresentou metástase à distância.

O gênero predominante entre os 49 voluntários sem CECO foi o masculino (81,6%) e as idades variaram de 50 a 78 anos (média = 58 anos), o que está de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos. Os indivíduos em sua maioria eram ex-fumantes (46,9%) e consumidores de álcool na atualidade (65,3%). A higiene bucal foi classificada predominantemente como razoável (51%), com valores significativos para o grupo “boa” (36,7%). O nível de escolaridade foi baixo em sua maioria, com predominância do ensino fundamental incompleto (44,9%). O IMC obtido teve valores variando de 17.6-45.7 (média = 27.0) (Tabela 5).

Tabela 3. Características clinicopatológicas de 47 pacientes com CECO (casos). F=feminino; M=masculino; P ou N=exposição positiva ou negativa ao tabaco e álcool, no presente ou no passado; ND=não disponível.

Caso	Subsítios*	Gênero / idade (anos)	Consumo de tabaco	Consumo de álcool	cTNM	pTNM
01	C02	M/54	P	P	T2N0M0	T3N0M0
02	C04	M/49	P	P	T4N0M0	ND
03	C02	M/58	P	P	T2N0M0	T2N0M0
04	C04	M/63	P	P	T3N0M0	T3N0M0
05	C02	M/58	P	P	T3N2M0	T2N1M0
06	C02	M/75	P	P	T2N0M0	T2N0M0
07	C04	M/52	P	P	T2N0M0	T2N2M0
08	C04	M/64	P	P	T4N0M0	T4N0M0
09	C04	M/52	P	P	T2N1M0	T2N2M0
10	C04	M/55	P	P	T1N0M0	ND
11	C04	M/59	P	P	T3N0M0	T3N0M0
12	C04	M/49	P	P	T4N2M0	T3N0M0
13	C04	M/53	P	P	T4N0M0	T4N2M0
14	C02	M/53	P	P	T2N2M0	T4N2M0
15	C02	F/73	P	P	T1N0M0	T1N0M0
16	C04	M/61	P	P	T4N2M0	T4N0M0
17	C04	M/54	P	P	T1N0M0	T1N0M0
18	C04	M/53	P	P	T2N2M0	T2N2M0
19	C04	F/50	P	P	T2N0M0	T4N2M0
20	C04	M/64	P	P	T2N0M0	T2N0M0
21	C04	M/42	P	P	T4N1M0	T4N2M0
22	C02	M/64	P	P	T3N2M0	T3N2M0
23	C02	M/69	P	P	T2N2M0	T1N2M0
24	C02	M/59	P	P	T3N2M0	T4N2M0
25	C02	M/67	P	P	T2N0M0	T2N0M0
26	C02	M/57	P	P	T3N0M0	T3N0M0
27	C04	M/76	P	P	T3N0M0	T4N0M0
28	C02	M/70	P	P	T2N0M0	T2N1M0
29	C04	M/61	P	P	T3N0M0	T3N0M0
30	C02	M/76	P	P	T2N0M0	T4N1M0
31	C02	M/61	P	P	T2N0M0	T2N0M0
32	C04	M/60	P	P	T2N0M0	T4N0M0
33	C02	M/53	P	P	T3N1M0	T2N0M0
34	C04	M/55	P	P	T4N2M0	T4N2M0
35	C02	M/56	P	P	T2N1M0	T2N2M0
36	C02	F/64	P	P	T1N0M0	T1N0M0
37	C02	F/67	P	P	T2N1M0	T3N1M0
38	C02	M/66	P	P	T4N0M0	T2N0M0
39	C04	M/59	P	P	ND	T3N2M0
40	C04	M/55	P	P	T1N0M0	T1N0M0
41	C04	M/57	P	P	T1N0M0	T1N0M0
42	C04	M/63	P	P	T3N1M0	T4N0M0
43	C02	M/61	P	P	T4N1M0	T4N1M0
44	C03	M/61	P	P	T4N0M0	T4N0M0
45	C04	M/57	P	P	T1N0M0	T1N0M0
46	C04	M/51	P	P	T1N0M0	T1N0M0
47	C02	M/52	P	P	T3N1M0	T3N2M0

*Subsítios: C02=Neoplasma maligno de outras partes ou partes não especificadas da língua; C04=Neoplasma maligno de assoalho de boca.

Tabela 4. Características demográficas de 49 voluntários sem CECO (controles). F=feminino; M=masculino; P ou N=exposição positiva ou negativa ao tabaco e álcool, no presente ou no passado; ND=não disponível.

Controle	Gênero / idade (anos)	Consumo de tabaco	Consumo de álcool
01	M/57	P	P
02	M/53	N	P
03	F/54	N	P
04	M/55	N	P
05	M/58	N	P
06	M/69	P	P
07	M/61	P	P
08	M/55	P	P
09	M/58	P	P
10	M/65	N	N
11	M/62	P	P
12	M/71	P	P
13	M/61	P	P
14	M/72	N	N
15	M/59	N	P
16	M/61	P	P
17	M/78	N	P
18	M/66	N	P
19	F/51	N	N
20	F/55	P	P
21	F/58	N	P
22	F/56	P	P
23	F/55	N	N
24	F/52	P	P
25	F/53	P	P
26	F/59	N	N
27	M/55	P	P
28	M/53	P	P
29	M/52	P	P
30	M/57	P	P
31	M/58	N	P
32	M/59	P	P
33	M/51	N	P
34	M/56	P	P
35	M/59	P	P
36	M/55	P	P
37	M/54	N	N
38	M/54	P	P
39	M/50	P	P
40	M/54	P	P
41	M/54	N	P
42	M/58	P	P
43	M/56	P	P
44	M/52	N	P
45	M/53	N	P
46	M/65	P	P
47	M/60	P	P
48	M/66	P	P
49	M/57	P	P

Tabela 5. Frequência dos parâmetros sexo, idade ao diagnóstico (em anos), escolaridade, índice de massa corpórea (IMC) exposição a fumo e álcool e higiene bucal em 47 pacientes portadores de CECO e em 49 voluntários sem a doença; ND=não disponível.

Características	Grupos	Caso N= 47	% 100%	Controle N=49	% 100%
Gênero	Masculino	43	91,4%	40	81,6%
	Feminino	04	8,6%	09	18,4%
Idade ao diagnóstico*	Média	59		58	
	Mínimo-Máximo	42-76		50-78	
Escolaridade	Analfabeto	05	10,6%	01	2%
	Alfabetizado	03	6,4%	00	0%
	Fundamental incompleto	31	66,0%	22	44,9%
	Fundamental completo	04	8,5%	05	10,2%
	Ensino médio	04	8,5%	12	24,5%
	Ensino superior	00	0%	09	18,4%
IMC	Média	22.8		27	
	Mínimo-Máximo	13.6-32.3		17.6-45.7	
Exposição a tabaco	Sim, ainda	35	74,5%	07	14,3%
	Somente no passado	12	25,5%	23	46,9%
	Não, nunca	00	0%	19	38,8%
Exposição a álcool	Sim, ainda	19	40,4%	32	65,3%
	Somente no passado	28	59,6%	11	22,4%
	Não, nunca	00	0%	06	12,3%
Higiene bucal	Ruim/Péssima	15	31,9%	04	8,2%
	Razoável	28	59,6%	25	51%
	Boa	03	6,4%	18	36,7%
	Perda de seguimento	01	2,1%	02	4,1%
Sítio Primário	Língua (C02)	21	44,7%	ND	ND
	Soalho de boca (C04)	25	53,2%	ND	ND
	Perda de seguimento	01	2,1%	ND	ND
cTNM	T1	08	17%	ND	ND
	T2	17	36,2%	ND	ND
	T3	11	23,4%	ND	ND
	T4	09	19,1%	ND	ND
	Perda de seguimento	02	4,3%	ND	ND
	N0	29	61,8%	ND	ND
	N1	08	17%	ND	ND
	N2	09	19,1%	ND	ND
	N3	00	0%	ND	ND
	Perda de seguimento	01	2,1%	ND	ND
	M0	47	100%	ND	ND
	MX	00	0%	ND	ND
pTNM	T1	08	17%	ND	ND
	T2	13	27,6%	ND	ND
	T3	10	21,3%	ND	ND
	T4	14	29,8%	ND	ND
	Perda de seguimento	02	4,3%	ND	ND
	N0	26	55,3%	ND	ND
	N1	05	10,6%	ND	ND
	N2	14	29,8%	ND	ND
	N3	00	0%	ND	ND
	Perda de seguimento	02	4,3%	ND	ND

Nas tabelas 6 e 7, são apresentados os valores de concentração dos metabólitos encontrados nas amostras avaliadas por ^1H RMN de pacientes e controles, respectivamente. Os espectros puderam ser identificados utilizando o software *Chenomx* e com a ajuda do banco de dados do HMDB, no qual constam todas as posições de cada pico obtido de acordo com o padrão de deslocamento químico escolhido (padrão DSS ou TSP). As concentrações dos metabólitos em suas regiões específicas nos espectros são fornecidas em milimolar (mM). A Figura 05 mostra o espectro parcial representativo da análise por ^1H RMN do metabólito acetato de um indivíduo do grupo caso.

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os valores estatísticos descritivos dos casos e controles, respectivamente, como: número de indivíduos da amostra (N), média, desvio padrão e valores máximo e mínimo de todos os metabólitos.

A análise estatística dos metabólitos analisados por RMN em função das variáveis clínicopatológicas e demográficas foi realizada utilizando os testes Mann Whitney (Tabelas 10 a 12), ANOVA (Tabela 13) e correlação de Spearman (Tabela 14). Nesta análise, foram feitas comparações de controles com grupos de pacientes portadores de tumores exibindo diferentes TNMs, bem como comparações entre grupos diferentes de pacientes.

.

Tabela 06. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 47 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos).

Caso	Acetato	Acetoacetato	Acetona	Alanina	Creatina	Creatina Fosfato	Creatinina	Etanol	Fenilalanina	Formato	Glicose
01	0,0666	0,0250	0,0131	0,3112	0,0140	0,0153	0,0474	1,0838	0,0350	0,1379	4,1608
02	0,0188	0,0119	0,0153	0,3964	0,0220	0,0184	0,0730	0,8147	0,0498	0,0660	3,9971
03	0,0558	0,1233	0,0798	0,1674	0,0102	0,0194	0,1192	0,7822	0,0348	0,0867	3,4562
04	0,0307	0,0131	0,0120	0,3642	0,0363	0,0739	0,0734	0,8171	0,0575	0,1068	6,1776
05	0,1061	0,1661	0,1006	0,3715	0,0367	0,0217	0,0914	1,8898	0,0528	0,1860	5,9237
06	0,0554	0,0253	0,0180	0,4175	0,0661	0,1337	0,1369	1,0492	0,0629	0,2083	5,0803
07	0,0315	0,1256	0,0368	0,2101	0,0071	0,0169	0,0652	1,6185	0,0497	0,0641	2,4955
08	0,0259	0,1036	0,0488	0,1727	0,0730	0,1014	0,1001	1,1096	0,0410	0,0780	3,2334
09	0,0441	0,0995	0,0527	0,2148	0,0135	0,0664	0,0746	0,8880	0,0369	0,1279	4,1050
10	0,0169	0,0159	0,0030	0,2544	0,0169	0,1590	0,0485	0,5839	0,0273	0,0566	1,9910
11	0,0343	0,0159	0,0100	0,2348	0,0370	0,0951	0,0371	0,8548	0,0436	0,0909	2,6094
12	0,0357	0,1411	0,0354	0,2084	0,0401	0,0329	0,0363	0,5981	0,0361	0,0699	4,0564
13	0,0613	0,1709	0,0305	0,2196	0,0205	0,0206	0,0488	0,4871	0,0542	0,0461	5,3233
14	0,0504	0,2049	0,0496	0,1457	0,0176	0,0526	0,0555	0,4809	0,0330	0,0845	4,6668
15	0,1127	0,0546	0,0541	0,7093	0,0530	0,1042	0,1014	2,0658	0,0710	0,4363	13,8141
16	0,0347	0,0666	0,0122	0,4114	0,0172	0,0355	0,0804	0,8137	0,0476	0,1300	4,4516
17	0,0462	0,0340	0,0120	0,3344	0,0107	0,0212	0,0608	0,5213	0,0466	0,1338	3,8476
18	0,0388	0,0277	0,0146	0,3865	0,0507	0,1133	0,0314	0,5367	0,0384	0,0932	4,3265
19	0,0404	0,0143	0,0079	0,3549	0,0326	0,0147	0,0425	0,6573	0,0358	0,1338	7,1292
20	0,0286	0,0400	0,0165	0,2932	0,0132	0,0231	0,0295	0,5428	0,0406	0,1298	3,5270
21	0,0787	0,0828	0,0316	0,2577	0,0276	0,0687	0,0939	2,9931	0,0418	0,0807	3,5111
22	0,0440	0,0140	0,0169	0,5294	0,0685	0,1214	0,0904	0,5081	0,0522	0,0569	5,6288
23	1,0151	0,0242	0,0371	0,2907	0,0145	0,0764	0,0804	15,2119	0,0567	0,0489	3,6911

Cont. Tabela 06. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 47 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos).

Caso	Glutamina	Isoleucina	Lactato	Leucina	Piruvato	Prolina	Sarcosina	Tirosina	Treonina	Ureia	Valina	2-OH-butirato
01	0,3844	0,0473	1,3191	0,0818	0,1057	0,1147	0,0142	0,0465	0,0943	0,6293	0,2061	0,0214
02	0,5030	0,0807	2,2671	0,0974	0,0905	0,1794	0,0102	0,0780	0,1217	0,0000	0,1888	0,0324
03	0,4318	0,0548	1,7267	0,1228	0,0864	0,2169	0,0089	0,0395	0,0736	1,6516	0,1870	0,0301
04	0,5109	0,0701	2,1261	0,1182	0,1182	0,1191	0,0120	0,0951	0,1096	1,1532	0,2605	0,0219
05	0,6004	0,0544	2,0617	0,1211	0,2217	0,1367	0,0175	0,0928	0,0894	0,0000	0,2078	0,0496
06	0,4835	0,1590	1,5101	0,2023	0,1092	0,1887	0,0180	0,1044	0,2048	0,8638	0,3959	0,0308
07	0,4094	0,0425	1,3094	0,0976	0,0327	0,0884	0,0098	0,0528	0,0810	0,0000	0,1736	0,0308
08	0,3675	0,0535	1,4921	0,0926	0,0583	0,1110	0,0108	0,0531	0,0564	1,1518	0,1438	0,0884
09	0,5655	0,0606	1,0388	0,1502	0,0791	0,1364	0,0134	0,0522	0,0980	0,0000	0,2113	0,0522
10	0,3689	0,0339	0,4134	0,0605	0,0401	0,1526	0,0102	0,0491	0,1136	0,0000	0,1365	0,0093
11	0,3656	0,0515	1,4664	0,1188	0,0991	0,1550	0,0095	0,0341	0,1437	1,0013	0,2084	0,0271
12	0,2315	0,0323	1,0618	0,0973	0,0844	0,1453	0,0090	0,0508	0,1109	0,4202	0,1442	0,0252
13	0,4313	0,0512	1,0308	0,0880	0,0785	0,1148	0,0063	0,0673	0,0692	0,0000	0,1964	0,0460
14	0,2845	0,0303	0,9803	0,1099	0,0794	0,1170	0,0084	0,0442	0,0584	0,0000	0,1367	0,0487
15	0,4917	0,0813	5,1571	0,1561	0,4377	0,1508	0,0493	0,1116	0,1010	0,0000	0,4200	0,1667
16	0,4894	0,0816	1,5401	0,1116	0,1353	0,3041	0,0161	0,0536	0,0729	0,0000	0,2292	0,0148
17	0,4512	0,0557	1,3671	0,1070	0,1407	0,2326	0,0118	0,0479	0,1127	0,0000	0,2127	0,0308
18	0,4034	0,0427	1,2916	0,1059	0,1070	0,1758	0,0184	0,0707	0,1207	3,4958	0,2200	0,0267
19	0,3509	0,0461	1,6635	0,0659	0,1157	0,1141	0,0150	0,0434	0,0657	0,0000	0,2098	0,0367
20	0,3487	0,1546	0,7236	0,0935	0,0748	0,1694	0,0168	0,0571	0,0889	0,5648	0,1692	0,0230
21	0,3571	0,0792	1,3433	0,1136	0,0758	0,1616	0,0098	0,0449	0,0929	1,2834	0,2069	0,1022
22	0,5700	0,0399	2,1146	0,1357	0,1379	0,1497	0,0069	0,0698	0,1529	5,5124	0,2606	0,0315
23	0,5177	0,0903	1,9241	0,2373	0,1144	0,2569	0,0075	0,0897	0,0868	7,7085	0,3117	0,1054

Cont. Tabela 06. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 47 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos).

Caso	Acetato	Acetoacetato	Acetona	Alanina	Creatina	Creatina Fosfato	Creatinina	Etanol	Fenilalanina	Formato	Glicose
24	0,0370	0,0194	0,0192	0,3585	0,0336	0,0651	0,0560	0,4348	0,0455	0,0869	1,9339
25	0,0469	0,0377	0,0229	0,3720	0,0144	0,0747	0,0827	0,2354	0,0472	0,0716	3,7276
26	0,0612	0,1130	0,0342	0,3224	0,0386	0,0763	0,0684	0,6182	0,0506	0,0638	3,4454
27	0,0595	0,0281	0,0142	0,2759	0,0203	0,0812	0,1141	0,4551	0,0425	0,0734	5,8629
28	0,0235	0,0338	0,0149	0,2993	0,0145	0,0558	0,0674	0,3478	0,0404	0,0613	2,8681
29	0,0758	0,1105	0,0236	0,2368	0,0405	0,0545	0,0646	0,6286	0,0410	0,3133	2,7333
30	0,0389	0,0215	0,0149	0,3950	0,0369	0,1452	0,1668	0,4811	0,0623	0,0886	3,6381
31	0,0474	0,0134	0,0113	0,4891	0,0388	0,0455	0,1007	0,2180	0,0565	0,0646	3,6071
32	0,0308	0,0117	0,0083	0,3947	0,0384	0,0762	0,0730	0,4285	0,0313	0,0862	2,8203
33	0,0587	0,0644	0,0143	0,4881	0,0580	0,1051	0,1120	0,3845	0,0641	0,0761	4,9686
34	0,0353	0,0273	0,0135	0,2831	0,0265	0,0611	0,0620	0,3767	0,0541	0,0500	2,4629
35	0,0446	0,0132	0,0089	0,3319	0,0284	0,1242	0,1499	0,3040	0,0398	0,0634	3,5598
36	0,0417	0,0352	0,0109	0,2785	0,0342	0,0662	0,0814	0,6037	0,0362	0,0818	2,3839
37	0,0410	0,0680	0,0079	0,3923	0,0364	0,0480	0,0478	0,4501	0,0477	0,0709	5,4218
38	0,0506	0,0140	0,0088	0,2842	0,0316	0,0709	0,0866	0,4659	0,0368	0,0645	2,4871
39	0,0461	0,0201	0,0169	0,4102	0,0426	0,0882	0,1100	0,7378	0,0482	0,1308	4,8158
40	0,0579	0,0477	0,0182	0,3944	0,0250	0,0797	0,0774	1,0415	0,0550	0,0996	5,0175
41	0,0497	0,0200	0,0149	0,5106	0,0369	0,1198	0,1249	0,9272	0,0335	0,0817	9,3448
42	0,0432	0,0225	0,0119	0,3842	0,0295	0,0780	0,0808	0,9115	0,0327	0,0699	3,9095
43	0,0368	0,0411	0,0175	0,3742	0,0251	0,1034	0,1109	0,4675	0,0386	0,0641	2,2195
44	0,0469	0,0283	0,0119	0,4030	0,0347	0,0743	0,0816	1,0020	0,0419	0,0805	4,4016
45	0,0501	0,0252	0,0165	0,4177	0,0357	0,0590	0,0763	0,9745	0,0402	0,0789	3,0585
46	0,0624	0,0357	0,0149	0,4795	0,0441	0,0603	0,0758	0,6796	0,0659	0,0664	6,5771
47	0,0815	0,1910	0,0553	0,2931	0,0326	0,0726	0,0750	1,0694	0,0354	0,0638	3,8092

Cont. Tabela 06. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 47 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos).

Caso	Glutamina	Isoleucina	Lactato	Leucina	Piruvato	Prolina	Sarcosina	Tirosina	Treonina	Ureia	Valina	2-OH-butirato
24	0,3710	0,0347	1,4199	0,0733	0,1114	0,1403	0,0161	0,0684	0,0772	3,4606	0,2019	0,0216
25	0,5701	0,0265	1,2690	0,0682	0,1368	0,3121	0,0096	0,1058	0,1137	4,1579	0,1354	0,0480
26	0,5391	0,0709	1,2777	0,1470	0,1112	0,1907	0,0119	0,0387	0,0711	2,7058	0,2089	0,0449
27	0,4624	0,0454	1,2333	0,0832	0,0978	0,2219	0,0095	0,0568	0,0966	5,6199	0,1983	0,0110
28	0,5417	0,0241	1,3411	0,1810	0,0944	0,2506	0,0072	0,0491	0,1099	2,3731	0,1719	0,0123
29	0,3608	0,0386	1,1160	0,0762	0,0796	0,1508	0,0077	0,0533	0,0779	6,6177	0,1877	0,0479
30	0,4161	0,0705	0,8239	0,1214	0,0894	0,1391	0,0084	0,0577	0,1087	10,7703	0,2466	0,0144
31	0,4108	0,0467	1,5792	0,1210	0,1269	0,2342	0,0080	0,0893	0,1222	6,0550	0,2815	0,0445
32	0,4356	0,0488	2,2991	0,0870	0,1273	0,1625	0,0091	0,0561	0,0904	5,3011	0,1877	0,0164
33	0,6570	0,0773	1,5772	0,1639	0,1001	0,2732	0,0086	0,0789	0,1938	9,2462	0,3379	0,0381
34	0,4832	0,1006	0,7716	0,1617	0,0751	0,1651	0,0068	0,0803	0,0994	3,1421	0,2745	0,0239
35	0,4549	0,0488	1,2016	0,1083	0,0771	0,1858	0,0083	0,0397	0,0875	5,3174	0,1630	0,0137
36	0,3730	0,0368	0,6592	0,0836	0,0539	0,1073	0,0170	0,0706	0,0618	5,2016	0,1336	0,0212
37	0,4540	0,0629	1,8229	0,1185	0,1354	0,2318	0,0076	0,0792	0,1143	5,4837	0,1979	0,0161
38	0,4650	0,0306	0,9264	0,0708	0,0823	0,1425	0,0061	0,0329	0,0569	5,2403	0,1316	0,0114
39	0,4694	0,0506	1,8051	0,0971	0,1408	0,2423	0,0115	0,0632	0,0903	9,2366	0,2138	0,0125
40	0,6210	0,0824	1,9985	0,1307	0,1241	0,1554	0,0107	0,0740	0,1107	4,8531	0,2457	0,0457
41	0,4202	0,0363	0,9252	0,0703	0,1001	0,2490	0,0099	0,0365	0,0753	3,6651	0,1561	0,0090
42	0,5694	0,0350	1,7778	0,1113	0,1107	0,2036	0,0078	0,0583	0,1059	4,5971	0,1644	0,0047
43	0,5450	0,0383	1,6737	0,0952	0,1284	0,1739	0,0082	0,0475	0,0882	5,9776	0,1490	0,0299
44	0,5526	0,0388	3,2074	0,0822	0,1597	0,1784	0,0096	0,0623	0,0825	4,9319	0,1662	0,0305
45	0,5824	0,0735	1,6545	0,1562	0,0851	0,1770	0,0111	0,0865	0,1361	3,9561	0,2387	0,0275
46	0,6356	0,0954	1,1924	0,1937	0,1268	0,2897	0,0118	0,1164	0,1581	8,9386	0,3327	0,0211
47	0,5362	0,0426	1,0152	0,0886	0,0552	0,1481	0,0069	0,0625	0,0866	8,7674	0,1729	0,0656

Tabela 07. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 49 voluntários sem a doença (controles).

Controle	Acetato	Acetoacetato	Acetona	Alanina	Creatina	Creatina Fosfato	Creatinina	Etanol	Fenilalanina	Formato	Glicose
01	0,0584	0,0194	0,0154	0,3327	0,0288	0,0530	0,0764	0,3884	0,0435	0,1342	3,8396
02	0,0761	0,0409	0,0209	0,6528	0,0507	0,0889	0,0926	1,0007	0,0578	0,1347	4,5848
03	0,0539	0,0248	0,0096	0,2866	0,0240	0,0333	0,0465	0,3509	0,0269	0,0865	2,7435
04	0,0515	0,0385	0,0182	0,4344	0,0353	0,0797	0,0835	0,5600	0,0400	0,0594	4,7369
05	0,0451	0,0282	0,0173	0,6169	0,0408	0,1214	0,1441	0,8704	0,0594	0,0625	4,1311
06	0,0419	0,0252	0,0147	0,4705	0,0360	0,0380	0,0725	0,6424	0,0638	0,1406	3,6919
07	0,0528	0,0352	0,0213	0,9128	0,0750	0,1074	0,1264	1,1765	0,0502	0,0710	5,5198
08	0,0533	0,0349	0,0215	0,6548	0,0689	0,1211	0,1208	1,1379	0,0842	0,0630	5,9171
09	0,0371	0,0276	0,0142	0,4619	0,0462	0,0814	0,0817	0,4705	0,0394	0,0928	2,6666
10	0,1057	0,0286	0,0110	0,5627	0,0414	0,0752	0,0861	0,5382	0,0732	0,0495	4,4792
11	0,0761	0,0231	0,0110	0,4715	0,0360	0,0852	0,0955	0,4290	0,0500	0,0759	4,5041
12	0,0875	0,0422	0,0113	0,4459	0,0502	0,1910	0,2075	0,4419	0,0724	0,0940	4,7535
13	0,0728	0,0402	0,0074	0,3869	0,0369	0,0657	0,0828	0,3819	0,0436	0,0656	4,9775
14	0,1079	0,0461	0,0162	0,5332	0,0368	0,1510	0,1454	0,5000	0,0638	0,0825	5,1694
15	0,0650	0,0290	0,0078	0,3696	0,0158	0,0705	0,0968	0,3101	0,0367	0,0892	3,7147
16	0,0755	0,0209	0,0077	0,4213	0,0357	0,0426	0,0907	0,3411	0,0454	0,0886	3,0037
17	0,0914	0,0607	0,0229	0,4372	0,0449	0,1077	0,1083	0,4919	0,0495	0,0669	3,9389
18	0,0771	0,0659	0,0189	0,2941	0,0276	0,0816	0,0884	0,4352	0,0494	0,0640	3,5028
19	0,0632	0,0237	0,0110	0,3922	0,0324	0,0766	0,1004	0,4286	0,0512	0,0719	5,4095
20	0,0809	0,0497	0,0114	0,3894	0,0272	0,0573	0,0740	0,3654	0,0359	0,0603	4,1747
21	0,0738	0,0160	0,0091	0,3474	0,0341	0,0490	0,0610	0,3862	0,0309	0,0619	3,5718
22	0,0507	0,0181	0,0057	0,3899	0,0369	0,0205	0,0511	0,2027	0,0446	0,0492	3,1450
23	0,0779	0,0242	0,0086	0,6311	0,0391	0,0686	0,0887	0,4280	0,0636	0,0823	3,8186
24	0,0546	0,0395	0,0072	0,4938	0,0503	0,0272	0,0555	0,3174	0,0537	0,0585	3,0349
25	0,0967	0,0584	0,0108	0,7127	0,0280	0,0480	0,0746	0,6298	0,0555	0,1120	13,8905

Cont. Tabela 07. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 495 voluntários sem a doença (controles).

Controle	Glutamina	Isoleucina	Lactato	Leucina	Piruvato	Prolina	Sarcosina	Tirosina	Treonina	Ureia	Valina	2-OH-butirato
01	0,5479	0,0380	1,3589	0,1199	0,0970	0,1601	0,0180	0,0578	0,1254	4,5943	0,1705	0,0207
02	0,5750	0,0931	1,1087	0,2064	0,1408	0,3440	0,0184	0,0868	0,1416	5,3720	0,3190	0,0425
03	0,3465	0,0350	0,6229	0,0737	0,0606	0,1404	0,0113	0,0735	0,0703	3,7487	0,1727	0,0232
04	0,5604	0,0505	1,1573	0,1162	0,0681	0,2792	0,0058	0,0689	0,0710	4,2911	0,1933	0,0277
05	0,6170	0,0789	1,0523	0,1385	0,1213	0,3174	0,0112	0,0794	0,1264	6,7961	0,3053	0,0188
06	0,6611	0,0466	1,2716	0,1140	0,1255	0,3347	0,0217	0,1007	0,1251	6,8203	0,2545	0,0289
07	0,9539	0,0828	2,8050	0,1445	0,1954	0,3423	0,0087	0,1046	0,2401	5,5138	0,3247	0,0445
08	0,7379	0,1051	1,7268	0,2065	0,1269	0,2433	0,0106	0,1588	0,1801	11,4416	0,4713	0,0425
09	0,5697	0,0785	1,0813	0,1685	0,1129	0,2812	0,0131	0,0863	0,1193	3,7861	0,2599	0,0578
10	0,6702	0,0807	3,5247	0,1864	0,2245	0,2500	0,0062	0,1043	0,1406	4,3379	0,3152	0,0270
11	0,4582	0,0662	2,0018	0,1267	0,1526	0,5083	0,0099	0,0877	0,1429	4,6741	0,2259	0,0191
12	0,5161	0,0745	1,6920	0,1389	0,1727	0,3188	0,0118	0,0908	0,1346	14,9541	0,2789	0,0360
13	0,4235	0,0611	1,1939	0,1505	0,0999	0,1960	0,0071	0,0755	0,1078	5,2263	0,2708	0,0281
14	0,4383	0,0875	1,4606	0,1573	0,1292	0,2617	0,0106	0,1132	0,1878	8,7263	0,3073	0,0467
15	0,3479	0,0539	1,0590	0,1409	0,0758	0,3701	0,0126	0,0540	0,0770	7,2579	0,2527	0,0463
16	0,4814	0,0536	1,0976	0,1099	0,0937	0,2000	0,0090	0,0592	0,1299	7,9141	0,2256	0,0193
17	0,5408	0,0605	1,5654	0,1249	0,1161	0,3508	0,0092	0,0830	0,1259	9,0599	0,2396	0,0450
18	0,4446	0,0364	1,0445	0,0890	0,0563	0,2715	0,0056	0,0877	0,1456	7,0086	0,1426	0,0342
19	0,4406	0,0632	3,1910	0,1191	0,1349	0,2224	0,0075	0,1006	0,1271	7,9089	0,2501	0,0376
20	0,4483	0,0562	1,1723	0,1131	0,1013	0,2807	0,0075	0,0854	0,1347	5,2244	0,2488	0,0360
21	0,5131	0,0390	1,6165	0,0872	0,1244	0,1179	0,0057	0,0626	0,1052	4,5071	0,1671	0,0263
22	0,4080	0,0689	0,8964	0,1126	0,0642	0,1903	0,0038	0,0607	0,1307	4,4103	0,1819	0,0097
23	0,5077	0,0786	1,7460	0,1661	0,1607	0,2408	0,0081	0,1225	0,1876	4,5500	0,2963	0,0238
24	0,4758	0,0900	0,8437	0,1554	0,0839	0,3217	0,0082	0,1142	0,2278	7,4185	0,2726	0,0381
25	0,4295	0,1007	2,9649	0,1890	0,2367	0,2500	0,0113	0,1081	0,1457	6,8270	0,4634	0,1155

Cont. Tabela 07. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 49 voluntários sem a doença (controles).

Controle	Acetato	Acetoacetato	Acetona	Alanina	Creatina	Creatina Fosfato	Creatinina	Etanol	Fenilalanina	Formato	Glicose
26	0,0842	0,0372	0,0116	0,5568	0,0535	0,1003	0,1251	0,2787	0,0612	0,1525	4,7750
27	0,0619	0,0275	0,0108	0,5106	0,0320	0,0771	0,0990	0,4608	0,0484	0,1030	4,2412
28	0,0793	0,0275	0,0094	0,4508	0,0245	0,0781	0,1011	0,3841	0,0496	0,1049	3,8548
29	0,0892	0,0178	0,0090	0,4159	0,0410	0,0749	0,0848	0,3408	0,0567	0,1034	3,9604
30	0,0598	0,0191	0,0107	0,4651	0,0437	0,0725	0,0818	1,0636	0,0421	0,1124	4,1397
31	0,0650	0,0139	0,0089	0,5121	0,0294	0,0895	0,1193	0,5402	0,0443	0,0600	5,0974
32	0,0545	0,0239	0,0105	0,4353	0,0305	0,0467	0,0725	0,8865	0,0509	0,0794	3,7668
33	0,0690	0,0273	0,0093	0,5476	0,0475	0,0635	0,0837	0,9169	0,0642	0,0789	5,4349
34	0,0423	0,2121	0,0087	0,4624	0,0280	0,0941	0,1206	0,7372	0,0632	0,0551	5,4098
35	0,0458	0,0277	0,0089	0,4538	0,0359	0,1116	0,1304	0,6476	0,0711	0,1025	11,9072
36	0,0477	0,0293	0,0101	0,7329	0,0468	0,0972	0,1150	0,8010	0,0642	0,0831	4,7885
37	0,0783	0,0717	0,0249	0,3776	0,0428	0,0760	0,1085	0,7481	0,0654	0,0551	3,4683
38	1,1564	0,0780	0,0251	0,2340	0,0205	0,0647	0,0815	8,6938	0,0523	0,0790	4,3503
39	0,0480	0,0333	0,0107	0,3784	0,0417	0,0535	0,0797	0,8588	0,0432	0,0916	6,6543
40	0,0436	0,0325	0,0123	0,3809	0,0416	0,0797	0,1036	0,9431	0,0716	0,0807	3,9919
41	0,0330	0,0153	0,0073	0,3768	0,0313	0,0544	0,0629	0,7171	0,0401	0,0823	3,3279
42	0,0434	0,0294	0,0103	0,4022	0,0336	0,0801	0,1056	1,2399	0,0581	0,0626	9,4769
43	0,4907	0,0374	0,0110	0,4340	0,0251	0,0471	0,0580	1,5103	0,0484	0,0752	4,9244
44	0,0478	0,0204	0,0081	0,4503	0,0390	0,0993	0,1207	0,7596	0,0475	0,0855	4,7026
45	0,0514	0,0364	0,0113	0,5207	0,0349	0,0745	0,0934	0,7922	0,0587	0,0859	4,1667
46	0,0455	0,0481	0,0147	0,4329	0,0318	0,0769	0,0987	0,6180	0,0799	0,0770	4,4555
47	0,0698	0,0320	0,0112	0,5925	0,0305	0,0758	0,1224	0,8315	0,0595	0,0981	4,3976
48	0,0812	0,0284	0,0104	0,4595	0,0335	0,0967	0,1205	0,8747	0,0584	0,0598	5,7407
49	0,0657	0,0306	0,0098	0,5003	0,0382	0,0572	0,0719	0,9119	0,0614	0,0856	13,3849

Tabela 07. Identificação e concentração plasmática em mM de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 49 voluntários sem a doença (controles).

Controle	Glutamina	Isoleucina	Lactato	Leucina	Piruvato	Prolina	Sarcosina	Tirosina	Treonina	Ureia	Valina	2-OH-butirato
26	0,8313	0,1256	1,8848	0,1826	0,1385	0,3670	0,0157	0,1044	0,1441	7,2833	0,3476	0,0359
27	0,5323	0,0624	1,9698	0,1289	0,1542	0,2438	0,0165	0,1103	0,1433	5,7857	0,2430	0,0272
28	0,4143	0,0600	1,5804	0,1333	0,0914	0,1968	0,0117	0,0629	0,1230	6,6272	0,2230	0,0327
29	0,6360	0,0544	1,0795	0,1181	0,0885	0,1964	0,0141	0,0740	0,0899	7,4768	0,2254	0,0059
30	0,6578	0,0479	2,0030	0,1282	0,0938	0,2339	0,0170	0,0634	0,1035	3,5507	0,1986	0,0148
31	0,4697	0,0314	2,4289	0,0776	0,1260	0,2835	0,0076	0,0598	0,1010	4,8243	0,1459	0,0240
32	0,4655	0,0410	1,9150	0,0919	0,1651	0,2033	0,0096	0,0836	0,0866	5,3062	0,2198	0,0311
33	0,4312	0,0873	1,3691	0,1607	0,1219	0,2502	0,0053	0,0951	0,1180	6,8444	0,3180	0,0349
34	0,6619	0,0716	1,5884	0,1360	0,1053	0,2352	0,0059	0,0901	0,1534	6,5653	0,2324	0,0258
35	0,4034	0,0713	1,6820	0,1330	0,1064	0,2672	0,0037	0,0972	0,0994	9,4762	0,2845	0,0273
36	0,7170	0,1179	2,0513	0,1987	0,1253	0,2190	0,0065	0,0988	0,1382	5,7630	0,3439	0,0321
37	0,5195	0,0876	0,9953	0,1704	0,1001	0,2276	0,0041	0,1000	0,1330	6,6988	0,2777	0,0819
38	0,5575	0,0659	1,8065	0,1051	0,0827	0,1703	0,0068	0,0738	0,1166	3,2439	0,1932	0,0496
39	0,4744	0,0474	1,5716	0,1207	0,1585	0,3014	0,0060	0,0601	0,1363	6,1178	0,2393	0,0329
40	0,6493	0,0583	1,5012	0,1352	0,0829	0,2004	0,0059	0,0818	0,1602	5,5892	0,2321	0,0316
41	0,4202	0,0693	1,6842	0,1276	0,1170	0,1379	0,0064	0,0503	0,0761	3,8079	0,2368	0,0325
42	0,4810	0,0676	1,1579	0,1199	0,0915	0,1811	0,0077	0,0727	0,1238	5,7502	0,2602	0,0211
43	0,6284	0,0692	1,9522	0,1578	0,1251	0,2228	0,0095	0,0971	0,1176	2,4137	0,2850	0,0631
44	0,5707	0,0569	2,2361	0,1031	0,1154	0,1918	0,0084	0,0640	0,1326	10,1214	0,2135	0,0263
45	0,5255	0,0768	1,6414	0,1630	0,1149	0,2124	0,0067	0,0993	0,1355	5,4786	0,2666	0,0539
46	0,5924	0,1326	1,9398	0,2060	0,1537	0,2036	0,0081	0,1127	0,1277	7,3528	0,3243	0,0311
47	0,7115	0,0526	1,8770	0,0996	0,1507	0,2392	0,0104	0,0506	0,1438	7,2903	0,2299	0,0292
48	0,6122	0,0557	2,1915	0,1106	0,1597	0,1959	0,0075	0,0615	0,1277	9,9331	0,1902	0,0155
49	0,5708	0,0695	2,1677	0,1141	0,1206	0,2560	0,0098	0,1153	0,1725	6,2231	0,2424	0,0288

Figura 05. Espectro parcial representativo da análise por RMN de plasma de um caso para o metabólito acetato. Linha preta: indica a linha do espectro obtido por RMN; linha vermelha indica a posição do espectro de acordo com o banco de dados do software CHENOMX; a linha azul indica a concentração do metabólito em mM.

Tabela 8. Estatística descritiva dos valores de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 47 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (casos).

Metabólitos	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
2-OH-butirato	47	0,036	0,030	0,030	0,005	0,167
Acetato	47	0,069	0,046	0,142	0,017	1,015
Acetoacetato	47	0,056	0,034	0,053	0,012	0,205
Acetona	47	0,024	0,015	0,020	0,003	0,101
Alanina	47	0,343	0,355	0,108	0,146	0,709
Creatina	47	0,032	0,033	0,015	0,007	0,073
Creatina Fosfato	47	0,070	0,071	0,037	0,015	0,159
Creatinina	47	0,080	0,076	0,030	0,030	0,167
Etanol	47	1,088	0,629	2,165	0,218	15,212
Fenilalanina	47	0,045	0,043	0,010	0,027	0,071
Formato	47	0,100	0,080	0,069	0,046	0,436
Glicose	47	4,304	3,848	2,035	1,934	13,814
Glutamina	47	0,465	0,462	0,094	0,232	0,657
Isoleucina	47	0,059	0,051	0,029	0,024	0,159
Lactato	47	1,521	1,367	0,743	0,413	5,157
Leucina	47	0,114	0,108	0,039	0,061	0,237
Piruvato	47	0,110	0,100	0,059	0,033	0,438
Prolina	47	0,179	0,165	0,055	0,088	0,312
Sarcosina	47	0,011	0,010	0,007	0,006	0,049
Tirosina	47	0,064	0,058	0,021	0,033	0,116
Treonina	47	0,101	0,094	0,032	0,056	0,205
Ureia	36	4,474	4,725	2,796	0,420	10,770
Valina	47	0,211	0,202	0,065	0,132	0,420

Tabela 09. Estatística descritiva dos valores de 23 metabólitos plasmáticos obtidos de 49 voluntários sem a doença (controles).

Metabólitos	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
2-OH-butirato	49	0,034	0,031	0,018	0,006	0,116
Acetato	49	0,096	0,065	0,167	0,033	1,156
Acetoacetato	49	0,037	0,029	0,029	0,014	0,212
Acetona	49	0,012	0,011	0,005	0,006	0,025
Alanina	49	0,473	0,451	0,123	0,234	0,913
Creatina	49	0,037	0,036	0,011	0,016	0,075
Creatina Fosfato	49	0,077	0,076	0,031	0,020	0,191
Creatinina	49	0,096	0,093	0,029	0,047	0,207
Etanol	49	0,812	0,618	1,185	0,203	8,694
Fenilalanina	49	0,054	0,052	0,012	0,027	0,084
Formato	49	0,083	0,081	0,024	0,049	0,152
Glicose	49	4,966	4,398	2,376	2,667	13,890
Glutamina	49	0,544	0,525	0,122	0,347	0,954
Isoleucina	49	0,069	0,066	0,023	0,031	0,133
Lactato	49	1,664	1,617	0,607	0,623	3,525
Leucina	49	0,136	0,129	0,034	0,074	0,207
Piruvato	49	0,122	0,121	0,038	0,056	0,237
Prolina	49	0,250	0,241	0,072	0,118	0,508
Sarcosina	49	0,009	0,008	0,004	0,004	0,022
Tirosina	49	0,086	0,086	0,022	0,050	0,159
Treonina	49	0,132	0,130	0,034	0,070	0,240
Ureia	49	6,365	6,118	2,280	2,414	14,954
Valina	49	0,257	0,249	0,067	0,143	0,471

Valores significativos ($p < 0,05$) pelo teste de Mann Whitney foram observados para 17 metabólitos entre casos e controles (Tabela 10), para 14 metabólitos entre T1, T2 e controles, para 13 metabólitos entre T3, T4 e controles (Tabela 11), para 17 metabólitos entre N0 e controles e para nove metabólitos entre N+ e controles (Tabela 12). Também foram observadas diferenças significativas entre C02 e C04 (Tabela 12) para dois metabólitos. Na comparação T1, T2 versus T3, T4, e na comparação N+ versus N0, não foram observadas diferenças significativas.

Valores significativos ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA (Tabela 13) foram observados para 4 metabólitos entre os subgrupos de higiene bucal (boa, razoável, ruim/péssima) e entre os subgrupos de consumo de álcool (passado, presente, nunca). Também mostrou diferenças para 11 metabólitos entre os subgrupos de consumo de tabaco (passado, presente, nunca).

A avaliação das diferentes variáveis clinicopatológicas e demográficas pela correlação de Spearman (Tabela 14) mostrou que o índice de massa corpórea está relacionado com a concentração de 12 metabólitos: acetoacetato, acetona, alanina, glicose, isoleucina, lactato, leucina, piruvato, prolina, tirosina, treonina e valina.

Tabela 10. Metabólitos que apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste de Mann-Whitney entre casos e controles.

Metabolitos	Casos (N)	Caso*	Controles (N)	Controle*	Valor de p
2-OH-butirato	47	0,036	49	0,034	0,373
Acetato	47	0,069	49	0,096	0,000
Acetoacetato	47	0,056	49	0,037	0,684
Acetona	47	0,024	49	0,012	0,000
Alanina	47	0,343	49	0,473	0,000
Creatina	47	0,032	49	0,037	0,027
Creatina Fosfato	47	0,070	49	0,077	0,256
Creatinina	47	0,080	49	0,096	0,004
Etanol	47	1,088	49	0,812	0,248
Fenilalanina	47	0,045	49	0,054	0,000
Formato	47	0,100	49	0,083	0,644
Glicose	47	4,304	49	4,966	0,046
Glutamina	47	0,465	49	0,544	0,002
Isoleucina	47	0,059	49	0,069	0,007
Lactato	47	1,521	49	1,664	0,116
Leucina	47	0,114	49	0,136	0,001
Piruvato	47	0,110	49	0,122	0,025
Prolina	47	0,179	49	0,250	0,000
Sarcosina	47	0,011	49	0,009	0,026
Tirosina	47	0,064	49	0,086	0,000
Treonina	47	0,101	49	0,132	0,000
Ureia	36	4,474	49	6,365	0,001
Valina	47	0,211	49	0,257	0,000

*valor das médias

Tabela 11. Metabólitos que apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste de Mann-Whitney entre os grupos T1, T2 x controles, T3, T4 x controles, T1, T2 x T3, T4.

Metabólitos	T1, T2 x controles	T3, T4 x controles	T1, T2 x T3, T4
	Valor de p		
2-OH-butirato	0,290	0,934	0,515
Acetato	0,000	0,002	0,982
Acetoacetato	0,982	0,336	0,402
Acetona	0,007	0,000	0,480
Alanina	0,000	0,000	0,408
Creatina	0,013	0,223	0,105
Creatina Fosfato	0,288	0,353	0,834
Creatinina	0,016	0,014	0,766
Etanol	0,468	0,257	0,783
Fenilalanina	0,003	0,006	0,421
Formato	0,309	0,551	0,189
Glicose	0,094	0,082	0,635
Glutamina	0,003	0,066	0,460
Isoleucina	0,062	0,016	0,620
Lactato	0,079	0,387	0,421
Leucina	0,043	0,001	0,421
Piruvato	0,063	0,046	0,938
Prolina	0,000	0,000	0,421
Sarcosina	0,011	0,383	0,087
Tirosina	0,001	0,000	0,683
Treonina	0,000	0,000	0,295
Ureia	0,007	0,005	0,843
Valina	0,006	0,001	0,628

Tabela 12. Metabólitos que apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste de Mann-Whitney entre os grupos: N+ x N0, N0 x controles, N+ x controles e entre C02 x C04.

Metabólitos	N+ x N0	N0 x controles	N+ x controles	C02 x C04
	Valor de p			
2-OH-butirato	0,432	0,382	0,954	0,326
Acetato	0,657	0,000	0,008	0,024
Acetoacetato	0,136	0,745	0,095	0,667
Acetona	0,202	0,003	0,000	0,275
Alanina	0,829	0,000	0,000	0,337
Creatina	0,838	0,037	0,073	0,667
Creatina Fosfato	0,502	0,156	0,594	0,372
Creatinina	0,937	0,008	0,024	0,020
Etanol	0,609	0,259	0,584	0,115
Fenilalanina	0,641	0,004	0,004	0,372
Formato	0,211	0,449	0,489	0,316
Glicose	0,741	0,045	0,171	0,635
Glutamina	0,393	0,002	0,150	0,155
Isoleucina	0,847	0,026	0,057	0,265
Lactato	0,794	0,140	0,200	0,667
Leucina	0,136	0,001	0,089	0,175
Piruvato	0,829	0,023	0,098	0,205
Prolina	0,741	0,000	0,000	0,766
Sarcosina	0,158	0,024	0,387	0,205
Tirosina	0,690	0,000	0,001	0,544
Treonina	0,900	0,000	0,001	0,667
Ureia	0,275	0,000	0,086	0,176
Valina	0,674	0,001	0,009	0,903

Tabela 13. Metabólitos que apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste estatístico ANOVA em relação ao consumo de higiene bucal, álcool e tabaco.

Metabólitos	Higiene bucal	Álcool	Tabaco
	Valor de p		
2-OH-butirato	0,844	0,730	0,963
Acetato	0,455	0,993	0,347
Acetoacetato	0,454	0,871	0,208
Acetona	0,047	0,782	0,021
Alanina	0,034	0,154	0,000
Creatina	0,304	0,387	0,074
Creatina Fosfato	0,533	0,279	0,173
Creatinina	0,405	0,077	0,036
Etanol	0,178	0,782	0,221
Fenilalanina	0,668	0,017	0,019
Formato	0,633	0,323	0,227
Glicose	0,099	0,987	0,003
Glutamina	0,492	0,351	0,039
Isoleucina	0,187	0,067	0,474
Lactato	0,149	0,131	0,099
Leucina	0,186	0,013	0,244
Piruvato	0,284	0,231	0,047
Prolina	0,016	0,193	0,004
Sarcosina	0,430	0,250	0,232
Tirosina	0,133	0,003	0,002
Treonina	0,365	0,028	0,182
Ureia	0,000	0,465	0,001
Valina	0,507	0,061	0,014

Tabela 14. Metabólitos que apresentaram diferenças significativas de acordo com a correlação de Spearman para IMC em casos e controles

Metabólitos	Coeficiente de correlação	Valor de p
2-OH-butirato	0,117	0,267
Acetato	0,147	0,165
Acetoacetato	-0,210	0,045
Acetona	-0,348	0,001
Alanina	0,396	0,000
Creatina	0,107	0,311
Creatina fosfato	0,101	0,340
Creatinina	0,124	0,243
Etanol	0,089	0,403
Fenilalanina	0,202	0,054
Formato	0,096	0,366
Glicose	0,303	0,004
Glutamina	0,042	0,696
Isoleucina	0,325	0,002
Lactato	0,223	0,034
Leucina	0,297	0,004
Piruvato	0,229	0,029
Prolina	0,313	0,003
Sarcosina	-0,051	0,634
Tirosina	0,363	0,000
Treonina	0,255	0,015
Ureia	0,136	0,227
Valina	0,437	0,000

A plataforma Metaboanalyst 3.5 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (Xia e Wishart, 2011) foi também utilizada para realização da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis / PLS-DA*) e de análises univariadas e multivariadas. As variáveis foram ranqueadas de acordo com sua importância na projeção (VIP), uma medida de sua contribuição na regressão PLS. Os escores VIP maiores que 1 foram considerados importantes para a predição PLS.

Na comparação de casos e controles utilizando a análise univariada da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), os cinco metabólitos com maiores valores de AUC (*area under the curve*) - superiores a 0.67 - foram acetona, sarcosina, ureia, alanina e etanol (Figura 06), o que representa uma capacidade discriminativa modesta para quatro deles, exceto para a acetona. De qualquer maneira, os resultados confirmam aqueles obtidos pelo teste de Mann Whitney.

As variáveis para análise multivariada ROC (validação Monte-Carlo/MCCV, método PLS-DA) selecionadas foram os subsítios C02 e C04 e os grupos caso/controle. A curva ROC (AUC=0.514, 95% CI: 0.328-0.721) e as probabilidades de classe preditas não mostraram discriminação entre os grupos C02 e C04, o que significa que não são metabolicamente muito diferentes (Figura 07), um achado também obtido pelo teste Mann Whitney. Na comparação caso-controle, a curva ROC (AUC=0.8, 95% CI: 0.65-0.929) e as probabilidades de classe preditas mostraram discriminação razoável entre os grupos. A acetona obteve maior escore em casos e a ureia em controles, novamente confirmando o teste Mann Whitney (Figura 08).

Metabólito	AUC	teste t	Log2 FC
Acetona	0.81589	8.7279E-8	0.67197
Sarcosina	0.75423	3.1313E-5	0.27098
Ureia	0.71733	8.858E-6	-3.4354
Alanina	0.68867	7.4955E-4	-0.49018
Etanol	0.66652	0.02009	0.21108

Figura 06. Análise de curva ROC utilizando os valores de concentração de metabólitos obtidos por espectroscopia de ^1H RMN a partir de amostras de plasma de casos e controles. As curvas ROC de cinco metabólitos (A) acetona, (B) sarcosina, (C) ureia e (D) alanina, (E) etanol. (F) Área sob a curva (AUC), teste t e log2 *fold change* (FC) para os metabólitos.

Figura 07. C02 versus C04. (A) PLS-DA: as 15 características com escores VIP mais altos. (B) Curva ROC gerada do modelo de predição PLS-DA (AUC=0.514, 95% CI: 0.328-0.721). (C) As probabilidades de classe preditas não mostraram discriminação entre os grupos.

Figura 08. Casos versus controles. (A) PLS-DA: as 15 características com escores VIP mais altos. (B) Curva ROC gerada do modelo de predição PLS-DA (AUC=0.8, 95% CI: 0.65-0.929). (C) As probabilidades de classe preditas mostraram discriminação razoável entre os grupos.

5. Discussão

Com o propósito de investigar os níveis plasmáticos dos metabólitos relacionados com variáveis epidemiológicas, o presente trabalho utilizou uma abordagem baseada em metabolômica, com dados oriundos de ressonância magnética nuclear, de um questionário aplicado a pacientes e controles sobre estilo de vida e características sócio-demográficas, e de dados clínicopatológicos, que geraram um trabalho rico em informações.

Os resultados obtidos mostram um índice elevado de indivíduos do sexo masculino portadores de CECO (91,4%). Como o consumo de tabaco e álcool pelo grupo de pacientes foi um dos critérios de inclusão no estudo, a frequência maior de homens era esperada, uma vez que eles são expostos com maior frequência aos dois principais fatores de risco da neoplasia, um fato já confirmado por diversos estudos (Boffetta e Hashibe, 2006; Petti, 2009; Winn *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2016).

A idade acima de 40 anos também foi um critério de inclusão. Por este motivo, os pacientes tinham, em sua maioria, idades acima dos 50 anos. Este critério foi considerado porque indivíduos que apresentam quadro de CECO e estão com idades inferiores a 40 anos possuem uma maior probabilidade de serem portadores do HPV (Herrero *et al.*, 2003; D'souza *et al.*, 2007; Kaminagakura *et al.*, 2012; Chaitanya *et al.*, 2016). Casos HPV positivos trariam uma variável para o estudo que necessitaria ser testada, embora no Brasil sua frequência seja baixa em portadores de carcinoma oral (López *et al.*, 2014).

A baixa escolaridade dos pacientes é outro fator que também chama atenção, com frequência de ensino fundamental incompleto de 66% entre os portadores de CECO. A educação está ligada, na maioria das vezes, à renda das famílias, uma vez que baixa escolaridade pode resultar em salários mais baixos, maior dificuldade de inserção no mercado de trabalho e desemprego. Com uma renda menor, a alimentação torna-se mais simples, mais rica em carboidratos e pobre em nutrientes, e os cuidados com a saúde podem ser deixados para segundo plano, sobretudo a saúde bucal. O índice de massa corpórea também pode ser afetado. O grupo de casos mostrou um IMC médio de 22,8, considerado dentro dos valores normais, enquanto o grupo controle mostrou um IMC médio de 27, que é considerado

sobrepeso leve, e um fator de risco para o desenvolvimento de tumores. Quando o IMC apresenta índices acima do recomendado, temos como consequência a elevação dos níveis de citocinas inflamatórias provocando um estado de inflamação crônica que contribui para elevar o risco de câncer (Calle *et al.*, 2003; Hursting *et al.*, 2010; Cruz e Balkwill, 2015; Rezende *et al.*, 2017). No outro extremo, um IMC baixo pode indicar perda muscular e um estado de pré-caquexia, que é freqüente em pacientes com câncer.

As visitas ao dentista são igualmente prejudicadas pelo fator econômico e, como é sabido, a condição da higiene bucal interfere no risco de várias doenças sistêmicas, incluindo câncer (Kudo *et al.*, 2016). A saúde bucal nos indivíduos com CECO foi classificada predominantemente como razoável (59,6%) seguida de ruim/péssima (31,9%), ao contrário dos controles, entre os quais predominou o grupo com saúde bucal classificada como razoável (51%) e boa (36,7%). A higiene oral esta intimamente ligada ao tipo de microbioma encontrado na boca, e ela difere em pacientes com e sem CECO (Meurman, 2010; Hashim *et al.*, 2016). Além disso, uma boa higiene oral, caracterizada por perda reduzida de dentes, visitas anuais ao dentista e escovação diária, pode diminuir o risco de carcinoma de cabeça e pescoço, como conclui Hashim e colaboradores (Hashim *et al.*, 2016) em sua análise de quase 9 mil pacientes e mais de 12 mil controles.

O consumo de álcool faz parte do cotidiano de muitas pessoas. Por causa dos critérios de inclusão, todos ou a maioria dos pacientes com CECO do presente estudo consumiram álcool e tabaco em algum momento da vida, 40,4% deles bebem atualmente e 59,6% bebiam no passado, 25,5% são ex-fumantes e 74,5% ainda fumam. O grupo controle também apresentou elevado consumo de bebidas alcoólicas e tabaco. É bem conhecido o fato do álcool interagir sinergicamente com o tabaco, aumentando a incidência de neoplasias (Goldstein *et al.*, 2010; Prabhu *et al.*, 2014). Neste aspecto, medidas de controle aplicadas pelo governo federal são promotores importantes de saúde, impactando positivamente na prevenção de muitas doenças, dentre elas o carcinoma de cabeça e pescoço.

Um microambiente rico em substâncias mutagênicas derivadas do fumo e do álcool, ou de um microbioma e de nutrientes alterados, pode resultar em eventos mutacionais. Técnicas de última geração têm permitido a identificação desses eventos em numerosos tipos e subtipos de neoplasias, revelando sua

heterogeneidade intra e intertumoral (Weinstein *et al.*, 2013). Apesar de toda essa diversidade em processos celulares desregulados, muitos dos eventos convergem para modificar ou reprogramar o metabolismo. Realmente, as células neoplásicas possuem um metabolismo diferente daqueles observados em tecidos dos quais elas derivam, em função da alta demanda por proteínas, lipídeos e energia necessários para crescimento e proliferação (Vander Heiden *et al.*, 2009).

No presente estudo, a análise estatística pelos testes Mann Whitney, ANOVA e correlação de Spearman da concentração de metabólitos obtida por RMN mostrou diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados. Como o número de metabólitos identificados por RMN foi pequeno, o perfil observado na maioria das comparações não teve grandes diferenças, com aproximadamente os mesmos compostos apresentando expressão elevada (ou reduzida) no plasma independentemente dos grupos em análise.

Na comparação caso-controle, o acetato e outros 14 metabólitos (glicose, glutamina, isoleucina, leucina e piruvato, entre outros) tiveram baixos níveis plasmáticos enquanto a acetona e a sarcosina tiveram altos níveis entre os pacientes com CECO, o que pode significar, respectivamente, captação maior ou menor pelas células neoplásicas.

Recentemente, a revisão de Schug e colaboradores detalhou o papel do acetato em câncer como um nutriente alternativo para produção de energia e biomassa, ao contrário da glicose e da glutamina, que são predominantes nesta função. Fontes endógenas de acetato são representadas, por exemplo, por metabólitos acetilados que, durante períodos de jejum, são hidrolisados, ou pela fermentação do piruvato realizada pela maioria das bactérias intestinais. Como fontes importantes de acetato derivadas da dieta está o etanol, que passa a acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase no citosol de hepatócitos e, posteriormente, a acetato na mitocôndria. O consumo de álcool induz a elevação de níveis de acetato plasmático por pelo menos 3 h após sua ingestão. No fígado, concentrações elevadas de acetato promovem inflamação hepática por acetilação de histonas em resíduos associados com transcrição de genes pró-inflamatórios. Após sua captação pela célula, duas sintetases são capazes de usá-lo como substrato, ACSS1 e ACSS2, e catalisar sua ligação à coenzima A, que é o metabólito central entre a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e

representa o substrato para síntese de esteroides e cetonas (Schug *et al.*, 2016). Outro trabalho de Schug e colaboradores sugere que hipóxia tecidual e condições pobres em nutrientes induzem dependência de acetato, mais que de glicose, para síntese de lipídeos (Schug *et al.*, 2015).

A glutamina e a glicose, que também tiveram seus níveis plasmáticos reduzidos nos pacientes com CECO sugerindo sua utilização por tecidos periféricos, são fundamentais para as rotas de biossíntese e bioenergética nos tumores. A glicose é a fonte primária de energia e carbono na maioria dos organismos, nos quais é utilizada em respiração aeróbica e anaeróbica. Comparada às células normais, a célula neoplásica exibe taxas elevadas de captação de glicose, e seu consumo gera quantidades significativas de ATP e muitos metabólitos intermediários que são utilizados em múltiplas vias biossintéticas, como a da pentose fosfato (Hay, 2016). A glutamina, por sua vez, é um doador de nitrogênio e precursor de nucleotídeos e de vários aminoácidos, doador de carbono para o ciclo TCA pela conversão de seu derivado glutamato em alfa-cetoglutarato, e contribuinte para produção de ATP neste ciclo (Altman *et al.*, 2016; Hay, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

A elevação plasmática da acetona que foi observada nos pacientes com CECO, pode indicar, por sua vez, um quadro de pré-caquexia, como será referido mais adiante. Altos níveis de acetona no sangue também estão ligados a diabetes, uma doença que foi vista pelo grupo GENCAPO elevar os riscos de câncer de cabeça e pescoço (Figueiredo *et al.*, 2016).

Os resultados da comparação de pacientes apresentando tumores grandes e pequenos (subgrupos T1, T2 versus T3, T4, respectivamente) não foram significativos, indicando que a presença do tumor e não o seu tamanho influencia a concentração dos metabólitos, pelo menos no nível de sensibilidade da técnica utilizada. Realmente, quando foram comparados os subgrupos de tumores pequenos e de tumores grandes com os controles, um resultado semelhante foi observado. O mesmo ocorreu na comparação de tumores N0 com N+, que não mostrou diferenças nas concentrações de metabólitos, ao contrário das análises N0 ou N+ versus controles. Estes achados sugerem que o método RMN, dentro de seu nível de sensibilidade, é capaz de detectar apenas as dissimilaridades mais marcantes que ocorrem entre esses grupos.

Os dados obtidos para os dois subsítios analisados, C02 e C04, mostraram poucas diferenças, o que foi confirmado pelos testes da curva ROC. Estudos prévios do grupo GENCAPO em tumores de cavidade oral e assoalho de boca observaram perfis distintos de expressão gênica nestes dois grupos (Severino *et al.*, 2008), o que permite concluir que eles apresentam heterogeneidade no nível transcricional não detectável no nível metabólico.

Em relação às variáveis ligadas a higiene bucal, IMC, álcool e tabaco, o teste ANOVA e a correlação de Spearman mostraram metabólitos diferencialmente expressos, muitos dos quais foram observados na comparação de casos com controles. Este resultado confirma a ligação dessas variáveis com a tumorigênese de cabeça e pescoço.

Em particular, a correlação negativa entre IMC e o metabólito acetona dá evidências de uma tendência à caquexia, depleção de massa muscular e catabolismo protéico, um quadro comum em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e cujas causas e tratamento são ainda desafiadores (August *et al.*, 2009; Gorenc *et al.*, 2015; Jager-Wittenaar *et al.*, 2017; Orell-Kotikangas *et al.*, 2017). Como esperado, a metodologia NMR não-direcionada, conforme desenvolvido neste estudo, possui limitações, mas permite a obtenção de informações importantes e complementares a outros métodos de análise do metaboloma.

Comparando os resultados do presente estudo com dados da literatura sobre metabólitos plasmáticos/séricos obtidos de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, são observados alguns pontos concordantes, como a elevação de acetona e a redução dos níveis de alanina, creatina, creatinina, isoleucina, glutamina, leucina, piruvato, prolina, tirosina, treonina e valina (Tiziani *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2015), o que corresponde no tecido tumoral ao aumento de cetogênese e de metabolismo energético.

Em resumo, os pacientes com CECO analisados pelo presente estudo exibiram um perfil metabólico plasmático distinto sugestivo de cetogênese e metabolismo energético anormal, o que pode contribuir para proliferação celular e inflamação. Esta assinatura, se usada em testes de monitoramento, tem potencial para auxiliar no prognóstico e no tratamento de CECO.

6. Conclusões

O presente estudo foi importante para responder a alguns questionamentos relacionados ao campo da epidemiologia e da metabolômica em pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO). Os resultados aqui apresentados discutiram dados de metabolômica em conjunto com dados epidemiológicos.

As principais conclusões com os dados obtidos no presente estudo são:

1. Os indivíduos do sexo masculino mostram maior incidência da doença.
2. Os indivíduos portadores de CECO possuem má higiene bucal, o que pode contribuir para o desenvolvimento do tumor.
3. Os portadores de CECO têm baixa escolaridade e biótipo magro. A relação entre este biótipo e a tendência a caquexia nesses pacientes merece investigação futura.
4. Os metabólitos identificados por RMN e com alterações significativas no plasma estão relacionados em sua maioria com vias metabólicas produtoras de energia (glicólise), metabolismo do etanol, e de corpos cetônicos.
5. Os pacientes com CECO exibem um perfil metabólico plasmático distinto sugestivo de cetogênese e metabolismo energético anormal, o que pode contribuir para proliferação celular e inflamação.
6. A metodologia NMR não-direcionada, conforme desenvolvido neste estudo, possui limitações, mas permite a obtenção de informações importantes e complementares a outros métodos de análise do metaboloma.

7. Referências

- ALTMAN, B. J.; STINE, Z. E.; DANG, C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 11, p. 749, Nov 2016. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704361> >.
- ANDERSON, N. M. et al. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. **Protein Cell**, Jul 2017. ISSN 1674-8018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748451> >.
- AUGUST, D. A.; HUHMANN, M. B.; DIRECTORS, A. S. F. P. A. E. N. A. S. P. E. N. B. O. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support therapy during adult anticancer treatment and in hematopoietic cell transplantation. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 5, p. 472-500, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 0148-6071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713551> >.
- BAG, S. et al. NMR ((1)H and (13)C) based signatures of abnormal choline metabolism in oral squamous cell carcinoma with no prominent Warburg effect. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 459, n. 4, p. 574-8, Apr 2015. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769954> >.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nat Protoc**, v. 2, n. 11, p. 2692-703, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007604> >.
- BEGER, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 552-74, Jul 2013. ISSN 2218-1989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958139> >.
- BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet Oncol**, v. 7, n. 2, p. 149-56, Feb 2006. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455479> >.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, Feb 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258394> >.
- CALLE, E. E. et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. **N Engl J Med**, v. 348, n. 17, p. 1625-38, Apr 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711737> >.
- CHAITANYA, N. C. et al. Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer. **J Cancer Res Ther**, v. 12, n. 2, p. 969-74, 2016 Apr-Jun 2016. ISSN 1998-4138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27461683> >.
- CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 32, p. 4294-301, Nov 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969503> >.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12, n. 10, p. 584-96, Oct 2015. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122183> >.

D'SOUZA, G. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 356, n. 19, p. 1944-56, May 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494927> >.

EGHBALNIA, H. R. et al. Increasing rigor in NMR-based metabolomics through validated and open source tools. **Curr Opin Biotechnol**, v. 43, p. 56-61, Feb 2017. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27643760> >.

EL-SAYED, S. et al. An ex vivo study exploring the diagnostic potential of ¹H magnetic resonance spectroscopy in squamous cell carcinoma of the head and neck region. **Head Neck**, v. 24, n. 8, p. 766-72, Aug 2002. ISSN 1043-3074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203802> >.

ELSTROM, R. L. et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 11, p. 3892-9, Jun 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172999> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> >.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Diabetes mellitus, metformin and head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 61, p. 47-54, Oct 2016. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688104> >.

FITZPATRICK, S. G.; KATZ, J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. **J Dent**, v. 38, n. 2, p. 83-95, Feb 2010. ISSN 1879-176X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895866> >.

GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z. M.; RONEN, S. M. Choline metabolism in malignant transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 12, p. 835-48, Nov 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089420> >.

GOLDSTEIN, B. Y. et al. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. **Eur J Cancer Prev**, v. 19, n. 6, p. 431-65, Nov 2010. ISSN 1473-5709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679896> >.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 97-103, 01 2018. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097493> >.

GORENC, M.; KOZJEK, N. R.; STROJAN, P. Malnutrition and cachexia in patients with head and neck cancer treated with (chemo)radiotherapy. **Rep Pract Oncol Radiother**, v. 20, n. 4, p. 249-58, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1507-1367. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109912> >.

GUHA, N. et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 10, p. 1159-73, Nov 2007. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761691> >.

GUPTA, A.; GUPTA, S.; MAHDI, A. A. ¹H NMR-derived serum metabolomics of leukoplakia and squamous cell carcinoma. **Clin Chim Acta**, v. 441, p. 47-55, Feb 2015. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499120> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HASHIM, D. et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **Ann Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1619-25, Aug 2016. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27234641> >.

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 10, p. 635-49, 10 2016. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634447> >.

HENSLEY, C. T.; WASTI, A. T.; DEBERARDINIS, R. J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3678-84, Sep 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999442> >.

HERRERO, R. et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 23, p. 1772-83, Dec 2003. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652239> >.

HOMANN, N. et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 663-8, Apr 2000. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753201> >.

HURSTING, S. D. et al. Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 83-9, Jan 2010. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969554> >.

INTERNATIONAL AGENCY FOR CÂNCER RESEARCH. (IARC). **IARC Monographs**, volumes 1-120, 2017. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>>.

JAGER-WITTENAAR, H. et al. High prevalence of cachexia in newly diagnosed head and neck cancer patients: An exploratory study. **Nutrition**, v. 35, p. 114-118, Mar 2017. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28241978> >.

- JOHNSON, C. H. et al. Metabolite and Microbiome Interplay in Cancer Immunotherapy. **Cancer Res**, v. 76, n. 21, p. 6146-6152, Nov 2016. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729325> >.
- KAMINAGAKURA, E. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1726-32, Apr 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618514> >.
- KAMPHORST, J. J.; LEWIS, I. A. Editorial overview: Recent innovations in the metabolomics revolution. **Curr Opin Biotechnol**, v. 43, p. iv-vii, Feb 2017. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28126441> >.
- KOCAELLI, H. et al. Evaluation of potential salivary acetaldehyde production from ethanol in oral cancer patients and healthy subjects. **Hippokratia**, v. 18, n. 3, p. 269-74, 2014 Jul-Sep 2014. ISSN 1108-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25694764> >.
- KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66-83, 2013. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386906> >.
- KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325-37, May 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508971> >.
- KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 393-405, Jul 2015. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122615> >.
- KUDO, Y. et al. Oral environment and cancer. **Genes Environ**, v. 38, p. 13, 2016. ISSN 1880-7046. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482300> >.
- LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. **N Engl J Med**, v. 375, n. 8, p. 794-8, Aug 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27557308> >.
- LIU, Y. C. et al. Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2722, Jul 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628958> >.
- LOOMIS, D. et al. Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. **Lancet Oncol**, v. 17, n. 7, p. 877-878, Jul 2016. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27318851> >.
- LUI, V. W. et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. **Cancer Discov**, v. 3, n. 7, p. 761-9, Jul 2013. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619167> >.

LÓPEZ, R. V. et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer Causes Control**, v. 25, n. 4, p. 461-71, Apr 2014. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474236> >.

MATSON, V. et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 104-108, 01 2018. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29302014> >.

MAZUREK, S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 7, p. 969-80, Jul 2011. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156581> >.

MEURMAN, J. H. Oral microbiota and cancer. **J Oral Microbiol**, v. 2, Aug 2010. ISSN 2000-2297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21523227> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017). Instituto Nacional do Câncer/INCA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> >

MUKHERJI, S. K. et al. Proton MR spectroscopy of squamous cell carcinoma of the extracranial head and neck: in vitro and in vivo studies. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 18, n. 6, p. 1057-72, 1997 Jun-Jul 1997. ISSN 0195-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194433> >.

ORELL-KOTIKANGAS, H. et al. Cachexia at diagnosis is associated with poor survival in head and neck cancer patients. **Acta Otolaryngol**, v. 137, n. 7, p. 778-785, Jul 2017. ISSN 1651-2251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28125312> >.

PAVLIDES, S. et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984-4001, Dec 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923890> >.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 340-50, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674956> >.

PEZZUTO, F. et al. Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. **Oncology**, v. 89, n. 3, p. 125-36, 2015. ISSN 1423-0232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25967534> >.

PRABHU, A.; OBI, K. O.; RUBENSTEIN, J. H. The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Am J Gastroenterol**, v. 109, n. 6, p. 822-7, Jun 2014. ISSN 1572-0241. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751582> >.

RAMPIAS, T. et al. RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 11, p. 2933-46, Jun 2014. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696319> >.

REZENDE, L. F. M. et al. Physical activity and cancer: an umbrella review of the literature including 22 major anatomical sites and 770 000 cancer cases. **Br J Sports Med**, Nov 2017. ISSN 1473-0480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29146752> >.

REZENDE, T. M.; DE SOUZA FREIRE, M.; FRANCO, O. L. Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. **Cancer**, v. 116, n. 21, p. 4914-25, Nov 2010. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665484> >.

RITCHIE, J. M. et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v. 104, n. 3, p. 336-44, Apr 2003. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569557> >.

ROBINSON, K.; KANEKO, K.; ANDERSEN, L. P. Helicobacter: Inflammation, immunology and vaccines. **Helicobacter**, v. 22 Suppl 1, Sep 2017. ISSN 1523-5378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28891128> >.

ROTUNDO, L. D. et al. Are recurrent denture-related sores associated with the risk of oral cancer? A case control study. **Rev Bras Epidemiol**, v. 16, n. 3, p. 705-15, Sep 2013. ISSN 1980-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896283> >.

ROUTY, B. et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 91-97, Jan 2018. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097494> >.

SALASPURO, M. Acetaldehyde: a cumulative carcinogen in humans. **Addiction**, v. 104, n. 4, p. 551-3, Apr 2009. ISSN 1360-0443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19335653> >.

SCHUG, Z. T. et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. **Cancer Cell**, v. 27, n. 1, p. 57-71, Jan 2015. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584894> >.

SCHUG, Z. T.; VANDE VOORDE, J.; GOTTLIEB, E. The metabolic fate of acetate in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 11, p. 708-717, 11 2016. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27562461> >.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. **Genes Nutr**, v. 5, n. 2, p. 121-8, Jun 2010. ISSN 1865-3499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847467> >.

SEVERINO, P. et al. Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites. **BMC Res Notes**, v. 1, p. 113, Nov 2008. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19014556> >.

SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424-30, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724053> >.

SOMASHEKAR, B. S. et al. Magic angle spinning NMR-based metabolic profiling of head and neck squamous cell carcinoma tissues. **J Proteome Res**, v. 10, n. 11, p. 5232-41, Nov 2011. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961579> >.

STRANSKY, N. et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1157-60, Aug 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798893> >.

STRICKAERT, A. et al. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. **Oncogene**, v. 36, n. 19, p. 2637-2642, May 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27797377> >.

SUGIMOTO, M. et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 78-95, Mar 2010. ISSN 1573-3882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300169> >.

TIZIANI, S.; LOPES, V.; GÜNTHER, U. L. Early stage diagnosis of oral cancer using 1H NMR-based metabolomics. **Neoplasia**, v. 11, n. 3, p. 269-76, 4p following 269, Mar 2009. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242608> >.

TRIPATHI, P. et al. Delineating metabolic signatures of head and neck squamous cell carcinoma: phospholipase A2, a potential therapeutic target. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 11, p. 1852-61, Nov 2012. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743333> >.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 9, p. 671-84, Aug 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878982> >.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-33, May 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460998> >.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804401> >.

WEI, J. et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. **Int J Cancer**, v. 129, n. 9, p. 2207-17, Nov 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190195> >.

WEINSTEIN, J. N. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nat Genet**, v. 45, n. 10, p. 1113-20, Oct 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071849> >.

WHITE, E. Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers. **Genes Dev**, v. 27, n. 19, p. 2065-71, Oct 2013. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115766> >.

WINN, D. M. et al. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. **Oral Dis**, v. 21, n. 6, p. 685-93, Sep 2015. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25809224> >.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nat Protoc**, v. 6, n. 6, p. 743-60, Jun 2011. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637195> >.

ZHANG, J.; PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. **EMBO J**, v. 36, n. 10, p. 1302-1315, 05 2017. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420743> >.

8. Apêndices

Apêndice A – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA CASOS E CONTROLES

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS CASOS

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo [*Nome do Local, Centro Colaborador*]. Seu médico nos forneceu seu nome e nos concedeu autorização para convidá-lo a participar deste estudo. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue e de tecido (tumor). Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas (sangue e tumor), que serão coletadas e armazenadas para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a) estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue enquanto estiver no hospital. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual. Se disponível, nós solicitaremos ao Departamento de Patologia do hospital uma pequena amostra do seu tumor.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a)

participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, o(a) Sr.(a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que você apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras

biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado “sim” e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado “não”. Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM	NÃO	Parte do estudo
☐	☐	Entrevista
☐	☐	Coleta e teste do sangue
☐	☐	Coleta de amostras de tumor e testes relacionados
☐	☐	Acesso aos prontuários médicos

Assinatura do participante Data

Assinatura da testemunha Data

Nome do participante

Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone... ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe, no seguinte endereço:

Nome e endereço do Centro Colaborador Local

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA OS CONTROLES

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo [Nome do Centro Colaborador Local]. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se o(a) Sr.(a) concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue. Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. O(A) Sr.(a) pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer a amostra de sangue que será coletada e armazenada para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a) estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue serão enviadas a um laboratório para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, o(a) Sr.(a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que o(a) Sr.(a) apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, o(a) Sr.(a) será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado “sim” e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado “não”. Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM NÃO Parte do estudo

☐ ☐ Entrevista

☐ ☐ Coleta e testes em amostras de sangue

☐ ☐ Acesso aos prontuários médicos

Assinatura do Participante Data

Assinatura da testemunha Data

Nome do Participante

Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone... ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe, no seguinte endereço:

Nome e endereço do Centro Colaborador Local

**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER Nº. 128/2012

Registro CONEP 16491 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto: 405501 Processo nº 25000.084206/2011-76 Projeto de

Pesquisa: *"Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço"* (GENCAPO Fase II).

Pesquisador Responsável: Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto/SP (1º CENTRO)

CEP de origem: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP)

Área Temática Especial: Genética Humana, Biossegurança, Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Patrocinador: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Sumário geral do protocolo

Sob a denominação de câncer de cabeça e pescoço incluem-se as neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe, sendo a maioria do tipo histológico espinocelular. Mundialmente, constitui o sexto tipo de câncer mais comum, compreendendo cerca de 6% dentre todos os tipos de câncer. Acima de 500.000 casos novos e cerca de 300.000 óbitos por tumores de cabeça e pescoço são estimados por ano. No Brasil, mais de 14 mil casos novos são estimados para 2010, considerando apenas os tumores de cavidade oral, e as taxas de incidência previstas correspondem a 22,1 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

Os principais fatores de risco para o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas. Existem evidências de um aumento de risco para os fumantes da ordem de três a quatro vezes para o câncer da cavidade oral e faringe e de dez vezes para o câncer de laringe. O risco conferido pelo álcool também é significativo - o consumo de 50 gramas por dia traduz-se em aumento de aproximadamente três vezes quanto ao risco de câncer de cavidade oral e faringe e de cerca de duas vezes para o risco de câncer de laringe. Juntos, tabaco e álcool são responsáveis por aproximadamente 51% dos tumores de cabeça e pescoço nos Estados Unidos da América, 84% na Europa e 83% na América Latina. O impacto do efeito combinado de tabaco (cigarros/dia) e álcool (bebidas/semana) é maior que a soma dos seus efeitos individuais e excede um efeito multiplicador sobre o risco de câncer de cabeça e pescoço.

Outros fatores de risco para esses tumores incluem a ingestão de mate quente (chimarrão), baixa ingestão de frutas e vegetais e infecção por HPV. Várias circunstâncias profissionais e exposição a carcinógenos nos locais de trabalho, tais como manufatura de isopropanol e exposição a névoas contendo ácido sulfúrico e gás mostarda, são fatores de risco suspeitos para o câncer de laringe. Outros possíveis fatores de risco incluem tabagismo involuntário, histórico sexual, uso de maconha, má higiene bucal, história familiar de câncer de cabeça e pescoço, baixo status socioeconômico e baixo índice de massa corporal.

O CECP é uma das neoplasias mais frequentes no Brasil. Seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevida em cinco anos é baixa. São poucos os estudos de cunho etiológico no Brasil com tamanhos de amostra suficientemente grandes para avaliar simultaneamente múltiplos fatores de risco para o CECP e que permitam estratificações agregando casos e controles para análises específicas. Ou seja, estudos em grande escala, de seguimento de pacientes com CECP, que permitam avaliar simultaneamente o papel do HPV, fatores ambientais, clínicos, histopatológicos, moleculares e a terapêutica utilizada na sobrevida de pacientes e no desenvolvimento do tumor primário não estão disponíveis no Brasil.

Segundo os proponentes, a organização de uma coorte de pacientes com seguimento apropriado após o diagnóstico (com entrevistas periódicas e coleta de sangue) permitirá uma abordagem única para avaliação do papel dos fatores relacionados aos hábitos de vida sobre o prognóstico da doença e a ocorrência de segundo câncer primário, ajudando a identificar marcadores precoces de recrudescimento e outros eventos mórbidos.

A variação geográfica na associação entre HPV e risco de CECP, bem como o papel do HPV na sobrevida de pacientes, devem ser investigados. A organização proposta no projeto em tela no âmbito do Estado de São Paulo e sua ampliação para outras regiões do país, no contexto do projeto InterCHANGE, permitirá tais avaliações.

A estimativa da probabilidade de sucesso de tratamento, complicações e morbidade é essencial para tomadas de decisão clínica e para o aconselhamento de pacientes com CECP. Entretanto, existem poucas opções para cálculo dessa estimativa e o método mais frequentemente utilizado tem como base a experiência, objetiva e subjetiva, do médico. Uma alternativa constitui a probabilidade média de desfechos, mas que não considera as características individuais e não permite avaliação personalizada. Tratamentos mais agressivos são propostos para casos de alto risco, embora os limites entre os níveis de risco não sejam nítidos atualmente. Existe, portanto, a necessidade de definir mais claramente tais limites.

Objetivos: O presente projeto tem como objetivo geral identificar fatores ligados ao estilo de vida, infecção por HPV, bem como perfis de expressão gênica (tanto

miRNAs quanto mRNAs) por sequenciamento em larga escala, fatores clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao comportamento biológico de CECP e, após integração dos dados obtidos, desenvolver uma ferramenta preditiva para a determinação do risco individual de eventos mórbidos em portadores desses tumores, incluindo metástases linfonodais e hematogênicas, sobrevida geral e livre de doença e ocorrência de segundos tumores primários.

Com base no objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos: Realizar o recrutamento de uma grande série de pacientes com CECP e seus controles, que permita estratificações detalhadas das questões de estudo e garanta resultados precisos e robustos; Avaliar os fatores etiológicos e prognósticos do CECP por meio de informações obtidas por questionário sucinto sobre estilo de vida, tratamento e evolução da doença, aplicado no momento do diagnóstico e em retornos anuais dos pacientes; Avaliar histologicamente amostras de CECP com relação à margem de invasão, infiltração linfática, vascular e neural, relacionando com marcadores biológicos de apoptose, proliferação, hipóxia, potencial metastático, entre outros; Identificar e caracterizar padrões de metilação do DNA associados a eventos mórbidos e/ou progressão tumoral de CECP, em genes que exibiram, em estudos prévios do grupo, alterações epigenéticas ou expressão reduzida e ilhas CpG nas sequências regulatórias; Analisar o transcritoma de cabeça e pescoço empregando tecnologia de sequenciamento em larga escala para identificar eventos transcrpcionais associados ao fenótipo de CECP com potencial de predição do risco de eventos mórbidos, transcritos de função desconhecida ou resultantes de fusões e deleções gênicas, isoformas alternativas e polimorfismos ou mutações nos transcritos sequenciados; Sequenciar pequenos RNAs,

em particular microRNAs, de amostras de CECP e suas respectivas margens cirúrgicas para identificação de marcadores candidatos com potencial de utilização na análise de plasma, para acompanhamento clínico e/ou avaliação de prognóstico; Analisar o metaboloma e o perfil protéico de carcinomas de cabeça e pescoço, especificamente a fração glicosilada da membrana celular, e identificar eventos relacionados com características clínicas e histopatológicas e com potencial de predição do risco de eventos mórbidos; Investigar o papel de marcadores candidatos na tumorigênese, utilizando estudos funcionais *in vitro*, e o seu potencial de utilização em abordagens pouco invasivas, validando transcritos e proteínas diferencialmente expressas no plasma e em tecidos de pacientes; Realizar revisão sistemática da literatura sobre biomarcadores de CECP relacionados a eventos mórbidos e extrair um resumo quantitativo de dados publicados, potencialmente úteis para predição de risco individual; e desenvolver e validar ferramenta de predição do risco individual de eventos mórbidos em pacientes com CECP, considerando dados de exposição a agentes ambientais e vírus, e características clínicas, histopatológicas e moleculares desses tumores.

Métodos: Cada centro clínico recrutará uma série de casos de CECP, incluindo tumores da cavidade oral, orofaringe e laringe. Um grupo comparável de controles será recrutado ao mesmo tempo, pareados por frequência com os casos por sexo, faixa etária (5 anos), etnia e área de residência. Os controles hospitalares serão escolhidos de uma lista restrita de doenças e controles visitantes ao hospital também serão aceitáveis. A entrevista de casos e controles será feita por entrevistador treinado por meio de questionário estruturado para obtenção de informações atuais e passadas sobre tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares e outros fatores de estilo de vida.

Local de realização

Trata-se de um estudo nacional, multicêntrico, com cooperação estrangeira.

As amostras e dados dos pacientes e controles serão coletados nos seguintes cinco centros clínicos: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Hospital Heliópolis, Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital do Câncer de

Barretos e Faculdade de Medicina do ABC. O Grupo de Pesquisas Epidemiológicas em Câncer (GPEC) da Faculdade de Saúde Pública da USP será o centro receptor dos questionários e informações sobre material biológico. O material biológico será processado e armazenado em diferentes centros; os procedimentos de armazenamento para manutenção da qualidade do material biológico serão gerenciados pelo Departamento de Biologia Molecular da FAMERP/SP. Pelo menos metade das amostras de cada indivíduo deverá ser transportada para o biorepositório central (local a ser decidido), após a aprovação dos comitês de ética em cada local (centro). As análises do material biológico serão realizadas nos laboratórios dos pesquisadores principais e associados (listados acima), excetuando a análise de anticorpos para proteínas do HPV, para a qual será contratado o Centro de Pesquisa em Câncer da Alemanha, em Heidelberg, sob supervisão do Dr. Michael Pawlita. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC/WHO), nas pessoas de Maria Paula Curado e Paul Brennan, dará apoio logístico futuro ao projeto na sua integração à rede de centros de pesquisa no Brasil e à rede internacional de pesquisa sobre CECP e participarão das análises dos dados epidemiológicos (Anexo “Declaração CONEP”).

Apresentação do protocolo

O protocolo foi encaminhado por ofício, acompanhado de duas mídias digitais idênticas, contendo os seguintes documentos: Sumário; Projeto Comitê de Ética SIRP, Pasta de Anexos com: Aprovação do “Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço - INTERCHANGE - BRASIL (Projeto nr. 09-33) pelo Comitê de Revisão Institucional da IARC, Folha de rosto, Declaração de Aprovação do estudo

pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP/SP, Cronograma de Execução, Orçamento Financeiro, Lista de Centros Participantes, Parecer consubstanciado de pendências, Resposta às pendências solicitadas pelo CEP, Parecer consubstanciado de aprovação, Endereço do Currículo Lattes/CNPq, Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida, Formulário de Informações Clínicas (somente para os casos), Formulário para Seguimento (somente para os casos), Folha de Registro para Casos e Controles, Números de Identificação e Etiquetas com Código de Barras, protocolo de Preparação das Amostras de Sangue e Tecidos, Termo de Consentimento Informado para Casos e Controles, Declaração CONEP.

Juntamente ao Recurso ao Parecer CONEP N°. 611/2011, os seguintes documentos foram apresentados: 1. Solicitação de recurso; 2. Resposta do Pesquisador;

Parecer Consubstanciado CEP – Famerp; 4. Folha de Rosto modificada; 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão de novembro/2011; 6. Projeto (anexo separado do recurso ao parecer CONEP 611/2011).

Considerações sobre a análise do recurso ao Parecer CONEP N°. 611/2011, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

Em declaração de 12 de maio de 2011 (Anexo “Declaração CONEP”, página 2), a pesquisadora responsável informa que “O projeto compreende a primeira iniciativa concreta de obtenção de financiamento com o objetivo de organizar no futuro uma rede brasileira sobre câncer de cabeça e pescoço, que se integrará à rede mundial denominada InterCHANGE”. Adicionalmente, “O nome InterCHANGE reflete a colaboração que ocorrerá entre vários grupos de diferentes países, envolvidos na pesquisa de aspectos relevantes dos tumores de cabeça e pescoço” (trechos em destaque já grifados no original). Mais à frente, “A etapa citada nesses dois parágrafos, que corresponde ao Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço (INTERCHANGE - BRASIL), não tem previsão de início e só será desenvolvida após aprovação pela CONEP, em solicitação posterior específica para esse Estudo Internacional”. Portanto, fica esclarecido que a análise constante do presente documento não inclui a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE.

Resposta: “Reafirmamos que a presente solicitação de parecer para o projeto FAPESP 10/51168-0 não inclui no momento a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE. A realização do presente projeto é contributiva para a implementação da rede InterCHANGE, considerando que ele, com os resultados positivos e possíveis dificuldades, servirá de modelo para o delineamento de projetos dos outros grupos que integrarão a rede”.

Análise: Os esclarecimentos apresentados estão em acordo com os destaques apontados no Parecer. **Pendência atendida.**

A pesquisa em tela não atende à classificação de estudos em Biossegurança do Sistema CEP/CONEP(vide Carta 0213/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010). Portanto, solicita-se a correspondente retificação da Folha de Rosto.

Resposta: “A Folha de Rosto foi retificada”.

Análise: A retificação solicitada na Folha de Rosto foi realizada. **Pendência atendida.**

Em decorrência do exposto na página 22/57 do projeto (item 6.5 Tamanho da amostra) (“Considerando-se a média mensal de casos recrutados durante o desenvolvimento do Projeto GENCAPO (Fase I), estima-se que no período de condução deste estudo nos cinco centros clínicos será possível identificar cerca de 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles de base hospitalar. Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de

sangue periférico [...]), verifica-se que o número total de sujeitos previsto na Folha de Rosto (n = 1.000) encontra-se em desacordo. Solicita-se a apresentação dos esclarecimentos cabíveis e/ou retificação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: “O número correto é 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles. Este é o número previsto de casos e controles. A Folha de Rosto foi retificada”.

Análise: Uma vez que o número total de participantes foi estabelecido em 2.400 (1.200 casos novos de CECP e 1.200 controles), excluiu-se a participação dos “[...] pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico”, que somam 1422 casos e 541 controles. No entanto, tal afirmação contrapõe-se à resposta apresentada em atendimento à Consideração “5.b” (vide abaixo), na qual se verifica a manutenção da intenção de uso de amostras armazenadas anteriormente. Adicionalmente, a nova Folha de Rosto apresenta a quantia “1.200” no campo “No. de Sujeitos Total”, o que denuncia equívoco quanto a este informe específico. Portanto, a alteração realizada na Folha de Rosto não contempla a efetiva casuística prevista pelos pesquisadores. **Pendência não atendida. Recurso:** “A Folha de Rosto foi retificada: o número total de participantes é

2.400 (1.200 casos de CECP e 1.200 controles, cujos dados e amostras serão coletados prospectivamente). Serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO (Fase I), que somam 1422 casos e 541 controles.”.

Análise: Recurso parcialmente atendido. Em atendimento, a Folha de Rosto retificada foi apresentada. No entanto, os Termos de Compromisso do pesquisador responsável e do responsável pela Instituição proponente, apesar de assinados, não se encontram datados. Ressalta-se que todos os campos da Folha de Rosto devem ser preenchidos, sobretudo os referentes a assinaturas e datas, pois trata-se de um documento que dá consistência jurídica ao projeto. Os compromissos assumidos pelos respectivos responsáveis legais devem estar datados, uma vez que, em momento futuro, estes poderão ser substituídos. Desta forma, procura-se garantir respaldo às partes envolvidas, caso seja necessário. Solicita-se adequação.

Em relação aos Termos de Consentimento Informado para Casos e Controles cabem as seguintes considerações:

Os documentos devem ser renomeados como “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, pois esta é a nomenclatura utilizada por determinação das Resoluções pertinentes do Conselho Nacional de Saúde. Solicita-se adequação.

Resposta: “O documento foi renomeado (ver DOCUMENTO 1)”.

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Na página 1/2 (item INTRODUÇÃO) dos Termos se lê: “Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas” (não grifado no original). Apesar da palavra “tumor” ser citada em outros pontos do documento, não há menção à condição específica em estudo, qual seja, câncer de cabeça e pescoço. Solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a).

Resposta: “A condição específica foi acrescentada na linha 2 do item INTRODUÇÃO dos TCLEs”.

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Não consta informe quanto ao envio de amostra para análise no exterior. Uma vez que o sujeito da pesquisa, ou representante legal,

pode considerar esta informação relevante no seu processo decisório, solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a).

Resposta: “Esta informação foi acrescentada ao TCLE. Ver: linhas 3-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para casos
linhas 2-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para os controles”.

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: “Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo”

(não grifado no original). No entanto, considerando o cronograma da pesquisa, com duração prevista de cinco anos, e o disposto no item 3 da Resolução CNS 347/05 (“O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material”). Solicita-se adequação. **Resposta:** “Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 5-7 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS dos TCLEs”.

Análise: O trecho destacado no TCLE original foi substituído por “Suas amostras serão armazenadas por 5 anos, pra serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas do presente estudo e, caso haja necessidade de prolongar esse tempo, você será chamado para confirmar ou não essa alteração”. Ou seja, a adequação solicitada foi realizada. Cabe ressaltar que a extensão de prazo de armazenamento em Biorrepositório não necessita de autorização do sujeito e, sim, do CEP que autorizou a pesquisa (Resolução CNS 441/11, item 12.I). Finalmente, se houver intenção de constituição de um Biobanco, deve-se apresentar o respectivo Protocolo de Desenvolvimento, à luz das disposições contidas na Resolução CNS 441/11 (contém as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de

material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores) para análise pelo Sistema CEP/CONEP. **Pendência atendida.**

Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo” (não grifado no original). No entanto, considerando as diretrizes contidas nos itens III.12 da Resolução CNS 340/04 (“Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal [...]”) e 6.2.d da Resolução CNS 347/05 (“Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir: [...] d) TCLE específico para nova pesquisa [...]”), solicita-se adequação. Substituir a autorização imediata para usos futuros prevista no Termo proposto pela autorização para armazenamento com vistas à possível utilização futura, quando nesta situação, salvo por futura dispensa autorizada do CEP, o sujeito será consultado quanto a sua vontade de participar de nova pesquisa.

Resposta: “Qualquer estudo futuro será submetido ao CEP antes de iniciado. Por esse motivo, no item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: “Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento deverá ser aprovado por você ou seu representante e por um comitê de ética””.

Análise: A adequação solicitada não foi realizada. A frase “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo” foi mantida na nova versão dos TCLEs propostos para o estudo. No entanto, uma vez que o referido banco de materiais biológicos humanos não se encontra formatado como um Biobanco e, sim, como um Biorrespositório, a autorização *a priori* de pesquisas futuras não se aplica. Ainda, “O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrespositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS)” (Resolução CNS 441/2011, item 6). **Pendência não atendida.**

Recurso: “No item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo”.

No item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO de ambos os TCLE, a frase “As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde” foi modificada para: As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação e para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde.”.

Análise: Em atendimento, foram apresentadas novas versões (“Novembro 2011”) dos TCLEs do estudo. As alterações efetuadas contemplam os

esclarecimentos e garantias necessárias apontadas nos pareceres anteriores.

Recurso atendido.

Na página 1/2 (item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO) dos Termos se lê: “Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para você” (não grifado no original). No entanto, conforme dispõe o item V.1.d da Resolução CNS 340/2004, deve ser ofertado e garantido ao sujeito a opção de tomar ou não conhecimento sobre as informações geradas a partir do seu material biológico cedido para a pesquisa. Solicita-se adequação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: “O TCLE foi retificado com a informação: ...”mas esses resultados estarão disponíveis para o(a) Sr.(a)”. Ver: linhas 5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO do TCLE para casos

linhas 4-5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO do TCLE para os controles”.

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Na página 2/2 (item BENEFÍCIOS POTENCIAIS) dos Termos se lê: “Não haverá benefícios diretos para você que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica” (não grifado no original). No entanto, a frase destacada pode induzir o sujeito a participar da pesquisa, uma vez que coloca sobre o indivíduo a pressão pelo alcance do sucesso do estudo. Solicita-se, portanto, que o trecho destacado seja retirado dos Termos.

Resposta: “A frase destacada foi retirada dos TCLEs”.

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Conforme preconizado nos itens IV.1.i e V.6 da Resolução CNS 196/96, além do direito à assistência integral, os sujeitos da pesquisa têm direito à indenização, em caso de danos previstos ou não. Portanto, solicita-se adequar os Termos com a inclusão, de modo claro e afirmativo, da garantia à indenização, em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa.

Resposta: “Os TCLEs foram retificados. Ver:

linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs”.

Análise: Em atendimento, a seguinte frase “Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital” foi substituída por “Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital e terá assistência integral” (item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS). Percebe-se, portanto, que a garantia à indenização não foi incluída, apesar de claramente indicada no Parecer. Cabe, então, destacar o disposto no item V.7 da Resolução CNS 196/96: “Jamais poderá ser exigido do sujeito da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano. O formulário do consentimento livre e esclarecido não deve conter nenhuma ressalva que afaste essa responsabilidade ou que implique ao sujeito da pesquisa abrir mão de seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais”. Portanto, considera-se que a pendência “4.h” não foi resolvida.

Pendência não atendida.

Recurso: “Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs: “Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais”.”.

Análise: A inclusão da garantia à indenização em caso de danos relativos à pesquisa foi realizada nas novas versões dos TCLE do estudo.

Recurso atendido.

Não foram apresentadas as formas de contato com o CEP responsável pelo acompanhamento do estudo, que poderá ser questionado em caso de denúncia ou dúvidas relativas à eticidade da pesquisa. Solicita-se que sejam acrescentados aos Termos o telefone e o endereço do CEP, assim como uma breve descrição do seu papel. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: “Foram acrescentados os endereços e os telefones do responsável pelo acompanhamento do estudo e do CEP da Instituição”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

Em diferentes pontos do projeto é declarada a intenção de uso de amostras armazenadas no contexto de pesquisa anterior (p. ex., “[...] a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tornando a amostra disponível para análise mais robusta” / página 22/57; e “O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9) / página 42/57)” (grifos nossos). Portanto, solicita-se a apresentação de:

Cópia do TCLE utilizado quando da pesquisa em que o material biológico foi colhido e armazenado, em atendimento ao disposto no item

6.2.c da Resolução CNS 347/05.

Resposta: “O TCLE do projeto GENCAPO (Fase I), projeto FAPESP 04/12054-9 é apresentado como DOCUMENTO 2”.

Análise: A solicitação indicada foi atendida. **Pendência atendida.**

Modelo de TCLE, específico para a pesquisa em tela, destinado aos sujeitos cujas amostras já se encontram armazenadas ou a justificativa para dispensa de obtenção do consentimento individual, em atendimento ao disposto no item 6.2.d da Resolução CNS 347/05. A declaração à página 42/57, item 8. PROCEDIMENTOS ÉTICOS, “Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico” não é considerada suficiente.

Resposta: “No momento de inclusão das amostras armazenadas e, portanto, após aprovação dos protocolos da pesquisa em tela pela CONEP, faremos uma emenda com solicitação de isenção de TCLE para o CEP da instituição, com apresentação dos locais do projeto modificados e justificativas para dispensa de obtenção do consentimento individual”.

Análise: O conteúdo da emenda mencionada deveria ter sido apresentado à análise ética como parte integrante do projeto em tramitação. Portanto, considera-se que a pendência “5.b” não foi solucionada adequadamente.

Pendência não atendida.

Recurso: “Resposta ao Parecer CONEP 611/2011: Considerando que serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO Fase I (1422 casos e 541 controles), não apresentaremos emenda para análise.

Salientamos que as frases abaixo foram retiradas do projeto:

Página 5, última frase do item 1: “Deve-se destacar que muitas das análises propostas a serem conduzidas no escopo do presente projeto (GENCAPO Fase II) devem integrar as informações já disponíveis no GENCAPO (Fase I).

Página 22, item 6.5: “Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tornando a amostra disponível para análise mais robusta. Essas amostras serão utilizadas após a obtenção do consentimento do indivíduo doador ou de seu representante legal para uso futuro ou após obtenção do CEP/CONEP para dispensa do TECL nos casos com justificativa de impossibilidade de contato (doador falecido, tentativas de contato sem sucesso ou outros). Considere-se também que há intenção

de juntar esses casos e controles aos de outros estudos no Brasil e internacionais para ampliar o poder do estudo.”

Página 39, item 6.21.1: “Os dados gerados pela presente proposta serão integrados aos dados do GENCAPO Fase I, buscando garantir maior poder estatístico.”

Página 42, item 8: “O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9), das quais arquivou o termo de consentimento para sua utilização em pesquisa de biomarcadores de CECs. Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico. Nos casos de impossibilidade de contato, a aprovação para realização do estudo dessas amostras será solicitada aos comitês de ética de cada instituição.”.

Análise: Conforme exposto, os proponentes do estudo em tela decidiram pela não utilização das amostras coletadas no contexto do projeto GENCAPO Fase I, dispensando-se, portanto, a apresentação do modelo de TCLE específico e da emenda mencionados nos pareceres anteriores. **Recurso atendido.**

Conforme informado à página 27/57 (item 6.12 HPV), ao menos 100 µL de plasma serão necessários para a análise de anticorpos para proteínas do HPV, a ser realizada no DKFZ (Centro de Pesquisas em Câncer de Heidelberg, Alemanha), sob a supervisão do Dr. Michael Pawlita. Portanto, em atendimento ao disposto no item VII.5 da Resolução CNS 292/99, solicita-se a apresentação de declaração do colaborador alemão quanto ao uso do material biológico e dos dados e informações coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo.

Resposta: “O documento é apresentado no DOCUMENTO 3”.

Análise: A solicitação indicada na Consideração “6” foi atendida. **Pendência atendida.**

Segundo o Cronograma apresentado (Anexo 12), a coleta de amostras e dados de pacientes teria início no primeiro mês de 2011. Solicita-se esclarecer se a pesquisa já teria iniciado e, em caso negativo, a apresentação de cronograma atualizado.

Resposta: “A pesquisa ainda não foi iniciada. O novo cronograma é apresentado no DOCUMENTO 4”.

Análise: Foi apresentado novo cronograma referente às atividades relativas ao ano em curso, com previsão de inclusão de sujeitos de pesquisa a partir de setembro. O cronograma referente ao período 2012 a 2015 não foi reapresentado, do que se depreende que não tenha sido alterado. Consta compromisso com início somente após a aprovação do projeto pela CONEP.

Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 03 acima, antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

OBS: No Brasil, além da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP) informa-se a participação dos seguintes centros: Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos/SP (André Lopes Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa -

CEP da Fundação Pio XII); Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital AC Camargo/SP (Emmanuel Dias-Neto/Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital AC Camargo); Faculdade de Odontologia da USP/SP (Fábio Daumas Nunes/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP); Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, SP (José Eduardo Levi/Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/SP (Luisa Lina Villa/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alemão Oswaldo Cruz); Hospital Heliópolis/SP (Marcos Brasilino de Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis); Faculdade de Medicina da USP/SP (Pedro Michaluart Jr/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP); Faculdade de Saúde Pública da USP/SP (Victor Wünsch Filho/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP); Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em Ribeirão Preto/SP (Andréia Machado Leopoldino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto); Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho/SP (José Francisco de Góis Filho/Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho); UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira/SP (Flávia C. Rodrigues-Lisoni/Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira); Centro de Pesquisa Experimental, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein/SP (Patrícia Severino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Jossi Ledo Kanda/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC); Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo/SP (Karina B. Ribeiro/Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo); e Instituto de Biociências da USP/SP (Tiago V. Pereira/Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5 , VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à “Instituição de Pesquisa”;

descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;

vínculos do pesquisador;

anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs- CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 02 de março de 2012.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Apêndice C- Questionário sobre hábitos de vida

Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida

1. Número de identificação BRI |__|__| |__|__|__|
 País Centro Número do indivíduo

O número de identificação é composto pela sigla BRI (Brasil – INTERCHANGE), e pelos códigos do centro e dos indivíduos.

O número de identificação do indivíduo é dado consecutivamente aos indivíduos incluídos no estudo, em cada centro, e não deve incluir o identificador do status de caso ou controle.

2. **Orientações Gerais**

- As colunas devem ser preenchidas com justificção à direita (exemplos: válido |__|__| 1| 2| ; inválido | 1| 2| __|)
- Evitar os códigos “não sei/ignorado”; insistir para obter uma resposta, mesmo se for somente uma estimativa (resposta aproximada).
- Se você não obtiver uma resposta ou estimativa, as colunas deverão ser preenchidas com o número 9.
- Quando estiver escrito “por favor, especifique”, anotar a resposta na linha pontilhada.
- O número de identificação deve ser usado no questionário e nas amostras biológicas e deve ser escrito, juntamente com as iniciais do indivíduo em cada amostra biológica.

3. **Códigos Locais [CL]**

Estes códigos variam segundo o local. Por favor, contate o coordenador local do estudo.

Exemplos: entrevistador, hospital, cidade e distrito, etc)

Nome do paciente.....

Endereço de contato:.....

.....

Telefone.....

E-mail:

ÍNDICE

Informações gerais

Página 4: status, hospital, diagnóstico

Página 5: instruções iniciais

Página 6: idade, sexo, local de residência e escolaridade

Hábito de fumar

Página 7: tabaco: cigarro, charuto, cachimbo

Página 7: maconha

Hábitos alimentares e medidas antropométricas

Página 8: frutas e vegetais

Página 9: medidas antropométricas

Consumo de bebidas

Página 10: álcool, mate

Saúde bucal

Página 11

Exame realizado pelo entrevistador

Página 12: medidas antropométricas, exame oral

Material biológico

Página 13

Parte A

Número de identificação BRI-|_|_|-|_|_|_|_|_|

(a ser utilizado nos espécimes biológicos) Centro No. do indivíduo

País: Centro:

BRI - Brasil 1. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-SP

2. Hospital Heliópolis

3. Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho

4. Hospital de Ensino Padre Anchieta da Faculdade de Medicina do ABC

5. Hospital de Câncer de Barretos (Fundação Pio XII)

Número do indivíduo = número consecutivo, por centro

A1 Status |_|_|

(1) Caso; (2) Controle

Prontuário médico No.

A2 Nome:

A3 Nome da mãe:

A4 Hospital |_|_|_|

A5 Principal razão para a admissão no hospital (diagnóstico principal) |_|_|_|_|-
|_|_|

CID-10

.....

(para pacientes admitidos em ambulatório, somente com suspeita de câncer = 8888)

A6 Data da admissão no hospital (ou visita) |_|_|-|_|_|-|_|_|
Dia Mês Ano

A7 Entrevistador |__|

Bom dia.

Meu nome é e em primeiro lugar, em gostaria de agradecê-lo (a) por ter aceitado participar do estudo. Nós estamos realizando este estudo para tentar descobrir se certas características e hábitos de homens e mulheres estão relacionados a certas doenças. Com este propósito, nós entrevistaremos muitos pacientes atendidos neste e também em outros hospitais.

Se o(a) Sr.(a) concordar, eu farei várias perguntas e as respostas serão registradas neste formulário.

Eu gostaria de reafirmar que tudo o que for dito durante esta entrevista é estritamente confidencial e que as informações coletadas de centenas de pessoas serão utilizadas somente em relatórios científicos sem menção a nenhum nome ou algum outro identificador.

Quaisquer prováveis benefícios do estudo para o bem-estar da população dependem da precisão das suas respostas. Portanto, se o(a) Sr.(a) não entender o significado de alguma das questões, por favor não tenha medo de perguntar.

A qualquer momento o(a) Sr.(a) pode se recusar a continuar ou a responder questões específicas. Além da entrevista, este estudo inclui um exame da sua boca, a coleta de algumas células (explicar) e a coleta de uma amostra de sangue.

Antes de começar, eu peço que o(a) Sr.(a) leia cuidadosamente o termo de consentimento em anexo e assine-o. Eu terei prazer em lhe explicar qualquer detalhe relativo ao estudo antes de o(a) Sr.(a) decidir assinar ou não o termo de consentimento. Assinando o termo de consentimento, o(a) Sr.(a) aceita participar nesta pesquisa. No entanto, a aceitação ou a recusa não terá nenhuma consequência sobre os atos médicos relacionados a sua doença atual.

Podemos começar agora?

Parte B – INFORMAÇÕES GERAIS

B1 Data da entrevista |__|__|-|__|__|-|__|__|
Dia Mês Ano

B2 Início da entrevista |__|__|h |__|__|min

B3 Término da entrevista|__|__|h |__|__|min

B4 Sexo

(1) Masculino; (2) Feminino

B5 Qual a sua idade?

B6 Qual a sua data de nascimento? |__|_|-|__|_|-|__|_|
Dia Mês Ano

B7 Em que cidade ou distrito você mora? [usar os primeiros dígitos do CEP]

--	--	--	--	--	--

.....

B8 Há quantos anos você vive nesse lugar?
(se há menos de um ano, codifique como 00)

B9 Se você mora nesse lugar há menos de um ano, onde você morava antes?

[usar os primeiros 5 dígitos do CEP] |_|_|_|_|_|

.....

B10 Você já frequentou a escola? |__|

(1) Sim (2) Não

B11 Qual o seu grau de escolaridade? |__|

(0) Analfabeto

(1) Ensino Fundamental Incompleto

(2) Ensino Fundamental Completo (terminou a 8a série)

(3) Ensino Médio Completo (terminou o 3o colegial)

(4) Ensino Superior Completo

B12 Qual a sua raça (cor da pele)? |__|

(1) Branco (2) Negro (3) Pardo ou Mulato (4) Amarelo (Asiático) (5) Indígena

Parte C – HÁBITO DE FUMAR

C1 Você fuma ou já fumou em média um cigarro, um charuto ou um cachimbo regularmente, durante pelo menos 1 ano? |_|_|

(1) Não, nunca (2) Somente no passado (3) Sim, ainda [se ‘Não, nunca’, vá para a questão C10]

Se Sim ou somente no passado,

C2 Normalmente, quantos cigarros/ por dia, você fuma ou fumava? |_|_|

C3 Você fuma ou já fumou charutos? |_|_|

(1) Sim (2) Não

C4 Quantos charutos por dia? |_|_|

C5 Você fuma ou já fumou cachimbo? |_|_|

(1) Sim (2) Não

C6 Quantos cachimbos você fuma por dia? |_|_|

C7 Idade em que começou a fumar (isto é, fumando na maioria dos dias) |_|_|

Somente para ex-fumantes

C8 Idade em que parou de fumar |_|_|

C9 Você parou de fumar porque estava doente? |_|_|

(1) Sim (2) Não

Maconha

C10 Você fuma ou já fumou maconha regularmente durante pelo menos 6 meses?

|_|

[Se 'Não' vá para a parte D]

(1) Sim (2) Não

C11 Quantos cigarros de maconha você fuma por semana? |_|_|

C12 Idade em que começou a fumar maconha |_|_|

C13 Idade em que parou de fumar maconha

|_|_|

Parte D – HÁBITOS ALIMENTARES E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

D. Antes de você ficar doente, com qual frequência você consumia os seguintes alimentos e bebidas?

1=nunca

2=menos que uma vez por mês

3=1-3 vezes por mês

4=uma ou duas vezes por semana

5=na maioria dos dias, mas não todos os dias

6=todos os dias

D1 De maneira geral, com qual frequência você come legumes e verduras

|__|

(excluindo batatas)?

D2 Folhas verdes cruas e vegetais

|__|

D3 Brócolis, Repolho, Couve

|__|

D4 Cenoura

|__|

D5 De maneira geral, com qual frequência você come frutas frescas?

|__|

(incluindo salada de frutas e suco de frutas [natural])

D6 Suco de frutas (natural)

|__|

D7 Maçãs ou peras

|__|

D8 Frutas cítricas (laranja, limão, mexerica)

|__|

D9 Tomates frescos

|__|

D10 Bananas

|__|

D11 Se você se lembra, pode por favor me dizer qual era o seu peso dois anos atrás?

|_|_|_|

kg

D12 Qual era o seu peso quando você tinha 30 anos? |_|_|_|

kg

D13 Qual é o seu peso atual?

|_|_|_|

Kg

D14 Qual é a sua altura?

|_|_|_|

cm

Parte E – CONSUMO DE BEBIDAS (ÁLCOOL E CHIMARRÃO)

E1 Você ingere ou já ingeriu bebidas alcoólicas? [se ‘Não, nunca’, vá para a questão E10]

|_|

(1) Sim (2) Somente no passado (3) Não, nunca

E2 Quantas vezes por semana você consome ou consumia bebidas alcoólicas?

|_|

0-7 (0 significa nenhuma vez na maioria das semanas)

E3 Quantas vezes por semana você consumiu bebidas alcoólicas antes do meio-dia?

|_|

0-7 (0 significa nenhuma vez na maioria das semanas)

Para pessoas que consomem bebidas alcoólicas atualmente ou já consumiram no passado

O quanto normalmente você bebe em uma semana?

Nota: Se o entrevistado responder em um intervalo (exemplo: de 2 a 3 garrafas), usar a maior quantidade (exemplo: 3 garrafas)

E4 Cachaça ou outros destilados (vodca, uísque, tequila, rum, gim)

--	--	--	--

doses/semana

ou

--	--

garrafas/semana

E5 Vinho

--	--	--	--

taças/semana

ou

--	--

garrafas/semana

E6 Cerveja

--	--	--	--

latas/semana

or

--	--

garrafas/semana

E7 Qual foi a maior quantidade de cachaça que você já bebeu em um único dia?

|_|

Se você somente consumia bebidas alcoólicas no passado:

E8 Há quantos anos parou de beber?

E9 Você parou de beber porque estava doente?
(1) Sim (2) Não

E10 Mate (Chimarrão)

Você bebe ou já bebeu chimarrão?

(1) Sim, ainda bebe; (2) Nunca; (3) Somente no passado [se 'Nunca' vá para a questão F1]

E11 Qual é o seu consumo médio diário de chimarrão?

mililitros

E12 Em qual temperatura você normalmente bebe ou bebia o chimarrão?

(1) Frio; (2) Morno; (3) Quente; (4) Muito quente

Parte F - SAÚDE BUCAL

- F1 Com qual frequência você escova seus dentes? ☐
- (0) Nunca
(1) < uma vez por semana (5) 2 vezes/dia
(2) 1-2 vezes por semana (6) 3 vezes/dia
(3) Dia sim, dia não (7) > 3 vezes/dia
(4) Uma vez por dia (8) Edêntulo (não tem dentes) [vá para a questão F5]
- F2 Você usa fio ou fita dental? ☐
- (0) Não (1) Sim, às vezes (3) Sim, sempre
- F3 Que material você usa para escovar os dentes? ☐
- (1) Nenhum
(2) Creme dental (“pasta de dentes”)
(3) Outro (especificar)
- F4 Suas gengivas sangram quando você escova os dentes? ☐
- (1) Não; (2) Às vezes; (3) Sempre ou quase sempre
- F5 Com qual frequência você usa enxaguatórios bucais? ☐
- (exemplo: Cepacol, Listerine, Plax, etc)
(0) Nunca (4) Uma vez por dia
(1) < uma vez por semana (5) 2 vezes/dia
(2) 1-2 vezes por semana (6) 3 vezes/dia
(3) Dia sim, dia não (7) > 3 vezes/dia
- F6 Você usa próteses removíveis (“dentadura”, “ponte móvel”)? ☐
- (1) Sim; (2) Não [se ‘Não’ vá para a questão I9]
- F7 É uma prótese total (dentadura)? ☐
- (1) Sim (2) Não

F8 Com qual idade você começou a usar dentaduras? |_|_|

F9 Nos últimos 20 anos, com qual frequência você foi ao dentista? |_|

(1) Todos os anos (3) A cada 6 anos ou raramente

(2) A cada 2-5 anos (4) Nunca

Parte G – EXAME REALIZADO PELO ENTREVISTADOR

Medidas Antropométricas

G1 Peso (kg) |__|__|__|

G2 Altura (cm) |__|__|__|

Exame oral

A ser realizado **antes** da coleta do esfregaço bucal, tanto para casos como para controles.

G3 Condição geral de higiene bucal |__|
(exemplo: tártaro, placa bacteriana, sangramento gengival, etc.)
(1) Boa; (2) Razoável; (3) Ruim/Péssima

G4 Dentes ausentes |__|
(1) Menos do que 5; (2) 6-15; (3) 16 ou mais

Parte H – MATERIAL BIOLÓGICO

H1. Foi coletado sangue? ☐

(0) Não (1) Sim

H2. Foi coletado um espécime de tumor fresco? ☐

(0) Não (1) Sim

Apêndice D- Formulário de informações clínicas

Formulário de Informações Clínicas

Parte A

SOMENTE PARA OS CASOS (coletar os dados do prontuário médico)

A1 Descrição do aspecto macroscópico do tumor |__|

(1) Exofítico; (2) Ulcerativo; (3) Verrucoso; (4) Outro

A2 Topografia (CID-O-3) C|__|__|.|__|

A3 Morfologia (CID-O-3) |__|__|__|__|/|__|

..... (especificar)

A4 Número do Anátomo Patológico (não codificar)

_____, _____

A5 Data do diagnóstico histológico |__|__|-|__|__|-|__|__|

Ano

Dia Mês

A6 Data da cirurgia (se realizada) |__|__|-|__|__|-|__|__|

Ano

Dia Mês

A7 Usando as seguintes tabelas, classificar o tumor segundo a classificação TNM (6ª edição)

Lábio e Cavidade Oral (C00, 02-C06)

TNM

(1) Tis Carcinoma in situ

(2) T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

(3) T2 Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão

(4) T3 Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão

(5) T4a Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, musculatura profunda/extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seio maxilar ou pele da face

(6) T4b Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio, ou envolve a artéria carótida interna

(1) N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

(2) N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão

(3) N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão

(4) N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(5) N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contra laterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(6) N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(1) M0 Ausência de metástase à distância

(2) M1 Metástase à distância

Agrupamento por estádios |__|

(0) Estádio 0 (1) Estádio I (2) Estádio II (3) Estádio III (4) Estádio IVA
(5) Estádio IVB (6) Estádio IVC

[O agrupamento por estádios é válido para todas as localizações]

Estádio 0 Tis N0 M0

Estádio I T1 N0 M0

Estádio II T2 N0 M0

Estádio III T3 N0 M0

T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

Estádio IVA T4a N0 M0

T4a N1 M0

T1 N2 M0

T2 N2 M0

T3 N2 M0

T4a N2 M0

Estádio IVB Qualquer T N3 M0

T4b Qualquer N M0

Estádio IVC Qualquer T Qualquer N M1

Câncer de orofaringe (CID-O-3 C01, C05.1, C05.2, C09-C10)

TNM

- (1) Tis Carcinoma in situ
 - (2) T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
 - (3) T2 Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
 - (4) T3 Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
 - (5) T4a Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: laringe, musculatura profunda/extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigóide medial, palato duro e mandíbula
 - (6) T4b Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: músculo pterigóide lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base do crânio ou adjacente à artéria carótida
-

- (1) N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
 - (2) N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
 - (3) N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
 - (4) N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
 - (5) N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contra laterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
 - (6) N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
-

- (1) M0 Ausência de metástase à distância
 - (2) M1 Metástase à distância
-

Agrupamento por estádios

(0) Estádio 0 (1) Estádio I (2) Estádio II (3) Estádio III (4) Estádio IVA
(5) Estádio IVB (6) Estádio IVC

Câncer da Hipofaringe (CID-O-3 C12-C13)

TNM

(1) Tis Carcinoma in situ |__|

(2) T1 Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da hipofaringe e com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

(3) T2 Tumor que invade mais de uma sub-localização anatômica da hipofaringe, ou uma localização anatômica adjacente, ou mede mais de 2 cm porém não mais que 4 cm na sua maior dimensão, **sem** fixação da hemilaringe

(4) T3 Tumor com mais de 4 cm na sua maior dimensão ou **com** fixação da hemilaringe

(5) T4a Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: cartilagem tireóide/cricóide, osso hióide, glândula tireóide, esôfago, compartimento central de partes moles*

(6) T4b Tumor que invade a fáscia pré-vertebral, envolve a artéria carótida ou invade estruturas mediastinais

* As partes moles do compartimento central incluem a alça muscular pré-laríngea (omo-hióideo, esterno-hióideo, esterno-tireo-hióideo e tireo-hióideo) e a gordura subcutânea.

(1) N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

(2) N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão

(3) N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão

(4) N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(5) N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contra laterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(6) N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(1) M0 Ausência de metástase à distância

(2) M1 Metástase à distância |_|_|

Agrupamento por Estádios |_|_|

(0) Estádio 0 (1) Estádio I (2) Estádio II (3) Estádio III (4) Estádio IVA

(5) Estádio IVB (6) Estádio IVC

Câncer da Laringe (CID-O-3 C32, C10.1)

TNM

(1) Tis Carcinoma in situ |_|_|

Glote

(2) T1a Tumor limitado a uma corda vocal, com mobilidade normal

(3) T1b Tumor envolve ambas as cordas vocais com mobilidade normal

(4) T2 Tumor que se estende à supra-glote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída

(5) T3 Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou que invade o espaço paraglótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide (por exemplo, córtex interna)

(6) T4a Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide ou estende-se aos tecidos além da laringe, por exemplo, traquéia, partes moles do pescoço incluindo a musculatura profunda extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireóide e esôfago

(7) T4b Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente à artéria carótida Supraglote

(8) T1 Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote, com mobilidade normal da corda vocal

(9) T2 Tumor que invade a mucosa de mais de uma sub-localização anatômica adjacente da supraglote ou a glote ou região externa à supraglote (por exemplo, a mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme), **sem** fixação da laringe

(10) T3 Tumor limitado à laringe **com** fixação da corda vocal e/ou invasão de qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricóide, tecidos pré-epiglóticos, espaço paraglótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide (por exemplo, córtex interno)

(11) T4a Tumor que invade toda a cartilagem tireóide ou estende-se aos tecidos além da laringe, por exemplo, traquéia, partes moles do pescoço incluindo a musculatura profunda extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireóide e esôfago

(12) T4b Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente à artéria carótida

Subglote

(13) T1 Tumor limitado à subglote

(14) T2 Tumor se estende à (s) corda (s) vocal (is) com mobilidade normal ou reduzida

(15) T3 Tumor limitado à laringe **com** fixação da corda vocal

(16) T4a Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide ou cricóide ou estende-se aos tecidos além da laringe, por exemplo, traquéia, partes moles do pescoço incluindo a musculatura profunda extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireóide e esôfago

(17) T4b Tumor invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou envolve a carótida

(1) N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

(2) N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão

(3) N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão

(4) N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(5) N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contra laterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(6) N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

(1) M0 Ausência de metástase à distância

(2) M1 Metástase à distância ☐

A8 Existem amostras de tecido (biópsia ou espécime cirúrgico) disponíveis para o estudo?

☐

(0) Não

(1) Sim, tecido congelado

(2) Sim, outro tipo (especificar)

A9 Existem lâminas disponíveis para este estudo? ☐

(0) Não

(1) Sim , biópsia inicial

(2) Sim, espécimes cirúrgicos

(3) Ambos

POR FAVOR, ANEXE UMA CÓPIA DO LAUDO ANATOMO-PATOLÓGICO, SE DISPONÍVEL

A10 Fotocópia do laudo anatomo-patológico ☐

(1) Anexada; (2) Não-anexada

Parte B – Comorbidades [Por favor, coletar os dados dos prontuários médicos]

B1. Índice de comorbidades de Charlson

|||

Score para cada condição	Condição
1	Infarto Agudo do Miocárdio
1	Insuficiência cardíaca congestiva
1	Doença vascular periférica
1	AVC
1	Demência
1	DPOC
1	Doença do tecido conjuntivo
1	Úlcera
1	Insuficiência hepática moderada
1	Diabetes sem complicações
2	Hemiplegia
2	Insuficiência renal moderada ou grave
2	Diabetes com complicações
2	Qualquer tumor sólido (excluindo o tumor primário)
2	Leucemia
2	Linfoma
3	Moderate or severe liver disease
6	Tumor sólido metastático (excluindo o tumor primário)
6	AIDS

O score total é obtido através da soma dos scores parciais para as condições presentes:

Exemplo: um paciente com insuficiência cardíaca congestiva + DPOC + diabetes sem complicações terá scores parciais de 1+1+1 e, portanto um índice de comorbidades de Charlson = 3

Parte C – Informações sobre o tratamento

C1 Cirurgia para remoção do tumor primário? [Se ‘Não’, vá para a questão C4]

☐

(0) Não (1) Sim

C2 Esvaziamento cervical?

☐

(0) Não (1) Sim

C3 Data da realização da cirurgia:

--

Dia Mês

Ano

C4 Radioterapia? [se ‘Não’, vá para a questão C10]

☐

(0) Não (1) Sim

C5 Data do início da Radioterapia

--

Dia Mês

Ano

C6 Tipo de radioterapia:

☐

(1) RXT externa (2) Braquiterapia (3) Ambas

C7 Momento da realização da radioterapia

☐

(1) Radioterapia exclusiva (2) Pre-operatória (3) Pós-operatória
(4) RXT/QT concomitante

C8 Dose total de radiação aplicada (cGy)

|_|_|_|_| cGy

C9 Fracionamento alterado?

|_|

(0) Não (1) Sim

C10 Quimioterapia?

|_|

(0) Não (1) Sim

C11 Esquema de quimioterapia

|_|

(1) Somente cisplatina (2) 5-FU/Hidroxiuréia (3) Cisplatina/paclitaxel

(4) Cisplatina/infusão de 5-FU (5) Carboplatina/infusão de 5-FU

(6) Cetuximab (7) Docetaxel/cisplatina/5-FU (8) Outros esquemas

C12 Data do início da quimioterapia |_|_|-|_|_|-|_|_|

Dia Mês Ano

C13 Número total de ciclos de quimioterapia

|_|_|

C14 Resposta à quimioterapia – Tumor primário

|_|

(1) Resposta completa (2) Resposta parcial (3) < Resposta Parcial

(4) Progressão de doença

C15 Resposta à quimioterapia – Pescoço

|_|

(1) Resposta completa (2) Resposta parcial (3) < Resposta Parcial

(4) Progressão de doença