UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

**O papel da concentração salivar e sérica da
proteína SLPI (inibidor de protease secretada por
leucócitos) na progressão do carcinoma
epidermoide da cavidade bucal.**

Tarsila Guimarães Vieira da Silva

São Paulo
2018

**O papel da concentração salivar e sérica da
proteína SLPI (inibidor de protease secretada por
leucócitos) na progressão do carcinoma
epidermoide da cavidade bucal.**

Tarsila Guimarães Vieira da Silva

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em Saúde
Pública da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Natasha Toporcov

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

Versão Revisada

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Silva, Tarsila Guimarães Vieira da

O papel da concentração salivar e sérica da proteína SLPI (inibidor de protease secretada por leucócitos) na progressão do carcinoma epidermoide da cavidade bucal. / Tarsila Guimarães Vieira da Silva; orientadora Tatiana Natasha Toporcov; coorientadora Marcos Brasilino de Carvalho. -- São Paulo, 2018.
107 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Carcinoma Epidermoide. 2. Câncer de boca. 3. SLPI. 4. Metástase. I. Toporcov, Tatiana Natasha, orient. II. Carvalho, Marcos Brasilino de, coorient. III. Título.

Autorizo a reprodução e divulgação total e parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

Dedicatória

*Para o Grande Amor da
Minha vida, minha Mãe, Aurora
Guimarães.*

Agradecimentos

Primeiro agradeço à Nossa Senhora de Nazaré, minha padroeira que sempre me deu forças para continuar. Foi *Ela* quem me colocou diante de pessoas maravilhosas com quem cruzei durante esta jornada. E toda esta jornada não seria possível sem apoio, amor e compreensão imprescindível da minha família: Aurora Guimarães minha amada mãe, Tâmara Guimarães minha querida irmã, seu esposo Adailson Júnior e meu pai Fernando César!

Aos amigos mega importantes que me deram a força psicológica necessária para enfrentar a barra que é uma pós-graduação e juntos compartilhamos momentos mais felizes que tristes (ainda bem!): Priscila Scaff, Tânia Araújo, Isabela Martins, Tamara Petroni, Ludmila Naud, Ana Elisa Silva, Gabriela Akemi, Keila Taira e Izabella Rivelli.

Ao grupo de orientandos da “Tati”, pessoas maravilhosas e inteligentes: Gisele Fernandes, Suzan Brancher, Ana Elisa Ribeiro e Fabrício Menezes os quais tive mais contato e me ensinaram muita coisa. Devo a vocês! Foram momento únicos vivenciados. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Todo meu agradecimento à equipe show do laboratório de Inovação em Câncer, em especial às minhas amigas Rafaella Lima e Gabriela Ávila.

À equipe do Hospital Heliópolis que fez e faz um trabalho primoroso e incansável em nome da ciência. De lá, levarei aprendizagens importantes para minha vida como epidemiologista.

Aos senhores da banca, os quais com primor profissional e expertises admiráveis contribuíram com este estudo.

À Dra. Luisa Villa que com extrema cordialidade, doçura e prazer pela pesquisa cedeu seu tempo, seu extraordinário conhecimento e visão. Sinto-me uma privilegiada de ter convivido e aprendido com tamanha personalidade e caráter científico

Ao meu Coorientador Dr. Marcos Brasilino que me recebeu tão bem, de coração aberto no Hospital Heliópolis. E que mesmo com tanta experiência e anos de profissão não perdeu a fleuma de se questionar e tentar solucionar os desafios que a medicina lhe coloca todos os dias.

E finalmente à minha querida Orientadora Tatiana Toporcov que com sua sensibilidade, inteligência e sabedoria se doou da maneira mais inimaginável que eu poderia conceber. Ela percebeu minhas fraquezas assim como meus talentos, me ensinou a domá-los e me conduziu como uma verdadeira maestra. Uma verdadeira inspiração de como ser e de como fazer.

Obrigada!

*Que a mão do tempo e o hálito dos homens
Murchem a flor das ilusões da vida,
Musa consoladora, É no teu seio amigo e sossegado
Que o poeta respira o suave sono.”*
(Machado de Assis, *Crisálidas*)

Resumo

Silva TGV. **O Papel da expressão Tumoral e da Concentração Salivar e Sérica da Proteína SLPI (Inibidor de Protease Secretada por Leucócitos) na Progressão do Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal.** São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2018.

Introdução: A avaliação dos processos inflamatórios em pacientes com tumores de boca é assunto atual na literatura científica. Poucos estudos, entretanto avaliaram a expressão da Proteína Inibidora de Protease Secretada por Leucócito (SLPI), marcador específico de inflamação, em pacientes com câncer de boca. **Objetivos:** 1.Descrever a frequência da concentração de SLPI salivar e sérica em pacientes com câncer bucal. 2. Avaliar a associação dessas concentrações com características clínicas, sociodemográficas e de estilo de vida. **Metodologia:** Realizou-se a quantificação de SLPI em soro por meio do teste ELISA em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal atendidos no Hospital Heliópolis da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo no período entre 2011 e 2017. Dados relativos a estadiamento do tumor, características sócio demográficas dos pacientes, hábitos alimentares e estilo de vida foram coletados por meio de prontuários médicos e questionários aplicados aos pacientes. Foram realizados teste de correlação de Spearman e teste qui-quadrado para testar possíveis associações. **Resultados:** Foram encontradas: correlação positiva entre SLPI em saliva maços-ano de tabagismo ($p=0,03$) e correlação negativa entre SLPI bochecho para frequência no consumo de carne vermelha ($p=0,01$). A quantificação de SLPI em soro por quartis apresentou associação com significância estatística para escolaridade (maior proporção de pessoas com ensino médio completo no quartil mais baixo de SLPI), frequência de escovação dentária (maior proporção de pessoas que escovam os dentes mais do que uma vez por dia no quartil com maior SLPI) e estadiamento patológico (2º quartil com maior proporção de estadiamentos 3 e 4). Na avaliação de SLPI em saliva e bochecho, houve associação com o consumo de carne vermelha, havendo indivíduos com consumo mais baixo apenas nos quartis mais superiores de SLPI. **Conclusão:** Este estudo concorda com a hipótese de que o SLPI em pacientes com câncer de boca se relaciona com estilo de vida e estadiamento da lesão.

Palavras Chaves: Carcinoma Epidermoide, Câncer de boca, SLPI, Metástase.

Abstract

Silva TGV. The Role of Tumor Expression and Salivary and Serum Concentration of Protein SLPI (Protein Inhibitor Secreted by Leukocytes) in Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2018.

Introduction: The evaluation of inflammatory processes in patients with oral tumors is a current topic in the scientific literature. Few studies, however, have evaluated the expression of the Leukocyte Secreted Protein Inhibitor Protein (SLPI), a specific marker of inflammation in patients with oral cancer. **Objectives:** 1. To describe the frequency of salivary and serum SLPI in patients with oral cancer. 2. To evaluate the association of these concentrations with clinical, sociodemographic and lifestyle characteristics. **Methodology:** Serum SLPI was quantified by ELISA in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity treated at the Hospital Heliópolis of the State Health Department of the State of São Paulo in the period between 2011 and 2017. Data on staging of the tumor, socio-demographic characteristics of patients, eating habits and lifestyle were collected through medical records and questionnaires applied to patients. Spearman's correlation test and chi-square test were performed to test possible associations. **Results:** There was a positive correlation between SLPI in saliva and malnutrition SLPI ($p = 0.03$). The quantification of SLPI in serum by quartiles was associated with statistical significance for schooling (higher proportion of people with complete secondary education in the lowest quartile of SLPI), frequency of toothbrushing (a higher proportion of people brushing their teeth more than once per day in quartile with higher SLPI) and pathological staging (2nd quartile with a higher proportion of stages 3 and 4). In the evaluation of SLPI in saliva and mouthwash, there was an association with red meat consumption, with individuals with lower consumption only in the higher quartiles of SLPI. **Conclusion:** This study agrees with the hypothesis that SLPI in patients with oral cancer is related to lifestyle and staging of the lesion.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma, Oral Cancer, SLPI, Metastasis.

Lista de abreviaturas e siglas

SLPI	Inibidor de protease secretada por leucócitos
CEC	Carcinoma Espino Celular AKA Carcinoma Epidermoide.
GLOBOCAN	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer.
INCA	Instituto Nacional de Câncer.
HPV	Vírus Papiloma Humano.
EBV	Vírus Epstein Barr.
HSV	Vírus Herpes Simples.
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
NCI	Nacional Cancer Institute.
MEC	Matriz Extra Celular
EMT	Epitélio Mesenquimal.
MMP	Metaloproteínas.
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases.
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B.
CECB	Carcinoma Espinocelular de Boca.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Epidemiologia do Câncer	12
1.2 Inflamação e Câncer de boca.....	16
1.3 Proteínas envolvidas no processo metastático.	22
1.4 SLPI – Inibidor Secretor de Protease Leucocitária.....	25
1.5 Revisão de Literatura – Estudos de SLPI em Câncer de boca.....	26
2 - PROPOSIÇÃO	32
2.2 Objetivos gerais.....	32
2.3 Objetivos específicos	32
3 - MATERIAL E MÉTODOS:.....	33
3.1 Seleção dos casos	33
3.2 Coleta de dados	33
3.3 Coleta do material biológico	36
3.4 Análise quantitativa SLPI.....	37
3.5 Aspectos éticos:	38
3.6 Análises estatísticas	38
4 - Resultados	39
5 - DISCUSSÃO	66
5.1 Quantificação de SLPI no Soro	66
5.2 Quantificação de SLPI na Saliva e Bochecho	67
6 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO	70
7 - CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS:	86

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Epidemiologia do Câncer

Nas primeiras décadas do século XX, estudiosos começaram a perceber que crescimentos populacionais, associados ao desenvolvimento econômico, estavam transformando as organizações etárias em determinadas sociedades. A partir desta constatação, surgiram as primeiras teorias que chamamos hoje de transição demográfica. (VASCONCELOS & GOMES, 2012)

Atualmente, sabe-se que cada sociedade (continente, país, estado ou cidade) possui sua própria singularidade ao passar por esta transição, ou seja, pelo estágio de inversão de pirâmide etária; a qual é uma figura representativa da proporção das faixas etárias populacionais.

A população mundial, de maneira geral, e salvo algumas exceções, está ficando mais velha. O Brasil vem passando pela transição demográfica desde 1950, devido a uma série de fatores que facilitam o envelhecimento. No entanto, como consequência, a prevalência e incidência de inúmeras doenças não transmissíveis, entre elas, o câncer, vêm tornando-se cada vez mais objeto de estudo e monitoramento em diversas especialidades da saúde. (VASCONCELOS & GOMES, 2012)

A comunidade científica, apesar dos esforços diuturnos, ainda não conseguiu extrapolar a barreira da compreensão no que se refere a determinados aspectos que levam ao desfecho de inúmeros tipos de cânceres descritos na literatura.

Porém, concomitante a isto, em sua constatare reciclagem epistemológica na área, promove esforços técnicos na tentativa de preveni-lo, trata-lo e, não

menos importante, estabelecer melhores prognósticos a fim de mitigar taxas de mortalidade e/ ou aumentar as taxas de sobrevida dos pacientes diagnosticados.

Diante deste cenário, o câncer de cabeça e pescoço, que inclui uma variedade de tumores do revestimento mucoso, que acometem as vias aerodigestivas superiores e em sua maioria é representada por neoplasias epiteliais do tipo carcinoma epidermoide (CEC), é hoje, uma grande preocupação dentro da área da saúde. (DE SOUSA *et al.*, 2016; CAMPANA e GOIATO, 2013; SILVA *et al.*, 2009; DEDIVITIS *et al.*, 2004).

Dentro das neoplasias de cabeça e pescoço, está inserido o câncer da cavidade bucal. É a 15ª neoplasia maligna com maior incidência no mundo, o que corresponde a cerca de 3% de todos os tipos de câncer, sendo a 10ª neoplasia mais frequente entre os homens e a 17ª mais frequente entre as mulheres (MAKKAR *et al.*, 2016; FERLAY *et al.*, 2013; CANCELA *et al.*, 2010;).

No continente americano, estima-se que as taxas de incidência e mortalidade padronizadas por idade no mundo foram maiores nos Estados Unidos (incluindo Alasca) e Cuba para 2012. (FERLEY *et al.*, 2012) Em contrapartida, no Brasil a mortalidade geral é maior que os demais países das Américas. (Figura 1 e 2).

Ao estratificarmos esses dados por sexo no Brasil e observarmos as taxas brutas por 100.000 habitantes, estas são maiores para os homens. (Figura 3 e 4) De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o câncer bucal é a 4ª neoplasia mais frequente entre os homens, a 10ª mais frequente entre as mulheres e as estimativas para 2016, ainda de acordo com o Instituto do Câncer, para a cavidade bucal no Brasil é de 6.030 novos casos em homens e 2.300 casos em mulheres. (INCA, 2016).

Dados do *National Cancer Institute* (sigla em inglês, NCI) dos Estados Unidos estimam cerca de 49.670 novos casos de câncer de boca e faringe para o ano de 2017 e 9.700 mortes por esta neoplasia. Entre homens, é a oitava neoplasia mais frequente e com uma taxa de sobrevida de cinco anos de 65% (SIEGEL *et al.*, 2014). Entre os fatores que impactam na sobrevida, a presença de metástases linfáticas é a variável mais uniformemente citada (SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2016, BONFANTE *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2014;)

Figura 1 - Representação por gradiente de cores da taxa de incidência em câncer de boca no mundo, ambos os sexos, padronizada por idade em 2012.

Fonte: GLOBOCAN 2012 - IARC.

Figura 2 - Representação por gradiente de cores da taxa de mortalidade em câncer de boca no mundo, ambos os sexos, padronizada por idade em 2012.

Fonte: GLOBOCAN 2012 - IARC.

Os principais fatores de risco para o câncer de boca são o tabagismo, o consumo abusivo de bebida alcoólica e uma dieta pobre em frutas e vegetais. Existem outros fatores associados, que mesmo ainda não sendo consenso, são importantes objetos de estudos, como o fator hereditário, higiene bucal inadequada, imunodeficiências e infecções secundárias, que podem *talvez* estar relacionadas com o Papiloma Vírus Humano (sigla em inglês, HPV), Vírus Epstein Barr (sigla em inglês, EBV), Vírus Herpes Simples (sigla em inglês, HSV) e Vírus da Imunodeficiência Humana (sigla em inglês, HIV) (RIETBERGEN et. Al., 2018)

Figura 3 - Representação de estimativas das taxas brutas por 100.000 para neoplasia maligna de cavidade oral para homens e mulheres no Brasil, 2016

Fonte: INCA.

Figura 4 - Distribuição da proporção das estimativas para os tipos de cânceres mais incidentes entre homens e mulheres em 2016 –

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	25.800	26,9%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	29.760	30,3%
Cólon e Reto	10.040	10,5%			Cólon e Reto	9.910	10,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	7.870	8,2%			Colo do Útero	4.940	5,0%
Cavidade Oral	6.030	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	4.620	4,7%
Estômago	5.710	6,0%			Corpo do Útero	4.180	4,3%
Bexiga	4.160	4,3%			Estômago	3.420	3,5%
Esôfago	3.470	3,6%			Ovário	2.960	3,0%
Laringe	2.720	2,8%			Linfoma não Hodgkin	2.800	2,9%
Linfoma não Hodgkin	2.550	2,7%			Glândula Tireoide	2.680	2,7%
Leucemias	2.480	2,6%			Cavidade Oral	2.300	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA.

1.2 Inflamação e Câncer de boca

Os tumores da cavidade bucal do tipo carcinoma epidermoide se apresentam como lesões ulcero-infiltrativas, podendo apresentar ou não fundo friável e necrótico e, por sua capacidade de embolizar vasos linfáticos, as metástases regionais podem estar presentes em fases muito precoces da

doença. As taxas de controle da neoplasia e de sobrevida são significativamente associadas à extensão desta disseminação para os linfonodos cervicais. Entretanto, este padrão de disseminação é condicionado por uma série de características epidemiológicas, anatômicas, histológicas e moleculares, tanto inerentes ao tumor propriamente dito quanto do hospedeiro, por suas condições favoráveis ou de proteção ao desenvolvimento de metástases (LÓPEZ *et al.*, 2014; SALAZAR *et al.*, 2014).

No entanto, não é raro observar-se tumores iniciais que exibem metástases volumosas ou tumores primários extensos que custam a disseminar-se regionalmente ou à distância. É nesta direção que se voltam atualmente muitos centros de pesquisa que buscam identificar fatores moleculares que diferenciem tumores aparentemente semelhantes, mas de comportamento biológico e clínico diverso. Um bom exemplo são os relatos do comportamento peculiar dos carcinomas de orofaringe relacionados ao HPV que ocorrem em pacientes mais jovens, não etilistas, não tabagistas, com lesões primárias pequenas e com linfonodopatias extensas e que evoluem mais favoravelmente independentes do tratamento (LÓPEZ *et al.*, 2014; SALAZAR *et al.*, 2014).

A identificação de fatores clínicos, patológicos e moleculares que impactam no comportamento tumoral e no resultado do tratamento irá repercutir diretamente na personalização do tratamento. Em consequência, pacientes com tumores classificados como menos agressivos poderão se beneficiar de um tratamento mais conservador; e a conjunção de todas as armas terapêuticas disponíveis ficará reservada aos pacientes com carcinomas cujo comportamento biológico e a evolução clínica sejam antecipadamente vistos como desfavoráveis (CHUNG e SCHWARTZ, 2012; O'RORKE *et al.*, 2012).

O tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço apoia-se na aplicação combinada das três armas terapêuticas principais: cirurgia com radioterapia e/ou quimioterapia como coadjuvantes. A estratégia de escolha do esquema de tratamento é geralmente direcionada para a observação da localização e extensão da lesão primária, da presença de linfonodos cervicais suspeitos ou do potencial metastático da lesão primária e, com igual importância, o estado nutricional e as condições gerais de saúde do paciente. Entretanto, os resultados alcançados ainda são desapontadores e referem-se à recidiva local ou regional, a metástases à distância ou pela ocorrência de segundos tumores primários (COOPER *et al.*, 2012). A disseminação metastática do CEC da cavidade bucal se dá, na maior parte das vezes, pelos vasos linfáticos, sendo este um fator prognóstico importante da doença que leva à diminuição da sobrevida destes pacientes (SÜSLÜ *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013).

A metástase é um processo que depende de múltiplos passos para seu desenvolvimento, incluindo (i) Invasão local dos tecidos adjacentes pela célula tumoral; (ii) migração transendotelial das células neoplásicas para o interior dos vasos (intravasação); (iii) sobrevivência na corrente circulatória; (iv) extravasação; (v) proliferação no órgão alvo e formação de colônias no local secundário. Para que o processo metastático se inicie, as células tumorais necessitam perder a aderência célula-célula, ultrapassar a membrana basal e produzir enzimas capazes de degradar a matriz extracelular (MEC). Este processo inclui a ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (sigla em inglês, EMT), caracterizada pela alteração do fenótipo da célula tumoral, que perde características epiteliais e adquire propriedades de células mesenquimais. A migração destas células na MEC modificada resulta na invasão do tecido

conjuntivo adjacente e posteriormente do vaso capilar linfático ou sanguíneo. Considerando que as células tumorais chegam aos linfonodos por embolizar os vasos linfáticos, a ocorrência de metástase é dependente da densidade de vasos linfáticos na submucosa. Embora este princípio esteja bem estabelecido, muitas questões em relação aos mecanismos de disseminação linfática do tumor ainda permanecem sem resposta, tais como: (1) a disseminação se dá através da formação e invasão de novos linfáticos induzidos pelo tumor (linfoangiogênese) ou por expansão e invasão dos vasos linfáticos preexistentes na periferia do tumor? (2) quais são os mecanismos moleculares da linfoangiogênese? (3) o processo de invasão de células tumorais em vasos linfáticos é comparável ao que ocorre no sistema vascular sanguíneo? (4) a inibição da linfoangiogênese é uma estratégia terapêutica realista para a inibição da disseminação de células neoplásicas e a formação de metástase? (HANAHAN e WEINBERG, 2011; VAN ZIJL *et al.*, 2011; GARCIA-CARRACEDO *et al.*, 2010; LONGATTO *et al.*, 2007; PEPPER, 2001;).

De qualquer modo, a presença de vasos linfáticos intratumorais pode ser uma condição indispensável para que as células tumorais consigam chegar aos linfonodos, mas parece não ser suficiente. Beasley *et al.* (2002) utilizando simultaneamente marcadores de imunohistoquímica para vasos linfáticos (anticorpo anti-LYVE-1) e para citoqueratina de células escamosas (anticorpo anti-MNF116) observaram blocos tumorais dentro de alguns linfáticos peritumorais e uma correlação entre a alta densidade linfática e a presença de metástase linfonodal em carcinoma de orofaringe, correlação esta não encontrada nos tumores de boca e de laringe. A partir desses resultados, sugerem que a formação de vasos linfáticos intratumorais pode não facilitar

isoladamente o desenvolvimento de metástases linfonodais em todos os tipos de tumores de cabeça e pescoço (BEASLEY *et al.*, 2002).

Um ponto importante a se considerar sobre os vasos linfáticos no processo metastático é que diversos estudos demonstram que seu papel vai além de servir apenas como uma via de deslocamento da célula metastática. As células do endotélio vascular linfático secretam quimiocinas e outras proteínas capazes de induzir o potencial metastático da célula tumoral, assim como também exercem a função de aumentar o tempo de sobrevivência da célula metastática em trânsito no vaso linfático e de aumentar a tolerância imunológica do hospedeiro (KARAMAN e DETMAR, 2014).

Figura 5 - Esquema simplificado da cascata inflamatória e seus componentes que podem influenciar nas fases de progressão tumoral e por consequência, uma possível metástase

Fonte: CHAI et al.,2015

Contudo, mesmo se nos ativermos a estudar os fatores que predisõem para a ocorrência da disseminação regional, existem múltiplas variáveis a serem analisadas: influência do tumor primário no sítio específico da metástase, dimensão e espessura do tumor, padrão de invasão e uma infinidade de limitações fisiológicas, biológicas e químicas que estão gerindo a metástase (por exemplo, pH, espécies reativas de oxigênio, hipóxia, o microambiente que regula a disseminação do tumor pela secreção de metaloproteinases (sigla em inglês, MMPs), citocinas reguladoras e quimiocinas. (Figura 5), como por exemplo, a

proteína SLPI. (PARK *et al.*, 2013; SÜSLÜ *et al.*, 2013; VAN ZIJL *et al.*, 2011 *et al.*, 2011).

1.3 Proteínas envolvidas no processo metastático.

Geralmente, a progressão do tumor está integrada com o remodelamento tecidual, que proporciona um ambiente adequado para o crescimento do tumor, neoangiogênese, invasão e metástase. Dentre os múltiplos fatores envolvidos nesse processo estão as proteases expressas pelas células neoplásicas e por células do estroma tumoral, que podem ativar citocinas, fatores de crescimento e fatores de degradação dos componentes da matriz extracelular (VAN ZIJL *et al.*, 2011).

Como é sabido, o estroma tumoral tem uma relação direta com o comportamento das neoplasias, exercendo assim papel significativo para a progressão do CEC. Para que ocorram as etapas já mencionadas da metástase, a célula tumoral necessita que ocorra degradação proteolítica da matriz extracelular (MEC) por meio da ação de enzimas. Dentre as enzimas que desenvolvem o papel de degradadoras da MEC, destaca-se a família das metaloproteinases da matriz por sua extensa capacidade de degradar, processar, ativar ou inativar praticamente todos os componentes constituintes da MEC (VASCONCELOS *et al.*, 2013). As metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham papéis importantes em muitos processos fisiológicos e patológicos tais como o remodelamento tecidual, artrite, câncer e doença cardiovascular e essas atividades são reguladas por inibidores teciduais de metaloproteinases (sigla em inglês, TIMPs) (COLOMBO e RAHAL, 2008; CULHACI *et al.*, 2004). As MMPs constituem uma família de enzimas

proteolíticas dependentes do zinco que estão envolvidas na degradação e remodelamento de componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina, fibronectina e gelatina, e podem ser divididas em cinco subfamílias: (1) collagenases, (2) gelatinases, (3) estromelisinases, (4) MMPs tipo estromelisinases e (5) MMPs tipo membrana. Embora cumpram várias funções fisiológicas, há grande interesse no papel potencial das MMPs na disseminação do câncer (COLOMBO e RAHAL, 2008).

Numerosos estudos têm demonstrado que as MMPs atuam na quebra da membrana basal e na degradação do estroma intersticial, o que propicia a invasão das células neoplásicas e consequentemente a metástase (COLOMBO e RAHAL, 2008; NAVARRO *et al.*, 2006). Estudos pré-clínicos por meio de técnicas de imunoistoquímica ou RT-PCR demonstraram que o carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço expressa altos níveis de MMPs. Existem diversas MMPs identificadas como superexpressas em câncer de cabeça e pescoço, porém as mais comumente encontradas são MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, relacionadas à progressão tumoral (THOMAS *et al.*, 2005). Estudos demonstram que MMP-2 e MMP-9, pertencentes à subfamília das gelatinases, exercem a função de digestão do colágeno tipo IV, sendo ele o principal constituinte da membrana basal. A expressão aumentada dessas gelatinases no câncer oral e de laringe tem apresentado correlação com estágios avançados da doença, metástase linfonodal e pior prognóstico (THOMAS *et al.*, 2005; STETLER-STEVENSON *et al.*, 1993).

Outra enzima importante é a MT1-MMP, pertencente à subfamília das MMPs tipo membrana, que além de degradar colágeno tipo I e outros

componentes da matriz, ativa MMP-2, exerce um papel crítico no controle da atividade proteolítica dessa enzima (COLOMBO e RAHAL, 2008).

As MMPs têm uma superexpressão no tecido metastático, o que a correlaciona com um pior prognóstico. Estudos, *in vitro* e *in vivo*, indicam que a inibição de MMPs diminui o potencial de invasão e metástase de células neoplásicas, porém, quando aplicados à pesquisa clínica, esses inibidores se mostram falhos por não estarem associados a uma vantagem significativa na sobrevida dos pacientes. A inconsistência entre os estudos tem direcionado a uma reavaliação da atuação das MMPs no desenvolvimento do câncer e no desenho de novos alvos terapêuticos (COLOMBO e RAHAL, 2008).

Quanto à progressão do tumor, esta é comumente associada ao extenso remodelamento do tecido para proporcionar um ambiente adequado para o crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase. Neste sentido, as proteases expressas pelas células tumorais e/ou células estromais são fundamentais neste processo por causa da sua capacidade para ativar e liberar citocinas e fatores de crescimento e, também, de degradar componentes da matriz extracelular, as mesmas se tornam necessárias para prover as condições ideais para o crescimento e invasão de das células neoplásicas. A expressão de inibidores de proteases correspondentes é uma maneira de controlar a atividade destas enzimas e, dentre as classes dos inibidores de protease, os mais estudados tem sido os membros da classe dos inibidores de serino proteases (RYAN, 1990).

Os inibidores de serino proteases têm uma larga distribuição entre animais, plantas e microorganismos (ZHAO *et al.*, 2005), sendo classificados em

pelo menos 18 famílias de acordo com sua sequência primária, mecanismo de inativação e estrutura tridimensional. (LASKOWSKI e QASIM, 2000).

As proteínas inibidoras de protease apresentam um papel antiproteolítico por controlar a atividade de enzimas de degradação da matriz extracelular e, então, sua expressão no tecido neoplásico poderia inferir uma ação antitumoral. Por outro lado, inibidores de serino proteases (sigla em inglês, SPIs) que aparecem frequentemente superexpressos em diversos tipos de tumores, como por exemplo, em carcinoma colorretal e câncer de ovário, têm sido descritos como fatores que favorecem a progressão tumoral. Recentemente, investigadores relataram que os inibidores de serino protease também são bons substratos para as MMPs. Estudos realizados por Kataoka *et al.* (1999) relatam que a superexpressão do inibidor α 1-proteinase (α PI), um dos principais inibidores de serino protease da família das serpinas, potencializa a capacidade de crescimento de células da linhagem S2-020 (derivada da linhagem celular de adenocarcinoma do pâncreas humano SUIT-2) em ratos devido às clivagens em α PI provocadas por MMPs, resultando na inativação da atividade inibidora e a liberação de um fragmento carboxi-terminal (α PI- C). Essas observações ainda não foram feitas para nenhum dos SPIs da família do tipo kazal (DE OLIVEIRA MOURA *et al*, 2016, DEVOOGDT *et al.*, 2003).

1.4 SLPI – Inibidor Secretor de Protease Leucocitária.

A proteína inibidora de protease secretada por leucócitos (SLPI), também denominada antileucoprotease, foi descrita pela primeira vez em 1986 e purificada a partir de secreções da parótida humana por Thompson e Ohlsson.

O gene *slpi* que codifica a proteína SLPI está localizado na posição 1.2 do braço longo do cromossomo 20 (20q1.2), abrange uma região de 2,65 quilobases e consiste em 4 éxons e 3 íntrons. O SLPI é uma proteína não glicosilada do tipo kazal, possui 107 aminoácidos separados em dois domínios, cada um dos quais contendo quatro pontes dissulfeto e é produzida por diferentes tipos de células, incluindo as do endométrio, mama, pulmão, ovário, glândulas salivares e células imunológicas como neutrófilos, macrófagos e linfócitos B. A proteína SLPI tem sido descrita em diversos estudos com papel na inibição de elastase secretada por leucócitos, catepsina G, quimiotripsina e tripsina, enzimas que têm a propriedade de degradar a matriz extracelular e então se associam ao desenvolvimento, invasão e progressão do câncer (CORDES *et al.*, 2011).

A SLPI é uma proteína pleiotrópica, com papel principal na inibição de proteases inflamatórias, mas também na proteção contra a infecção por HIV, ativação da via NF- κ B, lise de bactérias, cicatrização de feridas e modulação da função de macrófagos (CORDES *et al.*, 2011; DEVOOGDT *et al.*, 2003; THOMPSON e OHLSSON, 1986).

1.5 Revisão de Literatura – Estudos de SLPI em Câncer de boca

Os primeiros estudos publicados com este inibidor datam de 1988, sendo em sua maioria ainda realizados em animais. Por conseguinte, evoluiu para estudos em humanos e à desfechos tanto em doenças transmissíveis quanto em não transmissíveis, sendo estes dados compilados deixando cada vez mais claro sua importância como elemento de nossa imunidade inata.

Ao estabelecermos esta cronologia, os estudos que relacionavam o SLPI com câncer de cabeça e pescoço surgiram a partir do Início do século XXI (WESTIN *et al.*, 2001), logo após o importante conhecimento gerado pelo estudo

conduzido por Shugars et al, 2001 o qual observou que a quantidade desta proteína na saliva diminui com o avanço da idade. Tal conhecimento foi logo depois corroborado com o estudo de Coorte com o intuito de estudar o HPV em homens homossexuais HIV negativos (RAHMAN et al., 2016; CAMPBELL et al., 2016).

A cada publicação e com a compreensão de que o HPV possui uma influência para o desfecho do câncer de cabeça e pescoço, desde a observação do vírus dentro da lesão (LACK et al.,1980; SYRJANEN et al.,1982), os estudos passaram a direcionar a investigação de maneira estratificada entre os diagnosticados com carcinoma epidermoide que eram HPV positivos e os HPV negativos, o qual ainda é um objeto importante de estudo (WEN et al.,2011; OU et al., 2017).

Estudos, então, passaram a mostrar que a expressão da proteína SLPI nas células neoplásicas do carcinoma oral pode ter impacto sobre a progressão tumoral, onde normalmente o potencial invasivo da célula depende da ativação de diversas proteases, tais como a plasmina, que já foi positivamente correlacionada com parâmetros histológicos de invasão tumoral por seu potencial de remodelamento da MEC. A plasmina é derivada da clivagem do plasminogênio. A proteína SLPI pode bloquear a ligação entre o plasminogênio e a anexina a2, suprimindo essa clivagem e a posterior produção de plasmina (WEN *et al.*, 2011; SELDERS et al.,2017).

A expressão da proteína SLPI tem sido associada com a carcinogênese e metástases de vários tipos de câncer, mas ainda de modo controverso. Em tumores gástricos e prostáticos, a expressão aumentada de SLPI relaciona-se com invasão, metástase e pior prognóstico. (THOMPSON *et al.*, 2008; Du *et*

al.,2017). Por outro lado, no câncer de ovário, a expressão elevada de SLPI associa-se com redução da ocorrência de metástases (NAKAMURA *et al.*, 2008; RASOOL *et al.*,2011).

No câncer de cabeça e pescoço, a proteína SLPI aparece superexpressa no tecido neoplásico quando comparado ao tecido normal, mas os dados de correlação com invasão e o aparecimento de metástases são controversos. Cordes *et al.* (2011) em um estudo de comparação entre tumores metastáticos e tumores não metastáticos de CEC observaram que a SLPI pode ter um efeito protetor, inibindo o processo metastático. E antes deste estudo, Westin *et al.*(2002) observaram que tumores de cabeça e pescoço bem diferenciados expressam mais SLPI quando comparados com tumores pouco diferenciados e que a maior expressão desse inibidor de protease está associada com disseminação regional reduzida. Ainda não existem estudos mais atuais em câncer de boca que corroborem ou não com estes dados.

Noorlag *et al.*(2014) associaram a expressão da proteína SLPI no tumor com metástases linfáticas e sobrevida de pacientes com câncer espinocelular de boca (CECB) . A expressão do SLPI foi correlacionada com metástases linfonodais na coorte. Quanto menor a expressão do gene *sipi* maior era a ocorrência de metástase. No entanto, nesse estudo, o subgrupo de tumores precoces e clinicamente com linfonodos negativos, demonstrou que a expressão do gene *sipi* não tem nenhuma significância na determinação de metástases linfáticas. Por outro lado, pacientes com baixa expressão da proteína SLPI tiveram uma baixa sobrevida, sugerindo uma possível utilização da proteína SLPI como marcador prognóstico da doença (NOORLAG *et al.*, 2014). No ano seguinte, o mesmo autor encontrou uma correlação entre metástase linfonodal

com toda a coorte acompanhada no estudo (212 pacientes), porém sem ainda observar correlação para cada subgrupo de classificação de metástases linfáticas. (NOORLAG *et al.*, 2015)

Estudo desenvolvido por Zhang *et al.* (1997) demonstra que a proteína SLPI também funciona como um agente anti-inflamatório potente, já que interfere com a via de transdução de sinal que conduz monócitos à produção de MMP. Este efeito se mostrou independente das propriedades inibidoras de protease, já que no estudo foram utilizadas versões alteradas da proteína SLPI, onde trocaram a leucina 72, que é descrita na literatura como o sítio inibidor de elastase, por glicina, fenilalanina, arginina, lisina ou valina. Para a avaliação da proteína SLPI quanto ao seu efeito sobre esses eventos de sinalização, monócitos foram ativados por concanavalina e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) para a produção de prostaglandina, uma molécula que está envolvida na via de sinalização da produção de MMPs. A proteína SLPI foi adicionada e, quando presente, levou à supressão da enzima *prostaglandin H synthase-2* (PGHS-2) de monócitos, o que reduziu a síntese de prostaglandina e, consequentemente, a inibição da produção de MMPs (ZHANG *et al.*, 1997). Anos mais tarde, através de diferentes ferramentas metodológicas, Wen *et al.* (2011) conseguiram corroborar com estes dados.

Sabidamente, não podemos esquecer que todos estes eventos descritos ocorrem em um microambiente no qual a lesão está inserida, e talvez, em completa interação com o principal veículo que contém SLPI: a saliva.

A cavidade oral possui, num espaço diminuto, diferentes tipos de habitats microbianos como os dentes, sulco gengival, língua, mucosa jugal, palato duro, palato mole e lábio. É denominado de microbiota oral, os microorganismos que

são encontrados nestas localizações anatômicas. (DEWHIRST et al., 2010). Sugere-se que desde as primeiras semanas de vida a expressão do SLPI é estimulada a partir do momento que a criança inicia o desenvolvimento de seu próprio microbioma oral (MENCKEBERG et al., 2015).

Outros estudos confirmaram a presença deste inibidor também no sangue e em diferentes regiões anatômicas como: pulmão, fígado, estômagos, cérebro, útero e gônadas masculinas, mais especificamente no líquido seminal. (POSSAMAI et al., 2014; ZHENG et al., 2016; HABGOOD et al., 2016; MIKAMI., 2016; DU et al., 2017; OLEWICZ-GWALIK et al.)

Contraditoriamente a estes fatos, não existem, até o presente momento, publicações que tenham explorado correlações ou associações das quantificações de SLPI no soro de pacientes diagnosticados com CECB.

Diante disto, é fundamental estabelecer critérios investigativos, a fim de explorar tópicos necessários para a discussão que vem sendo construída ao longo das décadas no que diz respeito ao SLPI.

Tabela 1: Revisão bibliográfica das publicações de quantificação de SLPI em saliva por teste ELISA “Human SLPI” nos últimos quatro anos.

SLPI NA SALIVA										
AUTORES TÓPICOS	Tipos de estudo	Pontos de Corte em SLPI (Ng/mL)	Câncer de Cabeça e Pescoço	Apenas Câncer de Boca	Emprego da Técnica ELISA	Associação com Tabagismo	Associação com Etilismos	Carcinoma Epidermoide	População Brasileira	Principais resultados
<i>Kawahara et al, 2016</i>	Exploratório			X				X	X	SLPI não foi significativo como biomarcador
<i>Rahman et al, 2016</i>	Transversal				X	X	X		X	SLPI varia muito de acordo com idade e nacionalidade.
<i>Campbell et al, 2016</i>	Caso-Controlle		X		X	X		X		Fumantes com alta concentração de SLPI foram associados ao risco de desenvolver HNSC
<i>Yang et al, 2014</i>	Caso-Controlle			X				X		Hipóteses de utilização de SLPI como biomarcador e como opção de Tratamento
<i>Campbell et al, 2013</i>	Transversal Exploratório		X		X					Sem associação

2 - PROPOSIÇÃO

2.2 Objetivos gerais

Avaliar a associação da concentração de SLPI em saliva, bochecho e soro com características clínicas, sociodemográficas e de estilo de vida de pacientes com câncer de boca no Hospital Heliópolis (município de São Paulo, Brasil).

2.3 Objetivos específicos

- Descrever a concentração salivar e sérica de SLPI em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.
- Correlacionar as concentrações de SLPI com dados sociodemográficos, clínicos e de hábitos de vida em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Seleção dos casos

Trata-se de um estudo transversal e possui um caráter exploratório e descritivo das quantificações de SLPI nos indivíduos selecionados.

Foram incluídos, no presente estudo, pacientes atendidos no Hospital Heliópolis da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, localizado no município de São Paulo, atendidos no período de Janeiro de 2011 à Fevereiro de 2017. Esses pacientes tiveram dados coletados para o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº 2004/12054-9 e 2010/05168-0) iniciado em 2002, com acompanhamento até a atual data. Para o presente estudo, foram considerados os pacientes diagnosticados de acordo com a classificação do Código Internacional de Doenças (CID-10) com CEC da cavidade bucal, compreendendo os sítios C02 (Língua), C04 (assoalho da Boca) em todos os estágios anatomopatológicos TNM (OMS, 1997; TNM, 2012).

Foram excluídos os pacientes com histórico de neoplasia prévia de qualquer outro sítio anatômico, diagnóstico de doença autoimune ou infecção por HIV conhecidas e que não possuíam material histológico suficiente para as análises. Os dados clínicos, anatomopatológicos e de seguimento foram recuperados do prontuário médico.

3.2 Coleta de dados

As variáveis analisadas nesta investigação são provenientes da união de informações advindas do questionário padrão confeccionado e validado pela equipe de pesquisadores do projeto GENCAPO (Head and Neck Genome

Project). Foram utilizados prontuários médicos para dados clínicos e um segundo questionário de acompanhamento para obter informações no que diz respeito aos dados histopatológicos, estadiamento e status dos pacientes.

Uma equipe foi designada e treinada previamente para a coleta destas informações, com o objetivo de amenizar possíveis vieses de informação.

As variáveis qualitativas consideradas para o estudo foram ordenadas em blocos, e estas seguem descritas abaixo com suas respectivas categorias:

1) Bloco Sócio demográfico

- Sexo: Registrado através dos prontuários, previamente a entrevista. Onde 1.Masculino e 2.Feminino
- Tipo de Parto: Reportado pelo paciente no momento da entrevista. Classificado como 1.Normal, 2. Cesária e 9. Não sabe.
- Grau de Escolaridade: Questionado ao paciente até a série escolar que ele se formou. Foi considerado 0.para analfabeto; 1. Alfabetizado, mas sem frequentar a escola; 2. Ensino fundamental incompleto; 3. Ensino fundamental completo; 4. Ensino médio completo; 5. Ensino superior completo.
- Raça: Esta variável é auto reportada. É questionado ao paciente qual a cor da sua pele. 1.Branco; 2.Negro; 3.Pardo; 4.Amarelo e 5. Indígena.

2) Bloco de Hábitos e Estilo de Vida

- Tabagismo: Fuma ou fumou em média um cigarro, charuto, narguile ou cachimbo regularmente por pelo menos um ano, com as opções 1. Sim, ainda; 2. Somente no passado e 3. Não, nunca.
- Etilismo: Ingere bebidas alcoólicas. 1. Sim, ainda; 2. Somente no passado e 3. Não, nunca.

- Frequência de consumo de álcool: Quando a resposta for positiva à ingestão de bebida alcoólica é solicitado ao paciente que indique quantas vezes por semana ele consome esta bebida. Aonde a indicação vai de 1 (uma) até 7 (sete) vezes por semana.
- Frequência de consumo de álcool antes do meio dia: Ainda considerando a resposta positiva à ingestão de bebida alcoólica é solicitado ao paciente que indique quantas vezes por semana ele consome esta bebida antes do meio dia. A indicação vai de 1 (uma) até 7 (sete) vezes por semana.
- Ingestão de Café: Ingere ou já ingeriu café. 1.Sim; 2. Somente no passado; 3.Não, nunca.
- Consumo de Legumes e Verduras; consumo de Frutas; consumo de Frutas Cítricas e Consumo de Carne Vermelha: Para estas variáveis é solicitado ao paciente reportar com qual frequência ele consumia estes alimentos antes de ficar doente. 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 e 6.Todos os dias.
- Uso de Fio Dental: Frequência que utiliza fio ou fita dental. 1.Não; 2.Sim, às vezes e 3.Sim, sempre
- Escovar os Dentes: Frequência que escova os seus dentes. 0.Nunca; 1.Menos de uma vez por semana; 2.De 1-2 vezes por semana; 3. Dia sim, dia não; 4. Uma vez por dia; 5.Duas vezes ao dia; 6.Três vezes ao dia; 7. Mais de três vezes ao dia e 8.Edêntulo (não tem dentes).
- Visita ao dentista: Frequência de ida ao dentista nos últimos 20 anos. 1.Todos os anos; 2.A cada 2-5 anos; 3.A cada seis anos ou raramente; 4.Nunca.

3) Bloco Clínico Patológico

- Estadiamento Patológico T e N: Variáveis preenchidas pelo histopatologista responsável do Hospital Heliópolis. No formulário é reportada a classificação pT e pN.
- Estadiamento Clínico TNM: Classificado pelo histopatologista responsável no Hospital Heliópolis em 1. Lábio e cavidade oral; 2.Orofaringe; 3.Hipofaringe; 4.Laringe-glote; 5.Laringe supra-glote; 6. Laringe sub-glote; 7. Laringe trans-glote.
- Infiltração Vascular Sanguínea, Infiltração Linfática e Infiltração Perineural: Variáveis avaliadas pelo Histopatologista responsável no Hospital Heliópolis. 1.Presente; 2. Ausente; 9.Não avaliável.
- Diabetes: Se alguma vez já foi diagnosticado com diabetes. 1.Sim e 2. Não
- Prótese dentária: Utiliza prótese removível. 1.Sim; 2. Não

3.3 Coleta do material biológico

As coletas da saliva, soro e bochecho foram realizadas com o paciente em jejum, no momento da internação do mesmo, antes da cirurgia ou do início do tratamento quimioterápico/radioterápico, em conjunto com o questionário e o Termo de consentimento livre e esclarecido.

A saliva foi coletada de duas formas distintas: a primeira na forma de bochecho estimulado com soro fisiológico 0,9 %. A segunda, na sua forma absoluta numa quantidade máxima de 5 ml.

Caso o paciente sentisse dor ou houvesse sangramento da lesão, a coleta de saliva era cancelada.

Neste contexto, totaliza-se um conjunto amostral de 39 pacientes com soro, 41 pacientes com saliva e 41 pacientes com bochecho.

O acondicionamento destes materiais foi realizado em freezer -80°C e preservado com inibidor de Protease SIGMAFAST™.

3.4 Análise quantitativa SLPI

O SLPI foi quantificado através da técnica ELISA utilizando o kit Human SLPI Quantikine ELISA (DP100, R&D Systems, Minneapolis, MN, US). O protocolo seguiu as recomendações do fabricante, sendo construída uma curva padrão interlog de Human SLPI e OD para cada leitura (Anexo 1 a 4). As quantificações geradas a partir dos testes de ELISA Human SLPI foram inicialmente em picogramas por mililitros (Pg/mL) para posteriormente serem convertidas em nanogramas por mililitros (Ng/mL), salvaguardando as respectivas curvas padrões de cada placa testada.

As amostras de soro, saliva e bochecho foram diluídas respectivamente numa concentração de 1:20, 1:100, 1:200, 1:250 e 1:500 utilizando o diluente calibrador RD5T e 100 µL de cada amostra foram distribuídas na placa de leitura em duplicatas ou triplicatas. Durante o preparo das amostras, foi utilizado um agitador de tubos de ensaio com tempo padronizado de mistura do diluente com a amostra e, em seguida, realizada centrifugação para garantir a separação do sobrenadante. Na placa do teste, foram consideradas regiões sem amostra a fim de garantir que não ocorreu contaminação de material biológico entre os poços de leitura.

3.5 Aspectos éticos:

O Projeto GENCAPO II foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa sob o registro 851 e pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa sob o registro 16491, sob o parecer nº 128/2012, processo de nº 25000.084206/2001-75.

O presente estudo está registrado no Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP (Anexo 5).

Esta investigação ofereceu riscos mínimos ao participante, sendo este podendo estar sujeito a algum desconforto e constrangimento que o questionário possa ter oferecido, sem, contudo, oferecer riscos a sua integridade física.

Os resultados obtidos desse trabalho serão enviados à publicação em revista científica, garantindo a confidencialidade dos dados e o respeito aos indivíduos envolvidos.

3.6 Análises estatísticas

Para descrever a concentração de SLPI em saliva, soro e bochecho, foram apresentadas as medianas e desvios padrão. Para avaliar visualmente a relação entre essas medidas e as outras variáveis, foram construídos gráficos de dispersão e realizado teste de correlação de Spearman, com nível de significância estatística de $p=0,05$. Também, os valores de SLPI foram estratificados em quartis, e testada associação com as variáveis categóricas por meio do teste qui-quadrado, com nível de significância estatística de $p=0,05$. Por esta investigação possuir um caráter exploratório, os dados foram analisados descritivamente utilizando os programas STATA SE 11 e Microsoft Office Excel.

4 - Resultados

As proporções populacionais dos respectivos conjuntos amostrais para cada variável selecionada e de acordo com a quantificação de SLPI estão descritas com maior detalhamento nas tabelas de 6 a 13.

No entanto, vale destacar para o grupo amostral em saliva e bochecho, 7,5 % dos indivíduos são do sexo feminino; 90% destes fuma ou já fumou e 85% já foi exposto ao álcool por algum tempo na vida.

No grupo amostral em soro cerca de 86,5% dos indivíduos reportaram possuir hábitos de consumo de álcool e cigarro.

Abaixo, são apresentados os valores descritivos das quantificações de SLPI em Ng/mL para soro, saliva e bochecho. Nota-se que os valores de SLPI em soro e bochecho são inferiores aos de saliva.

Tabela 2 - Quantificação em soro dos pacientes com Carcinoma Epidermoide do Hospital Heliópolis, São Paulo, SP

DESCRITIVA SLPI EM SORO					
N	MEDIA	MEDIANA	DP	MIN	MAX
39	53,570	52,010	14,030	28,350	74,550

Tabela 3 - Quantificação em saliva dos pacientes com Carcinoma Epidermoide do Hospital Heliópolis, São Paulo, SP

DESCRITIVA SLPI EM SALIVA					
N	MEDIA	MEDIANA	DP	MIN	MAX
41	348,92	328,92	256,78	22,57	1163,57

Tabela 4 - Quantificação em bochecho dos pacientes com Carcinoma Epidermoide do Hospital Heliopolis, São Paulo, SP.

DESCRIPTIVA SLPI EM BOCHECHO					
N	MEDIA	MEDIANA	DP	MIN	MAX
41	175,539	182,37	89,84	23,27	326,964

Ao se estratificar por histórico de consumo de tabaco, verifica-se que aqueles que fumaram mais do que 21 maços-ano apresentaram valores de SLPI em saliva consistentemente maiores do que os que fumaram menos ou nunca fumaram.

Tabela 5 - Quantificação de SLPI de acordo com o consumo de cigarro maços ano dos pacientes com Carcinoma Epidermoide do Hospital Heliopolis, São Paulo, SP.

Consumo de Cigarro	≤21 Maços ano			≥22 Maços anos		
	Soro	Saliva	Bochecho	Soro	Saliva	Bochecho
Média	57,3	260,0	170,4	154,4	372,2	167,3
Mediana	64,0	218,1	194,4	170,4	347,8	181,0
DP	15,9	165,2	66,6	79,4	231,0	84,5
Mínimo	36,3	50,5	83,1	66,6	22,6	23,3
Máximo	74,5	467,2	257,2	257,2	689,6	302,1

A seguir, apresentam-se os gráficos de dispersão entre SLPI em soro (lado esquerdo de cada gráfico) e em saliva (lado direito) e cada variável independente estudada. Embora, para a maior parte das variáveis, não tenha havido associação linear, verificou-se discreta associação positiva (*borderline*) entre idade e SLPI em soro e correlação positiva entre maços-ano de tabagismo e SLPI em saliva.

Gráficos 1 e 2 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para a variável Faixa etária. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 3 e 4 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para as variáveis Grau de escolaridade. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 5 e 6 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para a variável hábito de ingestão de bebida alcóolica. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 7 e 8 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para a variável Hábito de fumar. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 9 e 10 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para frequência de consumo de álcool na semana. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 11 e 12 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para a frequência (dias) deste consumo antes do meio dia. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 13 e 14 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para a variável diabetes. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 15 e 16 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para frequência de consumo de Legumes e verduras. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 17 e 18 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para frequência do consumo de carne vermelha. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 19 e 20 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e Saliva (n=41) para frequência uso de fio dental. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 21 e 2 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e saliva (n=41) para eventos de sangramento gengival. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 23 e 24 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e saliva (n=41) para uso de prótese removível. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 25 e 26 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e saliva (n=41) para Estadiamento patológico por grupo. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 27 e 28 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e saliva (n=41) para Score de metástase linfonodal. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

Gráficos 29 e 30 - Quantificação de SLPI em soro (n=39) e saliva (n=41) para consumo de cigarro maços ano. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman

A seguir, apresentam-se gráficos de dispersão para os valores de SLPI em bochecho. Aqui, foram apresentadas apenas as variáveis que apresentaram associação linear estatisticamente significativa. Nota-se correlação negativa com consumo de carne vermelha e positiva com estadiamento patológico.

Gráficos 32 e 33 - Quantificação de SLPI em bochecho (n=41) com significância estatística em frequência de consumo de carne e Estadiamento T Patológico. *Valor de p referente ao teste de correlação de spearman.

São apresentadas, a seguir, tabelas de acordo com a distribuição dos quartis de SLPI em soro (tabelas 6 a 9), saliva (tabelas 10 a 12) e bochecho (tabela 13).

Para SLPI em SORO, nota-se associação com: 1. escolaridade (tabela 6), havendo maior proporção de pessoas com ensino médio completo no primeiro quartil (ou seja, valores mais baixos) de SLPI; 2. consumo de álcool antes do meio-dia mais do que 3 dias por semana (tabela 7), com maior proporção de consumidores no terceiro e no quarto quartis de SLPI; 3. uso de fio dental (tabela 8), com maior proporção de uso no primeiro quartil, em comparação com os outros; 4. Frequência de escovação (tabela 8), com maior proporção de uso no último quartil, em comparação com os outros; 4. estadiamento patológico (tabela 9), com maior proporção de pacientes com estadiamento 4 no segundo quartil.

Para SLPI em SALIVA, nota-se associação com: 1. raça (tabela 10), com maior proporção de pessoas de cor da pele branca no terceiro quartil de SLPI e menor proporção no 4º quartil; 2. consumo de carne vermelha (tabela 11), sendo que o terceiro quartil foi o único que apresentou pessoas que ingeriam o alimento com baixa frequência (até duas vezes por semana).

Para SLPI em BOCHECHO, nota-se associação apenas com a frequência de consumo de carne vermelha (tabela 13), sendo que o quarto quartil foi o único que apresentou indivíduos com frequência de consumo mais baixa.

Ressalta-se, entretanto, que as associações acima citadas não demonstraram efeito-dose resposta em variáveis com mais de duas categorias.

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis para variáveis

Sócio econômicas.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
sexo										0,787
masculino	8	88,89	9	90	9	100	8	88,9	34	
feminino	1	11,11	1	10	0	0	1	11,1	3	
Total	9		10		9		9		37	
parto										0,300
normal	7	77,78	10	100	8	100	8	88,9	33	
cesária	2	22,22	0	0	0	0	1	11,1	3	
Total	9		10		8		9		36	
Faixa Etária										0,256
21-41 anos	1	12,5	0	0	0	0	0	0	1	
40-49 anos	4	50	0	0	1	11,11	2	22,2	7	
50-59 anos	3	37,5	4	44,44	7	77,78	5	55,6	19	
>60 anos	0	0	5	55,56	1	11,11	2	22,2	8	
Total	8		9		9		9		35	
grau de escolaridade										0,06**
analfabeto	0	0	1	10	0	0	1	11,1	2	
alfabetizado sem freq escola	0	0	0	0	2	22,22	0	0	2	
ensino fundamental incomp	3	33,33	7	70	4	44,44	5	55,6	19	
ensino fundamental comp	1	11,11	1	10	3	33,33	0	0	5	
ensino médio comp	5	55,56	1	10	0	0	3	33,3	9	
ensino superior comp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	9		10		9		9		37	
raça										0,883
branco	4	44,44	6	66,67	5	55,56	4	44,4	20	
negro	1	11,11	1	11,11	1	11,11	2	22,2	5	
pardo/mulato	3	33,33	2	22,22	3	33,33	2	22,2	10	
amarelo	1	33,33	0	0	0	0	0	0	1	
indígena	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	9		9		9		9		36	

**Menor valor de P do teste de qui-quadrado deste bloco de variáveis

Tabela 7 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis para variáveis de hábitos de vida

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
bebe ou bebeu por 1 ano										0,847
sim	4	44,4	6	60	7	77,8	5	55,6	22	
somente no passado	3	33,3	3	30	1	11,1	3	33,3	10	
não	2	22,2	1	10	1	11,1	1	11,1	5	
Total	9		10		9		9		37	
Frequência de consumo de álcool na semana										0,535
Até 3 dias na semana	4	40,0	3	30	1	11,1	2	22,2	10	
Mais de 3 dias na semana	6	60,0	7	70	8	88,9	7	73,8	28	
Total	10		10		9		9		38	
Frequência de consumo de álcool antes do meio dia										0,085**
Até 3 dias na semana	5	50,0	5	50	1	11,1	1	11,1	12	
Mais de 3 dias na semana	5	50,0	5	50	8	88,9	8	88,9	26	
Total	10		10		9		9		38	
fuma ou fumou por 1 ano										0,847
sim	5	55,6	7	70	8	88,9	5	55,6	22	
somente no passado	3	33,3	2	20	0	0,0	3	33,3	10	
não	1	11,1	1	10	1	11,1	1	11,1	5	
Total	9		10		9		9		37	
ingere café										0,540
sim	7	77,8	9	100	7	87,5	5	83,3	28	
somente no passado	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	
não	2	22,2	0	0	1	12,5	1	16,7	4	
Total	9		9		8		6		32	

** Menor valor de p para teste de qui-quadrado neste bloco de variáveis

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis quanto aos hábitos e cuidados com higienização oral.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
uso de prótese removível										0,204
sim	7	77,8	4	44,4	2	28,6	4	66,7	17	
não	2	22,2	5	55,6	5	71,4	2	33,3	14	
Total	9		9		7		6		31	
uso de fio dental										0,081**
não	3	33,3	9	100,0	6	85,7	4	66,7	22	
sim, às vezes	3	33,3	0	0,0	1	14,3	1	16,7	5	
sim, sempre	3	33,3	0	0,0	0	0,0	1	16,7	4	
Total	9		9		7		6		31	
nº de vz que escova os dentes										0,043*
Uma vez por dia ou nunca	4	57,1	5	71,4	3	42,9	0	0,0	12	
mais de uma vez por dia	3	42,9	2	28,6	4	57,1	7	100,0	16	
Total	7		7		7		7		28	
Frequencia de visitas ao dentista nos últimos 20 anos										0,244
todos os anos	2	22,2	1	11,1	0	0,0	1	16,7	4	
a cada 2-5 anos	4	44,4	1	11,1	4	50,0	2	33,3	11	
a cada 6 anos ou raramente	3	33,3	5	55,6	1	12,5	3	50,0	12	
nunca	0	0,0	2	22,2	3	37,5	0	0,0	5	
Total	9		9		8		6		32	
diabetes										0,594
sim	0	0,0	1	11,1	1	12,5	0	0,0	2	
não	9	100,0	8	88,9	7	87,5	6	100,0	30	
Total	9		9		8		6		32	

** Menor valor de p para teste de qui-quadrado neste bloco de variáveis; *Variável com significância estatística para teste de qui-quadrado.

Tabela 9 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis quanto a características clínica e patológicas.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
Estadiamento Patológico por grupo										0,02*
1	2	22,2	0	0	1	12,5	4	57,1	7	
2	6	66,7	2	25	4	50	3	42,9	15	
3	1	11,1	5	62,5	1	12,5	0	0,0	7	
4	0	0	1	12,5	2	25	0	0,0	3	
Total	9		8		8		7		32	
Estadiamento Clínico por grupo										0,512
0	0	0	1	10	0	0	0	0,0	1	
1	4	40	0	0	1	11,1	3	33,3	8	
2	3	30	5	50	5	55,6	5	55,6	18	
3	2	20	2	20	1	11,1	0	0,0	5	
4	1	10	2	20	2	22,2	1	11,1	6	
Total	10		10		9		9		38	
Score N patológico										0,769
N+	5	55,6	3	37,5	3	37,5	4	57,1	15	
N-	4	44,4	5	62,5	5	62,5	3	42,9	17	
Total	9		8		8		7		32	

*Variável com significância estatística pelo teste de qui-quadrado

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em Saliva por quartis para variáveis Sócio econômicas.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
sexo										0,329
masculino	9	81,82	9	90	9	100	10	100	37	
feminino	2	18,18	1	10	0	0	0	0	3	
Total	11		10		9		10		40	
parto										0,209
normal	9	81,12	10	100	7	77,78	10	100	36	
cesária	2	18,18	0	0	2	22,22	0	0	4	
Total	11		10		9		10		40	
Faixa Etária										0,945
21-41 anos	0		0		0		0		0	
40-49 anos	3	27,27	2	20	3	33,33	2	22,2	10	
50-59 anos	6	54,55	5	50	4	44,44	6	66,7	21	
>60 anos	2	18,18	3	30	2	22,22	1	11,1	8	
Total	11		10		9		9		39	
grau de escolaridade										0,928
Incompleto ou Analfabeto	7	63,64	7	70	5	55,56	6	60	25	
Completo	4	36,36	3	30	4	44,44	4	40	15	
Total	11		10		9		10		40	
raça										0,076**
branco	5	45,45	6	60	7	77,78	2	20	20	
Não branco	6	54,55	4	40	2	22,22	8	80	20	
Total	11		10		9		10		40	

. **Menor valor de P deste bloco de variáveis para teste de qui-quadrado.

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em Saliva por quartis para variáveis Hábitos e estilo de vida

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
bebe ou bebeu por 1 ano										0,311
sim	5	45,45	7	70	5	55,55	6	60	23	
somente no passado	2	18,18	2	20	4	44,44	3	30	11	
não	4	36,36	1	10	0		1	10	6	
Total	11		10		9		10		40	
Frequência de consumo de álcool na semana										0,48
Até 3 dias na semana	3	27,27	1	10	3	33,33	4	40	11	
Mais de 3 dias na semana	8	72,73	9	90	6	66,67	6	60	29	
Total	11		10		9		10		40	
Frequência de consumo de álcool antes do meio dia										0,108*
Até 3 dias na semana	5	45,45	2	20	6	75	6	60	19	
Mais de 3 dias na semana	6	54,45	8	80	2	25	4	40	20	
Total	11		10		8		10		39	
fuma ou fumou por 1 ano										0,343
sim	6	54,55	8	80	7	77,78	7	70	28	
somente no passado	2	18,18	2	20	1	11,11	3	30	8	
não	3	27,27	0		1	11,11	0		4	
Total	11		10		9		10		40	
ingere café										0,309
sim	8	72,73	9	90	9	100	9	90	35	
não	3	27,27	1	10	0		1	10	5	
Total	11		10		9		10		40	

*Menor valor de p-valor obtidos de teste do qui quadrado neste bloco de variáveis.

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em Saliva por quartis para variáveis hábitos nutricionais

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
freq. come carne vermelha										0,064**
Até 2 vezes na semana	0		0		2	22,22	0		2	
Na maioria dos dias ou todos os dias	11	100	10	100	7	77,78	10	100	38	
Total	11		10		9		10		40	
freq. come legumes e verduras										0,44
Até 2 vezes na semana	1	9,09	0		0		0		1	
Na maioria dos dias ou todos os dias	10	90,01	10	100	9	100	10	100	39	
Total	11		10		9		10		40	
freq. come frutas										0,505
Até 2 vezes na semana	0		0		1	11,11	1	10	2	
Na maioria dos dias ou todos os dias	11	100	10	100	8	88,89	9	90	38	
Total	11		10		9		10		40	
freq. come frutas cítricas										0,46
Até 2 vezes na semana	2	18,18	0		2	22,22	1	10	5	
Na maioria dos dias ou todos os dias	9	81,82	10	100	7	77,78	9	90	35	
Total	11		10		9		10		40	

. **Menor valor de P deste bloco de variáveis para teste de qui-quadrado.

Tabela 13 - Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em Bochecha por quartis para frequência em consumo de carne vermelha.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
freq. come carne vermelha										0,01*
Até 3 vezes na semana	0	0	0	0	0	0	3	33,3	3	
Na maioria dos dias ou todos os dias	10	100	10	100	11	100	6	66,7	37	
Total	10		10		11		9		40	

*Resultados de p-valor com significância estatística obtidos de teste do qui quadrado.

5 - DISCUSSÃO

5.1 Quantificação de SLPI no Soro

Os valores quantificados de SLPI no sangue dos pacientes diagnosticados com câncer de boca do hospital Heliópolis do município de São Paulo foram menores do que os valores encontrados em saliva e bochecho. Esses valores são similares aos valores de pacientes sem câncer descritos em outros estudos (CARLSON et al., 2013. TIMMS et al., 2014 STEPIÉN et al., 2017). Entretanto, durante a revisão de literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram SLPI em soro especificamente em pacientes com câncer de boca.

Os estudos que relacionam SLPI em soro com outras neoplasias, e que utilizaram metodologias de quantificações diferentes ao desta investigação, chegaram à conclusão de que esta proteína possui propriedades coagulantes importantes que podem promover um sólido crescimento tumoral. Além disso, para neoplasias da tireoide, o SLPI pode ser um importante biomarcador de malignidade em soro para tomadas de decisões pré-operatórias. (STEPIEN et al., 2017). O mesmo vale para câncer de ovário, o qual mostrou igualmente promissor. (CARLSON et al., 2013). No presente estudo, embora tenha se verificado associação entre o estadiamento patológico e SLPI em soro, ela não foi linear, o que dificulta a interpretação do achado, uma vez que não há dose resposta.

O uso de fio dental se associou com menores valores de SLPI em soro. Paradoxalmente, houve maior proporção de pessoas que escovam os dentes

diariamente entre as pessoas com SLPI mais altos. Levando-se em consideração que este SLPI está circulante no organismo do paciente, embora paradoxais ainda, tais achados poderiam corroborar com outros estudos que demonstram relação significativa entre higiene bucal e doenças sistêmicas, como doenças cardíacas, diabetes e pneumonia (SCANNAPIECO, 2006). A relação entre a saúde bucal e a saúde sistêmica poderia se dar por diversas vias. Uma delas seria de que a falta de higiene bucal poderia predispor à doença periodontal. As concentrações de SLPI poderiam diminuir a capacidade de proteção e aumentar a susceptibilidade a infecções crônicas como a doença periodontal (KRETSCHMAR et al., 2012). Diferentes patógenos periodontais afetam a presença dos inibidores de protease e a regulações destes diferentes inibidores pode estar presente em pacientes com câncer. (YIN et al., 2010).

É importante considerar que a proteína circulante no sangue não possui a mesma origem do SLPI presente na boca. O primeiro tem origem na medula óssea e o segundo dos ácinos serosos da mucosa jugal da cavidade oral. (CORDES *et al.*, 2011).

Apesar das dificuldades em se explicar as relações entre SLPI em soro e as variáveis estudadas, verifica-se que esse se mostrou um marcador interessante para ser avaliado em outros estudos com maior número de pessoas.

5.2 Quantificação de SLPI na Saliva e Bochecho

A avaliação de SLPI na saliva se justifica em estudos sobre câncer de boca, pois esta proteína é encontrada em altas concentrações neste fluido em pessoas saudáveis, principalmente homens. (YANG et al., 2014; KAWAHARA et al., 2016; CAMPBELL et al., 2016).

A correlação positiva encontrada entre níveis de SLPI em saliva e a medida acumulada de consumo de tabaco ao longo da vida (maços-ano) é consistente com achados de estudos prévios (RAHMAN et al., 2016. CAMPBELL et al., 2016). Entretanto, na análise estratificada pelo hábito de fumar (categorizado em sim/não/apenas no passado), não foi encontrada associação. Tal resultado sugere que, em estudos sobre SLPI, é importante a avaliação de dados relativos à quantidade e frequência do tabagismo, e não apenas à presença do vício.

No presente estudo, houve redução nos valores de SLPI de acordo com a idade. Tal achado corrobora com outros estudos (RAHMAN et al.,2016; SHUGARS et al.,2001). Quantificação por método ELISA, num trabalho publicado em 2016 demonstrou que pacientes brasileiros saudáveis possuem em média 617,3 Ng/mL de SLPI na saliva (RAHMAN et al.,2016). Comparado com Mexicanos e Norte americanos, a população brasileira apresentou a maior quantificação em média que os demais países do estudo. Nesse estudo, autores perceberam que ao estratificar estes indivíduos por idade, notaram que a faixa etária de 45-73 anos possui em média 403,61 Ng/mL. A raça branca apresentou em média a maior quantidade de SLPI na cavidade oral, 504,00 Ng/mL. Indivíduos saudáveis com tempo de estudo menor que 12 anos apresentaram em média 487,53 Ng/mL. (RAHMAN et al., 2016). Comparativamente, os dados encontrados no presente estudo possuem quantificações de SLPI relativamente mais baixas que os pacientes do estudo de coorte em homens saudáveis, com média de 348,92 Ng/mL.

Achados de quantificações por método western blot sugerem que existem decréscimos de SLPI em pacientes com lesões malignas e pré-malignas de

câncer de boca, quando comparados com tecidos normais (YANG et al., 2014). Estes resultados foram compatíveis também com testes *in vitro* (SACKS, 1996). Material esfoliativo também demonstrou que, à medida que o câncer progride, menor é a quantificação de SLPI (YANG et al., 2014). Ainda no mesmo estudo, foram realizados experimentos *in vitro* os quais sugerem que tratamento com SLPI fazem decair a atividade de NF- κ B nas lesões pré-malignas. (YANG et al., 2014). Apesar destes resultados, outra pesquisa investigou inúmeros possíveis biomarcadores para câncer de boca na saliva, dentre muitos, o SLPI e os resultados mostraram que o SLPI não seria um biomarcador promissor para aquela população e dentro da metodologia proposta (KAWAHARA et al., 2016).

Por ser transversal e sem grupo controle, o presente estudo não avaliou o potencial do SLPI em saliva como biomarcador de risco ou de prognóstico, sendo necessários novos estudos longitudinais. No presente estudo, não houve associação entre SLPI em saliva e estadiamento. Embora fosse possível pensar no estadiamento (TNM) como *proxy* de agressividade, vale ressaltar que esse pode também variar em função do tempo até o diagnóstico e tratamento.

Achados sugerem que a infecção de HPV apresenta correlação inversa com a expressão de SLPI, e que baixos níveis desta proteína facilitariam a infecção de HPV (QUABIOS et al., 2015. HOFFMANN et al., 2013). No presente estudo, todos os pacientes incluídos foram negativos para HPV em pesquisa prévia, não sendo possível avaliar tão relação.

Nota-se que as quantificações de SLPI por teste de ELISA em saliva tenderam a ser diferentes entre pacientes brancos e não brancos. Esta variável pode ser considerada uma *proxy* tanto da condição socioeconômica quanto de genótipos distintos. A condição socioeconômica impacta em um grupo de fatores

relacionados ao estilo de vida. Por exemplo, um estudo que incluiu pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no hospital Heliópolis relatou correlação entre tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas e escolaridade. (BOING et al., 2011)

Esta investigação encontrou que o consumo de carne vermelha se correlaciona significativamente nas quantificações de SLPI em bochecho. Não foram encontrados estudos prévios que avaliaram a associação entre esse item alimentar e SLPI em saliva. Ressalta-se, entretanto, que é necessário cuidado para a interpretação desse achado, uma vez que, para 3 dos quatro quartis, não houve variação no consumo (com todos os pacientes na categoria mais alta), o que prejudica a interpretação do achado.

6 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Por tratar-se de um estudo transversal, esta investigação está sujeita à causalidade reversa, ou seja, não é permitido estabelecer relação temporal entre a exposição e efeito, e por consequência, é dificultoso estabelecer uma relação causal. Sendo assim, não é possível estabelecer se as diferenças de concentrações de SLPI se relacionariam com o prognóstico da doença.

Este estudo é uma união do esforço técnico e científico tanto da epidemiologia do câncer quanto da Biologia Molecular. Importantes publicações na área demonstram cada vez mais a importância de uma medicina personalizada que procuram compreender a distribuição e os possíveis determinantes da doença aplicando metodologias combinadas das duas áreas. O grande desafio hoje é compilar estes marcadores biológicos de determinada população e compreender como é a natureza desta e como ela afetará o risco

individual de desenvolver o câncer, nas diferentes populações. (ZARIDZE, 2008; PENNEY, 2017.)

Os dados individuais foram coletados de questionários. Estes estão sujeitas ao viés de memória do respondente. Entretanto, outros tipos de vieses que estão relacionados a este instrumento, como o viés do entrevistador, foram atenuados com os devidos cuidados e critérios de treinamento da equipe e cegamento. Ademais, levando em consideração que o atual estudo trabalhou apenas com casos incidentes, qualquer erro no relato seria não diferencial, o que tornaria o resultado mais acurado.

Este estudo também possui uma limitação no que se refere à coleta do bochecho. O paciente é instruído no momento da coleta a não o realizar com vigor o ato de bochechar. No entanto, não tem como controlar se a força da ação foi suficientemente branda ao ponto de não virem restos de alimento, sangue ou ainda fragmentos microscópicos de mucosa. A presença destes elementos no material biológico pode influenciar na quantificação da proteína. Salienta-se, também, que este trabalho é o primeiro a demonstrar resultados com esta técnica de coleta. Os trabalhos publicados até o momento utilizaram a técnica do gargarejo.

É necessário ressaltar que uma importante limitação deste estudo é quanto ao número amostral, o qual é pequeno para estimar associações com maior poder estatístico. Em contrapartida, por tratar-se de uma análise exploratória, o número amostral utilizado mostrou resultados instigantes para uma discussão interessante com as publicações existentes e futuras e proposição de novos estudos maiores.

7 - CONCLUSÕES

Este estudo direciona hipóteses de que o SLPI no soro e na saliva se relacionariam com hábitos de vida e nutrição, principalmente no que se refere à escolaridade, higiene bucal, tabagismo e consumo de carne vermelha. Índícios mostram diferenças de quantificações de SLPI em soro de acordo com o estadiamento do paciente. Mais estudos para avaliar o papel do SLPI nas cadeias causais de ocorrência e prognóstico do câncer de boca são necessários.

REFERÊNCIAS

Antunes JLF, Toporcov TN, Bastos JL, Frazão P, Narvai PC, Peres MA. Oral health in the agenda of priorities in public health. *Revista de Saúde Pública*.;50:57, 2016.

Antunes JLF, Toporcov TN, Biazevic MGH, Boing AF, Scully C, Petti S. Joint and Independent Effects of Alcohol Drinking and Tobacco Smoking on Oral Cancer: A Large Case-Control Study. Gorlova OY, ed. *PLoS ONE*.;8(7):e68132, 2013.

Antunes JLF, Toporcov TN, Biazevic MGH, Boing AF et al. Gender and racial inequalities in trends of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 47(3), 470-478, 2013.

Arellano-Garcia ME, Li R, Liu X, et al. Identification of Tetranectin as a Potential Biomarker for Metastatic Oral Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.;11(9):3106-3121, 2010.

Avi ALRO, Tanimoto HM, Queiroz CDS, Gerim LR, Zuza EP, Trevisani DM *et al.* Neoplasia de boca e orofaringe: um estudo transversal na Fundação PIO XII – Hospital do Câncer de Barretos, Brasil. *Revista de Odontologia da UNESP*; 41: 273-280, 2012.

Barnett ML, Hyman J. Challenges in interpreting study results: The conflict between appearance and reality. *JADA* 2006;137(Suppl):32S-36S.

Baqui AAMA, Meiller TF, Falkler Jr. WA. Enhanced Secretory Leukocyte Protease Inhibitor in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*; 6: 808–811, 1999.

Beasley NJP, Prevo R, Banerj S, Leek RD, Moore J, vnTrappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research*; 62: 1315-20, 2002.

Boing AF, Antunes JL, Carvalho MB, de GóisFilho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr, *et al.* How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health*; 1979: 1-6, 2011.

Bonfante GMS, Machado CJ, Souza PEA, Andrade EIG, Acurcio FA, Cherchiglia ML. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único. *Cadernos de Saúde Pública*; 30: 983-997, 2014.

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, CM Lewis, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ *et al.*, Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *The Am J Surg Pathol*; 29: 167-178, 2005.

Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D, *et al.* Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*; 34: 676–88, 2010.

Bravi, F Bosetti, C Filomeno, M Levi, F Garavello, W Galimberti, S Negri, E La Vecchia, C Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer *British Journal Of Cancer* 2013/10/22/online 1092904 10.1038/bjc.2013.667 *Epidemiology*

Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck*; 32: 357-67, 2010.

Campana IG, Goiato MC. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Revista Odontológica de Araçatuba*; 34: 20-26, 2013.

Campbell CMP, Guan W, Sprung R, Koomen JM, Michael T, O'Keefe et al. Quantification of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral gargle specimens collected using mouthwash. *J Immunol Methods*; 31: 117–121, 2013.

Campbell CMP, Giuliano AR, Torres BN, et al. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and head and neck cancer: The Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Oral oncology* ;55:1-5, 2016.

Carlson AM, Maurer MJ, Goergen KM, et al. Utility of progranulin and serum leukocyte protease inhibitor as diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2013;22(10):10.1158/1055-9965.EPI-12-1368. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-1368.

Chung CH, Schwartz DL. Impact of HPV-related head and neck cancer in clinical trials: opportunity to translate scientific insight into personalized care. *Otolaryngol Clin North Am*; 45: 795-806, 2012.

Colombo J, Rahal P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia* ; 55: 165-174, 2009

Cordes C, Häslér R, Werner C, Görögh T, Röcken C, Hebebrand L et al. The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 39: 185–191, 2011.

Cooper JS, Zhang Q, Forastieri AA, Jacobs J, Saxman SB, Kish JA, et al. Long-term follow-up of the RTOG 9501/intergroup phase III trial: postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol*; 84: 1198-1205, 2012.

Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer*, 3: 42, 2004

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The Human Oral Microbiome . *Journal of Bacteriology*. 2010;192(19):5002-5017. doi:10.1128/JB.00542-10.

Dasgupta S, Tripathi PK, Qin H, Bhattacharya-Chatterjee M, Valentino J, Chatterjee SK, Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma, In *Oral Oncology*, Volume 42, Issue 3, Pages 306-316, ISSN 1368-8375, 2006.

de Oliveira Moura, J. M. B., Câmara, A. C. D. S. M., Nonaka, C. F. W., Pinto, L. P., & de Souza, L. B. Immunohistochemical comparative analysis of lymphatic vessel density and VEGF-C expression in squamous cell carcinomas of the tongue between young and old patients. *Pathology-Research and Practice*, 212(12), 1095-1101, 2016.

de Sousa, A. R., Koury, G. V. H., Badaranne, E. B. L., de Almeida, H., & Cavalcante, C. N. F. A. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em hospital de referência. *Uma luz à saúde cardíaca feminina*, 14(3), 129-32, 2016.

Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínicoepidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*; 70(1): 35-40, 2004.

Demmer R, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular disease: The heart of the matter. *JADA* 2006; 137(Suppl):14S-20S.

Devoogdt N, Ghassabeh GH, Zhang J, Brys L, Baetselier PD, Revets H. Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *P Natl Acad Sci*; 100: 5778-5782, 2003.

Du X.-Y., Liu X., Wang Z.-J, Wang Y.-Y. SLPI promotes the gastric cancer growth and metastasis by regulating the expression of P53, Bcl-2 and Caspase-8 *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Year: 2017.Vol. 21 - N. 7 1495-1501

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 10/03/2017.

Garcia-Carracedo D, Rodrigo JP, Astudillo A, Nieto CS, Gonzalez, MV. Prognostic significance of lymphangiogenesis in pharyngolaryngeal carcinoma patients. *BMC cancer*; 10: 416, 2010

International Agency for Research on Cancer - World Health Organization.[Internet]. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [citado 03. fev. 2014]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.

Hanahan D, Weinberg RA. "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell*; 144: 646-74, 2011

Hoffmann M, Quabius ES, Tribius S, *et al.* Human papillomavirus infection in head and neck cancer: The role of the secretory leukocyte protease inhibitor. *Oncology Reports*; 29(5):1962-1968, 2013. doi:10.3892/or.2013.2327.

Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest.*; 124: 922-28, 2014

Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, *et al.* A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. *Proteomics*.;16(1):159-173, 2016.

Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Kono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of α 1-Proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases. *Am J Pathol*; 154: 457-468, 1999.

Laskowski JM, Qasim MA. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzymes substrat complexes? *Biochim Biophys Acta*; 1477: 324-337, 2000.

Longatto Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, de Carvalho MB, Curioni, OA, Mercante, AM, Gattas GJ. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis. *World J Surg Oncol*; 5: 140, 2007.

López RVM, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, *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 Cause Control*; 25: 461-471, 2014

Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, *et al.* Total Exposure and Exposure Rate Effects for Alcohol and Smoking and Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology*. 2009;170(8):937-947. doi:10.1093/aje/kwp222.

Menckeborg CL, Hol J, Simons-Oosterhuis Y, *et al* Human buccal epithelium acquires microbial hyporesponsiveness at birth, a role for secretory leukocyte protease inhibitor *Gut* 2015;64:884-893.

Makkar, I., Metgud, R., Vyas, Z., & Tak, A. Markers of angiogenesis in potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 4(2), 25, 2016.

Mao, Van de Ven, Prestage *et al.* (2002): Health in Men (HIM) Baseline data.

Matos LL, Pinto FR, Kulcsar MAV, Cavalheiro BG, Mello ES, Alves VAF, *et al.* Espessura tumoral como fator de risco independente para a recorrência precoce em portadores de carcinomas espinocelulares da cavidade oral. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça Pescoço*; 43: 6-11, 2014.

Mealey B. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. *JADA* 2006; 137(Suppl): 26S-31S.

Mikami O, Fukushima A, Komiyama Y, Iwase T, Tsuda H, Higuchi Y, Hayakawa S, Kuyama K, Komiyama K, Human uterus myoma and gene expression profiling: A novel in vitro model for studying secretory leukocyte protease inhibitor-mediated tumor invasion, In *Cancer Letters*, Volume 379, Issue 1, Pages 84-93, ISSN 0304-3835, 2016.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Atlas de mortalidade por câncer. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2014. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/mortalidadeweb/>>.

Nakamura K, Takamoto N, Hongo A, Kodama J, Abrzua F, Nasu Y *et al.* Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer. *Oncol Rep*; 19: 1085-109, 2008.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Revista de Odontologia da UNESP*; 35: 233-38, 2006.

Ni, Y.-h., Ding, L., Hu, Q.-g. and Hua, Z.-C, Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma: Proteomics discovery and clinical validation. *Prot. Clin. Appl.*, 9: 86–97, 2015.

Noorlag, Rob, *et al.* Nodal metastasis and survival in oral cancer: Association with protein expression of SLPI, not with LCN2, TACSTD2, or THBS2." *Head Neck*. 2014.

O'rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*; 48: 1191-1201, 2012.

Park GC, Jung JH, Roh JL, Lee JH, Cho KJ, Choi SH, et al. Prognostic Value of Metastatic Nodal Volume and Lymph Node Ratio in Patients with Cervical Lymph Node Metastases from an Unknown Primary Tumor. *Oncology*. 86: 170-76, 2013.

Penney K.L. (2017) Molecular and Genetic Epidemiology of Cancer. In: Loda M., Mucci L., Mittelstadt M., Van Hemelrijck M., Cotter M. (eds) Pathology and Epidemiology of Cancer. Springer, Cham

Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality. *Clin Cancer Res*. 7: 463-68, 2001.

Purdue MP, Hashibe M, Berthiller J, La Vecchia C, Dal Maso L, Herrero R, et al. Type of alcoholic beverage and risk of head and neck cancer-a pooled analysis within the INHANCE Consortium *Am J Epidemiol*.; 169: 132-42, 2009

Quabius ES, Görögh T, Fischer GS, Hoffmann AS, et al. The antileukoprotease secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and its role in the prevention of HPV-infections in head and neck squamous cell carcinoma, In Cancer Letters, Volume 357, Issue 1, Pages 339-345, ISSN 0304-3835, 2015.

Quabius, ES., Möller, P., Haag, J., et al. The role of the antileukoprotease SLPI in smoking-induced human papillomavirus-independent head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 134: 1323–1334, 2014.

Rahman S, Pierce Campbell CM, Torres BN, et al. Distribution and factors associated with salivary secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations. *Oral diseases*;22(8):781-790, 2016.

Rivera C. Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11884–11894. 2015.
<http://doi.org/10.5281/zenodo.571252>

Rietbergen, M. M., van Bokhoven, A.A.J.D., Lissenberg-Witte, B. I., Heideman, D. A. M., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H. and Bloemena, E. (), Epidemiologic associations of HPV-positive oropharyngeal cancer and (pre)cancerous cervical lesions. *Int. J. Cancer*. Accepted Author Manuscript. 2018. doi:10.1002/ijc.31315

Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogenes. *Annu Rev Phytopathol* ; 28: 425-449, 1990.

Sacks PG (1996) Cell, tissue and organ culture as in vitro models to study the biology of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Metastasis Rev* 15: 27–51.

Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigentz M, Garg M, *et al*. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer*; 135: 2404-2412, 2014.

Sallenave J-M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respiratory Research*. 2000;1(2):87-92. doi:10.1186/rr18.

Scannapieco F. Pneumonia in non ambulatory patients: The role of oral bacteria and oral hygiene. *JADA* 2006; 137(Suppl):21S-25S.

Shugars DC, Watkins CA, Cowen HJ. Salivary Concentration of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, an Antimicrobial Protein, Is Decreased with Advanced Age. *Gerontology*; 47:246-253, 2001.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics. *CA - Cancer J Clin.*; 64: 9-29, 2014.

Silva-Oliveira RJ, Lopes GF, Camargos LF, Ribeiro AM, Santos FV, Severino VG, Terezan AP, Thomé RG, Santos HB, Reis RM, Ribeiro RI. Tapirira guianensis Aubl. Extracts Inhibit Proliferation and Migration of Oral Cancer Cells Lines. *International Journal Molecular Sciences*, Nov; v.17 (11), 1839, 2016.

Silva PSL, Leão VML, Scarpel RD. Caracterização da população portadora de câncer de boca e orofaringe atendida no setor de cabeça e pescoço em hospital de referência na cidade de Salvador – BA. *Revista CEFAC*; 11: 441-447, 2009.

Stępień T, Brożyna M, Kuzdak K, et al. Elevated Concentrations of SERPINE2/Protease Nexin-1 and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor in the Serum of Patients with Papillary Thyroid Cancer. *Disease Markers*. 2017;2017:4962137. doi:10.1155/2017/4962137.

Stetler-Stevenson W, Liotta L, Kleiner Jr D. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*; 7: 1434–1441, 1993.

Süslü, N, Hoşal AŞ, Aslan T, Sözeri B, Dolgun A. Carcinoma of the oral tongue: a case series analysis of prognostic factors and surgical outcomes. *J Oral Maxil Surg*; 71: 1283-1290, 2013.

Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*; 86: 347-363, 2005.

Thompson, RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *P Natl Acad Sci*; 83: 6692-6696, 1986.

Timms JF, Arslan-Low E, Kabir M, et al. Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. Everett A, Ignjatovic V, eds. *Proteomics Clinical Applications*. 2014;8(11-12):982-993. doi:10.1002/prca.201400063.

Thompson, M., Lapointe, J., Choi, Y.-L., Ong, D. E., Higgins, J. P., Brooks, J. D., & Pollack, J. R. (2008). Identification of candidate prostate cancer genes through comparative expression-profiling of seminal vesicle. *The Prostate*, 68(11), 1248–1256.

Toporcov, TN. Antunes, JLF.,Tavares, MR. Fat food habitual intake and risk of oral cancer,Oral Oncology, Volume 40, Issue 9, 2004, pages 925-931, ISSN 1368-8375

Toporcov TN, Biazevic MGH, Rotundo LDB, Andrade FP, Carvalho MB, Brasileiro RS, et al. Consumo de alimentos de origem animal e câncer de boca e orofaringe. Rev Panam Salud Publica. 2012;32(3):185–91.

Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res-Rev Mutat*; 728: 23-34, 2011.

Vasconcelos LDL, Moreira NVR, Silva LP, Sobral APV. Expressão da metaloproteinase9 no carcinoma de células escamosas oral. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*; 13: 89-94, 2013.

Wen J, Nikitakis NG, Chaisuparat R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Jin W, et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Expression and Tumor Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol*; 178: 2866-2878, 2011.

Westin, U., Nyström, M., Ljungcrantz, I., Eriksson, B., e Ohlsson, K. The presence of elafin, SLPI, IL1-RA and STNF α RI in head and neck squamous cell carcinomas and their relation to the degree of tumour differentiation. *Mediat Inflamm*; 11: 7-12, 2002.

Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, Lin CT, Yang YC, Yang WCV, Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma, In Oral Oncology, Volume 46, Issue 4, Pages 226-231, ISSN 1368-8375, 2010.

Wünsch FV, Antunes José Leopoldo Ferreira, Boing AF, Lorenzi RL. Perspectivas da investigação sobre determinantes sociais em câncer. 18(3): 427-450, 2008.

Wünsch FV Dossiê Alcoolismo – Consumo de bebidas alcóolicas e risco de câncer. *Revista Usp* • São Paulo • n. 96 • P. 37-46 • dezembro/fevereiro 2012-2013.

Wyss A, Hashibe M, Chuang S-C, et al. Cigarette, Cigar, and Pipe Smoking and the Risk of Head and Neck Cancers: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *American Journal of Epidemiology*. 2013;178(5):679-690. doi:10.1093/aje/kwt029.

Yang Y, Rhodus NL, Ondrey FG, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Oral Brush Biopsies Identifies Secretory Leukocyte Protease Inhibitor as a Promising, Mechanism-Based Oral Cancer Biomarker. Koomen JM, ed. *PLoS ONE*;9(4):e95389, 2014.

Zaridze, D.G. *Biochemistry Moscow* (2008) 73: 532. <https://doi.org/10.1134/S0006297908050064>

Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Suppresses the Production of Monocyte Prostaglandin H Synthase-2, Prostaglandin E₂, and Matrix Metalloproteinases. *J Clin Invest*; 99: 894–900, 1997.

Zhang W, Yao J-L, Dong S-C, Hou F-Q, Shi H-P. SLPI knockdown induced pancreatic ductal adenocarcinoma cells proliferation and invasion. *Cancer Cell International*. 2015;15:37. doi:10.1186/s12935-015-0182-4.

Zheng D, Gui B, Gray K.P., Tinay I., Rafiei S., Huang Q., Sweeney C.J., Kibel A.S. & Jia L. Secretory leukocyte protease inhibitor is a survival and proliferation factor for castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* (2016) 35, 4807–4815 (08 September 2016) doi:10.1038/onc.2016.13

Zhao Y, Jin Y, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon*; 46: 635-640, 2005

ANEXOS:

Anexo 1 - Representação gráfica das curvas padrões para soro com os valores de densidade ótica gerados pelo teste de ELISA human SLPI.

Anexo 2 - Representação gráfica das curvas padrões para saliva com os valores de densidade ótica gerados pelo teste de ELISA human SLPI.

Anexo 3 - Representação gráfica das curvas padrões para saliva com os valores de densidade ótica gerados pelo teste de ELISA human SLPI.

Anexo 4 - Representação gráfica da curva padrão para bochecho com os valores de densidade ótica gerados pelo teste de ELISA human SLPI.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
bebe ou bebeu por 1 ano										0,054
sim	4	66,67	2	33,33	4	80	2	33,33	12	
somente no passado	0	0	1	16,67	1	20	4	66,67	6	
não	2	33,33	3	50	0	0	0	0	5	
Total	6		6		5		6		23	
Frequência de consumo de álcool na semana										0,488
1 dia	1	25	0	0	0	0	0	0	1	
2 dias	0	0	0	0	0	0	1	16,67	1	
3 dias	0	0	1	33,33	0	0	1	16,67	2	
4 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7 dias	3	75	2	66,67	5	100	4	66,67	14	
Total	4		3		5		6		18	
Frequência de consumo de álcool antes do meio dia										0,197***
0 dias	2	50	2	100	1	20	2	33,33	7	
1 dia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2 dias	1	25	0	0	0	0	0	0	1	
3 dias	0		0	0	0	0	2	33,33	2	
4 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7 dias	1	25	0	0	4	80	2	33,33	7	
Total	4		2		5		6		17	
fuma ou fumou por 1 ano										0,433
sim	5	83,33	3	50	4	80	4	66,67	16	
somente no passado	0	0	1	16,67	0	0	2	33,33	3	
não	1	16,67	2	33,33	1	20	0	0	4	
Total	6		6		5		6		23	
ingere café										0,102***
sim	6	100	4	66,67	5	100	6	100	21	
somente no passado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
não	0	0	2	33,33	0	0	0	0	2	
Total	6		6		5		6		23	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em Saliva por quartis para variáveis Hábitos e estilo de vida. ***Menores valor de P deste bloco de variáveis

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
bebe ou bebeu por 1 ano										0,847
sim	4	44,44	6	60	7	77,78	5	55,56	22	
somente no passado	3	33,33	3	30	1	11,11	3	33,33	10	
não	2	22,22	1	10	1	11,11	1	11,11	5	
Total	9		10		9		9		37	
Frequência de consumo de álcool na semana										0,322
1 dia	0	0	0	0	1	14,29	0	0	1	
2 dias	2	28,57	3	37,5	0	0	1	20	6	
3 dias	2	28,57	0	0	0	0	1	20	3	
4 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7 dias	3	42,86	5	62,5	6	85,71	3	60	17	
Total	7		8		7		5		27	
Frequência de consumo de álcool antes do meio dia										0,272
0 dias	4	57,14	1	12,5	1	14,29	1	25	7	
1 dia	0	0	1	12,5	0	0	0	0	1	
2 dias	0	0	2	25	0	0	0	0	2	
3 dias	1	14,29	1	12,5	0	0	0	0	2	
4 dias	0	0	1	12,5	0	0	0	0	1	
5 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7 dias	2	28,57	2	25	6	85,71	3	75	13	
Total	7		8		7		4		26	
fuma ou fumou por 1 ano										0,847
sim	5	55,56	7	70	8	88,89	5	55,56	22	
somente no passado	3	33,33	2	20	0	0	3	33,33	10	
não	1	11,11	1	10	1	11,11	1	11,11	5	
Total	9		10		9		9		37	
ingere café										0,540
sim	7	77,78	9	100	7	87,5	5	83,33	28	
somente no passado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
não	2	22,22	0	0	1	12,5	1	16,67	4	
Total	9		9		8		6		32	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis para variáveis Hábitos e estilo de vida.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
freq. come carne vermelha										0,768
nunca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
< que 1 vez por mês	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-3 vezes por mês	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 ou 2 vezes por semana	2	33,33	1	16,67	0	0	1	16,67	4	
na maioria dos dias	3	50,0	3	50,0	2	40,0	3	50,0	11	
todos os dias	1	16,67	2	33,33	3	60,0	2	33,33	8	
Total	6		6		5		6		23	
freq. come legumes e verduras										0,768
nunca	1	16,67	0	0	0	0	0	0	1	
< que 1 vez por mês	0	0	1	16,67	0	0	0	0	1	
1-3 vezes por mês	2	33,33	1	50,00	2	40	1	16,67	6	
1 ou 2 vezes por semana	1	16,67	3	50,00	2	40	3	50,00	9	
na maioria dos dias	2	33,33	1	16,67	1	20	2	33,33	6	
todos os dias	0	0	0	0	0	0	0	0	23	
Total	6		6		5		6			
freq. come frutas										0,851
nunca	0	0	0	0	0	0	1	16,67	1	
< que 1 vez por mês	0	0	0	0	0	0	1	16,67	1	
1-3 vezes por mês	1	16,67	1	16,67	2	40,0	1	16,67	5	
1 ou 2 vezes por semana	2	33,33	1	16,67	1	20,0	1	16,67	5	
na maioria dos dias	2	33,33	2	33,33	2	40,0	1	16,67	7	
todos os dias	1	16,67	2	33,33	0	0	1	16,67	4	
Total	6		6		5		6		23	
freq. come frutas cítricas										0,557
nunca	1	26,67	0	0	0	0	1	16,67	2	
< que 1 vez por mês	0	0	1	16,67	0	0	0	0	1	
1-3 vezes por mês	1	16,67	1	16,67	0	0	2	33,33	4	
1 ou 2 vezes por semana	2	33,33	0	0	1	20,0	0	0	3	
na maioria dos dias	2	33,33	3	50,00	2	40,0	1	16,67	8	
todos os dias	0	0	1	16,67	2	40,0	2	33,33	5	
Total	6		6		5		6		23	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em saliva por quartis para variáveis Hábitos nutricionais.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
freq. come carne vermelha										0,337
nunca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
< que 1 vez por mês	0	0	1	11,11	0	0	0	0	1	
1-3 vezes por mês	1	10	0	0	0	0	0	0	1	
1 ou 2 vezes por semana	2	20	2	22,22	5	55,6	1	11,1	10	
na maioria dos dias	4	40	1	11,11	2	22,2	4	44,4	11	
todos os dias	3	30	5	55,56	2	22,2	4	44,4	14	
Total	10		9		9		9		37	
freq. come legumes e verduras										0,407
nunca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
< que 1 vez por mês	0	0	1	11,11	0	0	0	0	1	
1-3 vezes por mês	2	20	0	0	2	22,2	3	33,3	7	
1 ou 2 vezes por semana	2	20	6	66,67	2	22,2	3	33,3	13	
na maioria dos dias	2	20	1	11,11	2	22,2	2	22,2	7	
todos os dias	4	40	1	11,11	3	33,3	1	11,1	9	
Total	10		9		9		9		37	
freq. come frutas										0,933
nunca	1	11,11	0	0	0	0	0	0	1	
< que 1 vez por mês	1	11,11	0	0	0	0	1	16,7	2	
1-3 vezes por mês	1	11,11	2	22,22	2	25	2	33,3	7	
1 ou 2 vezes por semana	2	22,22	4	44,44	2	25	1	16,7	9	
na maioria dos dias	2	22,22	1	11,11	2	25	1	16,7	6	
todos os dias	2	22,22	2	22,22	2	25	1	16,7	7	
Total	9		9		8		6		32	
freq. come frutas cítricas										0,039*
nunca	3	30	0	0	0	0	0	0	3	
< que 1 vez por mês	1	10	0	0	0	0	2	22,2	3	
1-3 vezes por mês	0	0	3	33,33	3	33,3	1	11,1	7	
1 ou 2 vezes por semana	2	20	5	55,56	2	22,2	1	11,1	10	
na maioria dos dias	2	20	0	0	4	44,4	3	33,3	9	
todos os dias	2	20	1	11,11	0	0	2	22,2	5	
Total	10		9		9		9		37	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI em soro por quartis para variáveis Hábitos nutricionais. *Variável significativa para o teste do qui-quadrado.

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
uso de prótese removível										0,072***
sim	1	16,67	5	83,33	1	25	4	66,67	11	
não	5	83,33	1	16,67	3	75	2	33,33	11	
Total	6		6		4		6		22	
nº de dentes ausentes										0,897
< que 5	1	16,67	0	0	1	20	0	0	2	
6 a 15	4	66,67	2	66,67	3	60	5	83,33	14	
16 ou mais	1	16,67	1	16,67	1	20	1	16,67	4	
Total	6		3		5		6		20	
uso de fio dental										0,746
não	5	83,33	3	60,0	4	80,0	3	50,00	15	
sim, às vezes	1	16,67	1	20,0	0	0	2	33,33	4	
sim, sempre	0	0	1	20,0	1	20,0	1	16,67	3	
Total	6		5		5		6		22	
nº de vz que escova os dentes										0,618
nunca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
< 1 vez por semana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-2 vezes por semana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dia sim, dia não	0	0	1	16,67	0	0	0	0	1	
uma vez por dia	1	16,67	0	0	1	20,0	2	33,33	4	
2 vezes por dia	2	33,33	1	16,67	3	60,0	2	33,33	8	
3 vezes por dia	3	50	3	50,0	1	20,0	2	33,33	9	
> 3 vezes por dia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
edêntulo	0	0	1	33,33	0	0	0	0	1	
Total	6		6		5		6		23	
Frequencia de visitas ao dentista nos últimos 20 anos										0,764
todos os anos	0	0	0	0	1	20,0	1	16,67	2	
a cada 2-5 anos	1	16,67	3	50,00	1	20,0	2	33,33	7	
a cada 6 anos ou raramente	3	50,00	2	33,33	2	40,0	3	50	10	
nunca	2	33,33	1	16,67	1	20,0	0	0	4	
Total	6		6		5		6		23	
diabetes										0,488
sim	1	16,67	0	0	1	20,0	0	0	21	
não	5	83,33	6	100	4	80,0	6	100	2	
Total	6		6		5		6		23	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI por quartis em saliva quanto aos hábitos e cuidados com higienização oral. *** Menor valor de p para teste de qui-quadrado neste bloco de variáveis

Características	Quartil 1	%	Quartil 2	%	Quartil 3	%	Quartil 4	%	Total	p-valor
uso de prótese removível										0,204
sim	7	77,8	4	44,44	2	28,6	4	66,67	17	
não	2	22,2	5	55,56	5	71,4	2	33,33	14	
Total	9		9		7		6		31	
nº de dentes ausentes										0,165
< que 5	2	22,2	0	0	0	0	1	25	3	
6 a 15	5	55,6	2	28,57	5	62,5	3	75	15	
16 ou mais	2	22,2	5	71,43	3	37,5	0	0	10	
Total	9		7		8		4		28	
uso de fio dental										0,081***
não	3	33,3	9	100	6	85,7	4	66,67	22	
sim, às vezes	3	33,3	0	0	1	14,3	1	16,67	5	
sim, sempre	3	33,3	0	0	0	0	1	16,67	4	
Total	9		9		7		6		31	
nº de vz que escova os dentes										0,432
nunca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
< 1 vez por semana	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-2 vezes por semana	0	0	1	11,11	1	12,5	0	0	2	
dia sim, dia não	1	11,1	0	0	0	0	0	0	1	
uma vez por dia	2	22,2	3	33,33	1	12,5	0	0	6	
2 vezes por dia	3	33,3	3	33,33	2	25	2	33,33	10	
3 vezes por dia	2	22,2	2	22,22	2	25	4	66,67	10	
> 3 vezes por dia	1	11,1	0	0	0	0	0	0	1	
edêntulo	0	0	0	0	2	25	0	0	2	
Total	9		9		8		6		32	
Frequência de visitas ao dentista nos últimos 20 anos										0,244
todos os anos	2	22,2	1	11,11	0	0	1	16,67	4	
a cada 2-5 anos	4	44,4	1	11,11	4	50	2	33,33	11	
a cada 6 anos ou raramente	3	33,3	5	55,56	1	12,5	3	50	12	
nunca	0	0	2	22,22	3	37,5	0	0	5	
Total	9		9		8		6		32	
diabetes										0,594
sim	0	0	1	11,11	1	12,5	0	0	2	
não	9	100	8	88,89	7	87,5	6	100	30	
Total	9		9		8		6		32	

Distribuição dos pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Boca para quantificação de SLPI por quartis em saliva quanto aos hábitos e cuidados com higienização oral. *** Menor valor de p para teste de qui-quadrado neste bloco de variáveis

Anexo 5 - Parecer Comitê de Ética Projeto GENCAPO Fase II

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 epidermóides de cabeça e pescoço" (GENCAPO Fase II).

Pesquisador Responsável: Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São José 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 à 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 epidermóide 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.

Corê, *Panor* CONEP IF, 12B/2012

O CECF é uma das neoplasias mais frequentes no Brasil. Seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevivência 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 CECF e que permitam estratificações agregando casos e controles para análises específicas. Ou seja, estudos em grande escala, de seguimento de pacientes com CECF, que permitam avaliar simultaneamente o papel do HPV, fatores ambientais, clínicos, histopatológicos, moleculares e a terapêutica utilizada na sobrevivência 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 morbidos.

A variação geográfica na associação entre HPV e risco de CECF, bem como o papel do HPV na sobrevivência 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 CECF. 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 nitidamente atuais. 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 mRNAs quanto miRNAs) por sequenciamento em larga escala, fatores clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao comportamento biológico de CECF e, após integração dos dados obtidos, desenvolver uma ferramenta preditiva para a determinação do risco individual de eventos morbidos em portadores desses tumores, incluindo metástases linfonodais e hematogênicas, sobrevivência 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 CECF e seus controles, que permita estratificações detalhadas das questões de estudo e garanta resultados precisos e robustos; Avaliar os fatores etiológicos e prognósticos do CECF 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 CECF 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 morbidos e/ou progressão tumoral de CECF, em genes que exibiram, em estudos prévios do grupo, alterações epigenéticas ou expressão reduzida e ilhas CpG nas sequências regulatórias; Analisar o transcriptoma de cabeça e pescoço empregando tecnologia de sequenciamento em larga escala para identificar eventos transcricionais associados ao fenótipo de CECF com potencial de predição do risco de eventos morbidos, transcritos de função desconhecida ou resultantes de fusões e deleções gênicas, isoformas alternativas e polimorfismos ou mutações nos transcritos sequenciados; Sequenciar pequenos RNAs,

Genf. Parecer CONEP nº. 128/2012

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 proteico 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 morbidos; 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 morbidos 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 morbidos 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 SIIRP, 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

Curá, Parecer CONEP nº. 128/2012

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; 3. 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:

1. 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.

2. 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.

3. Em decorrência do exposto na página 22/57 do projeto (item 6.5 Tamanho da amostra) ("Considerando-se a média mensal de casos reservados 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

Conf. Parecer CONEP nº. 128/2012

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.

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

- a. 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.**

- b. 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 195/99, 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.**

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

Conf. Parecer CONEP nº. 128/2012

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.

- d. 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.

- e. 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.

Cort. Panoer CONEF nº. 129/2012

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 Biorrepositório, 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 Biorrepositório 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.**

- f. 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

Conf. Parecer CONEP nº. 128/2012

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

Análise: A adequação solicitada foi realizada. Pendência atendida.

- g. 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.

- h. 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.

- i. 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 ética 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.

Corê, Parecer CONEP nº. 128/2012

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.

5. 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), tomando a amostra disponível para análise mais robusta" / página 22/57; e "O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-0) / página 42/57) (grifos nossos). Portanto, solicita-se a apresentação de:

- a. 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 04/12054-0 é apresentado como DOCUMENTO 2".

Análise: A solicitação indicada foi atendida. Pendência atendida.

- b. 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), tomando 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

Conf. Parecer CONEP nº. 128/2012

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 CECPs. 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 ~~das~~ 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.

6. 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.

7. 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 -

Corê. Parecer CONEP nº. 128/2012

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 (Luiza 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 Wunsch 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 (Jussé Ledeu 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 - Imunidade 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 à 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 II.3.i, V.6, 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 261/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao sistema Único de Saúde:

1) 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;

2) descrição da infraestrutura disponível para a realização da pesquisa;

3) vínculo do pesquisador;

4) 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

11/11

elido/mhido

Parecer Comitê de ética Faculdade de Saúde Pública (comprovante de envio)

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DA EXPRESSÃO TUMORAL E DA CONCENTRAÇÃO SALIVAR E SÉRICA DA PROTEÍNA SLPI (INIBIDOR DE PROTEASE SECRETADA POR LEUCÓCITOS) NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL.

Pesquisador: TARSILA GUIMARAES VIEIRA DA SILVA

Versão: 2

CAAE: 80435917.0.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 140804/2017

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto O PAPEL DA EXPRESSÃO TUMORAL E DA CONCENTRAÇÃO SALIVAR E SÉRICA DA PROTEÍNA SLPI (INIBIDOR DE PROTEASE SECRETADA POR LEUCÓCITOS) NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL, que tem como pesquisador responsável TARSILA GUIMARAES VIEIRA DA SILVA, foi recebido para análise ética no CEP USP - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP em 28/11/2017 às

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7779 **E-mail:** coep@fsp.usp.br

Tatiana Natasha Toporcov

QR-Endereço para acessar esta CV: <http://lattes.cnpq.br/5245064695952228>

Última atualização do currículo em 22/11/2017

Cirurgiã-dentista com doutorado em Ciências Odontológicas (concentração em odontologia social) pela Faculdade de Odontologia da USP, pós-doutorado em Epidemiologia pela Faculdade de Saúde Pública da USP. Atualmente é Professora Doutora do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP. Tem experiência na área de Epidemiologia das Doenças e Agravos Não Transmissíveis, com ênfase em Epidemiologia do Câncer, atuando principalmente nos seguintes temas: estudos descritivos, fatores de risco e qualidade de vida. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome: Tatiana Natasha Toporcov

Nome em citações bibliográficas: TOPORCOV, T. N.; Toporcov, Tatiana Natasha; TOPORCOV, T.N.; TOPORCOV, TATIANA; TOPORCOV, TATIANA N.

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública,
Av. Dr. Arnaldo, 715
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 3061.7920
URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Formação acadêmica/titulação

- 2006 - 2010** Doutorado em Ciências Odontológicas (Concurso CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com período sanduíche em Fundación para la Investigación Científica en Castilla-La Mancha (Orientador: José Luis Rodríguez Martín).
Título: Hábitos Alimentares e Câncer de Boca e Orofaringe. Ano de obtenção: 2010.
Orientador: José Leopoldo Pereira Antunes.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: câncer bucal; caso controle; epidemiologia; hábitos alimentares; fatores de risco; Revisão Sistemática.
Grande Área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Odontologia / Subárea: Odontologia Social e Preventiva.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
- 2000 - 2005** Graduação em Odontologia.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Pós-doutorado

- 2010 - 2013** Pós-Doutorado.
Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Grande Área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Medicina Preventiva.

Tarsila Guimarães Vieira da Silva

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8851003972005228>

Última atualização do currículo em 12/01/2017

Formações acadêmicas: - Licenciatura Plena em Ciências Biológicas (2004 - UFPA) - Odontologia (2014 - UFPA) - Mestrado em Saúde pública em andamento (FSP -USP)
(Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Tarsila Guimarães Vieira da Silva

Nome em citações bibliográficas VIEIRA-DA-SILVA, Tarsila Guimarães

Endereço

Endereço Profissional Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia,
Rua Augusto Corrêa, 01
Guamá
66075110 - Belém, PA - Brasil
Telefone: (00) 000000000
URL da Homepage: www.ufpa.br

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6),
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: O papel da expressão tumoral e da concentração salivar e sérica da proteína SLPI na progressão do Carcinoma epidermóide da cavidade bucal. Orientador: Tatiana Natasha Toporcov.
Coorientador: Marcos Brasilino de Carvalho.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Grande área: Ciências Biológicas
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Odontologia / Subárea: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Odontologia / Subárea: Clínica Odontológica.
- 2009 - 2014** Graduação em Odontologia,
Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.
Título: Análise da Microdureza Dentinária Coronária Após Clareamento Interno em dentes Bovinos Variando o Número de Sessões.
Orientador: Rafael Rodrigues Lima.
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura,
Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.
Orientador: Silene Maria Araújo de Lima.