UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço

Raquel Roman Faedo

Ribeirão Preto
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Raquel Roman Faedo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia no dia 09/08/2021.

A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Faedo, Raquel Roman

Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço.
Ribeirão Preto, 2021.
67 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Leopoldino, Andréia Machado.

1. Câncer oral. 2. Plasma. 3. Tecido neoplásicos. 4. Marcadores tumorais. 5. Proteína SET.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Raquel Roman Faedo

Título do trabalho: Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientador(a): Andréia Machado
Leopoldino

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino,

por me conceder a oportunidade de desenvolver este trabalho e pelos ensinamentos passados. Meu respeito e admiração.

Ao Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer,

Cristiana Bernadelli Garcia, Lucas Oliveira Sousa, Fernanda Borchers Coeli-Lacchini, Gabriel da Silva, Lais Brihiadori Fugio, Lizeth Andrea Torres Torres, Ana Júlia Rossoni Carvalho Camila Lopez Ferraz, Mônica Belentani, Tatiane Resende Ushida, pela troca de conhecimento, auxílio intelectual e técnico nesses anos. E por me acolherem e tornarem a minha rotina e trabalho mais leves e alegres.

Aos colaboradores,

Norberto Pepporine Lopes, Rodrigo Moreira da Silva, Ricardo Roberto da Silva, pelo auxílio nos experimentos e aprendizado.

As instituições parceiras,

Dr. Leandro Luongo de Matos, Dr. Marco Kulcsar, Dr. Luiz Paulo Kowalski e Prof. Dr. Roger Chammas, do ICESP-FM-USP e Prof. Dr. Ricardo Lacchini da EERP, pela disponibilidade e concessão das amostras necessárias para a realização deste trabalho.

Ao serviço de Pós Graduação da FCFRP - USP e aos funcionários do programa em Biociências e Biotecnologia,

pela paciência, disponibilidade e serviços prestados.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo

pelo apoio financeiro à pesquisa (processo 2016/19103-2) e pela bolsa de mestrado (processo 2018/03278-3)

O presente trabalho teve também apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

FAEDO, Raquel Roman. **Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço**. 2021. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os esfingolipídios são uma classe de lipídios essenciais em eucariotos não apenas por compor a membrana plasmática, mas por serem moléculas bioativas. Devido ao grande número de vias celulares que essas moléculas regulam, o desequilíbrio no metabolismo dos esfingolipídios pode levar a patologias, como o câncer. Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, a redução nos níveis de ceramida foi associada com a progressão e o pior prognóstico, mas os demais esfingolipídios não foram avaliados. No presente estudo, propomos determinar o perfil de diferentes esfingolipídios em amostras de plasma e tecido (tumor e margem cirúrgica) de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) e possíveis associações com parâmetros clínico-patológicos. Além disto, avaliamos a relação da proteína SET, que está aumentada em CECP, com perfil de esfingolipídios em linhagem de queratinócitos orais com superexpressão de SET (NOK-SI/SET). Foram incluídas amostras de plasma (n=56), fragmentos de tumores e margens cirúrgicas pareadas (n=84) de pacientes com CECP para extração dos esfingolipídios, assim como amostras de plasma de indivíduos controle (n=58). A determinação e quantificação dos esfingolipídios foi realizada por espectrometria de massas. O acúmulo da proteína SET em células NOK-SI induziu alterações no perfil de esfingolipídios, sugerindo que tem impacto no metabolismo destes lipídios. Com relação aos pacientes, confirmamos que alguns parâmetros, tais como estadiamento, tamanho do tumor, metástase linfonodal, invasão perineural e invasão angiolinfática impactam na sobrevida do paciente. Nossos resultados revelaram que há diferença entre os perfis de esfingolipídios plasmáticos de pacientes com CECP em comparação com o grupo controle. Em plasma de pacientes e tecido tumoral identificamos tanto níveis reduzidos quanto níveis aumentados de esfingolipídios que podem ser potenciais indicadores de prognóstico em CECP. Além disto, verificamos que há um gradiente e perfil específico destas moléculas no microambiente tumoral e outro no plasma dos pacientes. Por fim, identificamos esfingolipídios com potencial como candidatos a marcadores de diagnóstico no plasma, sendo que a combinação de alguns deles tem alta sensibilidade e especificidade. Desta forma, concluímos que: i) a proteína SET pode modificar o metabolismo dos esfingolipídios, e ii) os esfingolipídios identificados neste estudo tem potencial como candidatos a marcadores diagnóstico e prognóstico em CECP. Outros estudos serão necessários para entender como os esfingolipídios identificados participam no processo de progressão do CECP.

Palavra chaves: Câncer oral; Plasma; Tecido neoplásicos; Marcadores tumorais; Proteína SET

ABSTRACT

FAEDO, Raquel Roman. **Profile of sphingolipids in head and neck cancer**. 2021. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Sphingolipids are a class of essential lipids in eukaryotes not only by composing the plasma membrane but because they are bioactive molecules. Because of the large number of pathways that these molecules regulate, the imbalance in their metabolism triggers a series of pathologies, such as cancer. In head and neck cell carcinoma (HNSCC) patients, the reduction in ceramide level was associated with tumor progression and worse prognosis, but other sphingolipids were not evaluated. In the present study, we propose to determine the profile of sphingolipids in samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma and to search association with clinical and pathological parameters. Moreover, we study the relationship between sphingolipids and SET overexpression in oral keratinocyte cell lineage (NOK-SI), due to this protein is accumulated in HNSCC. Samples of plasma (n=56), tumor and surgical margin tissues (n=84) from HNSCC patients, plasma from control group (n=58) and NOK-SI/SET cells were used for lipids extraction. The sphingolipids were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry. As expected, we found that stage, tumor size, lymph node metastasis, perineural invasion, and angiolymphatic invasion affect HNSCC patient survival. Therefore, our results showed difference between sphingolipids plasma profile of HNSCC patients compared to controls. Also, alterations in some sphingolipid molecules in plasma may be indicators of worse prognosis in HNSCC. In the tumor tissue, twelve sphingolipids were associated with clinical and pathological parameters, being that the alterations of specific sphingolipids were related to more aggressive parameters. Furthermore, we evaluated the potential of these molecules as candidates for diagnostic markers in plasma, and six of them showed promise, as well as the combinations of some of them have high sensitivity and specificity. Finally, the accumulation of SET protein in NOK-SI cells induced alterations in sphingolipids profile, suggesting a SET role in metabolism of sphingolipids. In conclusion, we propose the altered sphingolipids as potential candidates for diagnostic and prognostic markers in HNSCC. Further studies will be needed to understand how the sphingolipids are related to head and neck cancer progression.

Keywords: Oral cancer; plasma; neoplastic tissues; tumor markers. SET protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura esfingolipídica geral	16
Figura 2. Metabolismo dos esfingolipídios	18
Figura 3 Mapa de calor mostra os níveis dos esfingolipídios das linhagens celulares analisadas	Erro! Indicador não definido.
Figura 4. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados aos fatores de risco, tabagismo e etilismo. Erro! Indicador não definido.	
Figura 5. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a classificação clínica do tumor (cT) e tamanho do tumor (cm)	Erro! Indicador não definido.
Figura 6. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a estadiamento	Erro! Indicador não definido.
Figura 7. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a invasão perineural e metástase.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 Mapa de calor mostra os níveis dos esfingolipídios de plasmas controle e paciente CECP	Erro! Indicador não definido.
Figura 9: Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de indivíduos controle e pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.
Figura 10: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao tabagismo	Erro! Indicador não definido.
Figura 11: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao etilismo	Erro! Indicador não definido.
Figura 12: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados linfonodo positivo (pN+), invasão perineural, recorrência locorregional e metástase	Erro! Indicador não definido.
Figura 13: Concentração dos esfingolipídios (nM) com níveis alterados entre tecido tumoral e margem cirúrgica de pacientes com CECP ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 14: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.
Figura 15: Taxa de risco (HR) para esfingolipídios em CECP (plasma e tumor) .	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolipídios nos plasmas dos pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.

Figura 17: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolipídios nos tecidos tumorais dos pacientes com CECP **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global considerando os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes com CECP **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19: Curva ROC referente aos esfingolipídios dos plasmas dos pacientes com CECP. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20: Curva ROC referente as combinações dos esfingolipídios dos plasmas dos pacientes com CECP. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográfica e clinico- patológicas dos grupos caso e controle.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
C1PP	Ceramida quinase
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CECP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
Cer	Ceramida
Cer1P	Ceramida-1-fosfato
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DHCer	Diidroceramida
DHCer1P	Diidroceramida-1-fosfato
DHGlcCer	Diidroglicosilceramida
DHSM	Diidroesfingomielina
EERP-USP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FM-USP-SP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GCS	Glucosilceramida
GlcCer	Glucosilceramida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
LacCer	Lactosilceramida
LC-ESI-MS / MS	Cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massa sequencial
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MS	Espectrometria de massas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NOK-SI	Queratinócito oral não tumoral imortalizado
PKC	Proteína quinase C
PP2A	Proteína fosfatase 2
S1P	Esfingosina-1-fosfato
Sa	Esfinganina

Sa1P	Esfinganina-1-fosfato
SM	Esfingomielina
SMase	Esfingomielinases
SMS	Esfingomielina sintase
So	Esfingosina
So1P	Esfingosina-1-fosfato
SphK	Esfingosina quinases
SPT	Serina palmitoiltransferase
WT	Selvagem
RCO	Característica de Operação do Receptor
AUC	Área sob a curva

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligramo
n	Número
nM	Nanomolar

Sumário

1 Introdução	16
1.1. Esfingolipídios.....	16
1.2. Metabolismo dos esfingolipídios	17
1.3. Ceramida: estrutura, função e câncer.....	19
1.4. Esfingosina e Esfingosina-1-fosfato: Estrutura, função e câncer	21
1.5. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e esfingolipídios	22
2. Objetivo	25
3. Materiais e Métodos	Erro! Indicador não definido.
3.1. Delineamento experimental	Erro! Indicador não definido.
3.2. Casuística e amostras biológicas	Erro! Indicador não definido.
3.3. Preparação das linhagens celulares para extração de esfingolipídios	Erro! Indicador não definido.
3.4. Identificação e quantificação de esfingolipídios a partir de amostras biológicas por espectrometria de massas.....	Erro! Indicador não definido.
3.5. Análises estatísticas	Erro! Indicador não definido.
4. Resultados e Discussão	Erro! Indicador não definido.
4.1. Perfil de esfingolipídios nas linhagens de NOK-SI com aumento da proteína SET selvagem e SET com mutação	Erro! Indicador não definido.
4.2. Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CECP e indivíduos controle no estudo	Erro! Indicador não definido.
4.3. Associação entre os níveis de esfingolipídios do plasma com características clínico-patológicas de pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.
4.4. Comparação entre o perfil de esfingolipídios do plasma de pacientes CECP e plasma do grupo controle	Erro! Indicador não definido.
4.5. Associação dos níveis de esfingolipídios com características clínico-patológicas do tecido de pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.

4.6. Análise comparativa do perfil esfingolipídico do tecido tumoral e da margem cirúrgica de pacientes com CECP	Erro! Indicador não definido.
4.7. Esfingolipídios plasmáticos e no tumor podem ser indicadores de prognóstico em pacientes com CECP.....	Erro! Indicador não definido.
4.8. Avaliação do potencial diagnóstico dos esfingolipídios no plasma	Erro! Indicador não definido.
5. Conclusões.....	26
Referências	27
Anexo A - Parecer de aprovação CEP do projeto temático: SET e esfingolipídeos em câncer de cabeça e pescoço: sinalização, alvos e terapia antitumoral.	34
Anexo B – Parecer de aprovação CEP do projeto de mestrado: Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço.....	38

1 Introdução

1.1. Esfingolipídios

Os esfingolipídios são uma família de lipídios, que atualmente contém mais de 4.858 membros, sendo 1.682 curados, segundo o banco de dados MAPS LIPID (MAPS, 2020). A primeira molécula descrita foi a esfingosina (Sa) em 1884 por Johann LW Thudichum e, posteriormente, caracterizada por Herb Carter (PRUETT, 2008). Estruturalmente, a esfingosina é composta por uma região hidrofílica e outra região hidrofóbica, caracterizando uma molécula anfipática (FUTERMAN, 2016).

A região polar é formada por uma base de cadeia longa, conhecida como base esfingóide, que em mamíferos normalmente é a esfingosina (figura 1) (RAO; ACHARYA, 2008). Na base esfingóide liga-se um ácido graxo por meio de uma ligação amida, formando a ceramida (Cer), cuja cadeia pode variar de 14 a 26 carbonos (OGRETMEN, 2018; RAO; ACHARYA, 2008). A estrutura principal, juntamente com modificação no grupo polar, variação no comprimento das cadeias carbônicas ou na saturação, originam a grande gama de esfingolipídios. Desta forma cada esfingolipídio pode exercer diferentes funções celulares.

Figura 1 Estrutura esfingolipídica geral. Todos esfingolipídios contém uma base esfingóide por exemplo, esfingosina (verde) que pode estar ligada a um ácido graxo através de uma ligação amida (amarelo), formando a unidade de ceramida. Adição de fosfocolina ou carboidratos no radical livre leva a formação de esfingomielina ou glicosfingolipídios, respectivamente (azul). Os esqueletos carbônicos podem apresentar diferentes tamanho (n) e saturações. Fonte: Própria (2021)

Inicialmente o papel dos esfingolipídios foi considerado apenas estrutural, sendo um dos componentes principais nas membranas dos eucariotos (BARTKE; HANNUN, 2009). Posteriormente demais funções foram atribuídas a essas moléculas, dois mecanismos gerais de atuação dos esfingolipídios são descritos: primeiramente, interações lipídio-

lipídio, na qual devido as características químicas modulam as propriedades físicas da bicamada lipídica e atividades de proteínas transmembrana (BRESLOW; WEISSMAN, 2010). Processos celulares relacionados a membrana, como endocitose, tráfico intracelular e transdução de sinal por receptores de membrana também estão relacionados aos esfingolipídios (BRESLOW; WEISSMAN, 2010). Como exemplo, a estabilização de receptores de células B e T na membrana plasmática, permitindo assim que a sinalização dessas células ocorra (LINGWOOD; SIMONS, 2010).

O segundo mecanismo, recentemente descoberto, foi a interação lipídio-proteína (ZHOU; BLOM, 2015). Portanto, estes esfingolipídios são moléculas bioativas, capazes de regular transduções de sinais e modular respostas celulares (SIMONS; IKONEN, 1997). Essas moléculas funcionam como mensageiros intra e intercelulares em vias de sinalização que envolve receptores. Dentre a diversidade de vias que os esfingolipídios tem sido associados destacam-se: proliferação celular, apoptose, senescência, anfigênese, endocitose, transporte, migração e inflamação (HANNUN; OBEID, 2008).

1.2. Metabolismo dos esfingolipídios

O metabolismo dos esfingolipídios é altamente regulado e complexo, devido as interconversões dessas moléculas por mais de 40 enzimas diferentes (HANNUN; LUBERTO; ARGRAVES, 2001). Além disso muitas dessas enzimas e seus produtos são compartimentalizados, restringindo o local de ação (HANNUN; LUBERTO; ARGRAVES, 2001). Nas múltiplas etapas da biossíntese dos esfingolipídios, a ceramida é o intermediário chave no metabolismo (Figura 2). Por meio da ceramida é possível originar desde esfingolipídios simples a complexos, por meio de inúmeras reações enzimáticas (PRALHADA RAO, 2013).

Existem três vias biosintéticas conhecidas, a via *de novo*, a via de salvação e a hidrólise de esfingolipídios complexo (OGRETMEN, 2018). Em mamíferos, a via *de novo* (figura 2) é a principal via endógena de síntese de ceramida, tendo início no retículo endoplasmático (DON; LIM; COUTTAS, 2014). No retículo a reação catalisada pela enzima serina palmitoiltransferase (SPT) origina 3-ceto-esfinganina, a partir da conjugação do aminoácido serina com o ácido graxo palmotoil-CoA (BARTKE; HANNUN, 2009). O produto desta reação é reduzido em diidroesfingosina que ainda é convertido em diidroceramida (DHCer) que por fim é desidrogenada em ceramida (BARTKE; HANNUN, 2009). A ceramida pode ser fosforilada pela ceramida quinase (C1PP),

glicosilada pela glucosilceramida (GCS), ou receber um grupo fosfocolina através das esfingomielinas sintases (SMS) (HANNUN; OBEID, 2008).

A via de salvação (reciclagem) recicla ceramidas de cadeias curta (C2 a C4) de origem exógena, estas são permeáveis a membrana celular e no complexo de Golgi são desacetiladas gerando esfingosina livre, que podem ser reutilizada no metabolismo (KITATANI; IDKOWIAK-BALDYS; HANNUN, 2008). Os esfingolípídios complexos, como a glucosilceramida (GlcCer), também são reciclados nestas via, no interior dos endossomos tardios ou lisossomos essas moléculas são metabolizadas em ceramida e posteriormente hidrolizadas em esfingosina, e esta é capaz de deixar a vesícula e ser reutilizada (KITATANI; IDKOWIAK-BALDYS; HANNUN, 2008). Por fim, há a síntese de ceramida por hidrólise de esfingolípídios complexos, que utiliza, por exemplo a esfingomielina (SM) para a geração de ceramida pela ação de enzimas esfingomielinases (SMase) (OGRETMEN, 2018).

Figura 2. Metabolismo dos esfingolípídios. A via de novo (verde) sintetiza ceramida através da serina palmitoiltransferase (SPT), (diidro) ceramida sintase (CerS) e diidroceramida desaturase (DES). A via de salvação (roxo) gera ceramida pela hidrólise de glicosilceramida. A ceramida também pode ser gerada pela hidrólise de esfingolípídios complexos (amarelo), como esfingomielina, pela ação das esfingomielinases (SMases). A ceramida pode ser catabolizada para esfingosina e esfingosina-1-fosfato (azul) ou ainda para ceramida-1-fosfato (cinza escuro). A diidroceramida pode ser transformada em outros diidroesfingolípídios (cinza claro). SPT - Serina Palmitoiltransferase; CerS - (diidro)Ceramide Sintase; DES - Diidroceramide Desaturase; SMase - Esfingomielinase; SMS - Esfingomielina Sintase; CerK - Ceramida Quinase; C1PP - Ceramida-1-fosfatase; Dase - Ceramidase; SphK - Esfingosina Quinase; S1PP - Esfingosina-1-fosfatase; GCS - Glucosilceramida Sintase; GCase - Glucosilceramidase; LCS - Lactosilceramida Sintase.

A manutenção do equilíbrio bioquímico desses lipídios é de crucial importância devido as diversas vias metabólicas que essas moléculas estão envolvidas (TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; IINO *et al.*, 2013). No entanto, manter este equilíbrio não é um processo simples, devido à grande complexidade das interconexões dessas moléculas, onde o produto de uma enzima pode servir como substrato para outra (OGRETMEN; HANNUN, 2004). Como exemplo, a hidrólise da ceramida gera esfingosina, que pode atuar diretamente ou ao ser fosforilada produz esfingosina-1-fosfato (So1P), que tem funções específicas (OGRETMEN; HANNUN, 2004; ZHANG; DESAI; OLIVERA; SEKI *et al.*, 1991). Logo, diversas doenças como diabetes, Alzheimer e câncer vem sendo associadas a alterações no metabolismo de esfingolipídios (KOLTER, 2011; PRALHADA RAO, 2013).

No processo de carcinogênese já foi demonstrado que alterações no metabolismo dos esfingolipídios estão relacionados ao desenvolvimento e progressão do câncer (HANNUN; OBEID, 2008; LIANG; NAGAHASHI; KIM; HARIKUMAR *et al.*, 2013; NAGAHASHI; RAMACHANDRAN; KIM; ALLEGOOD *et al.*, 2012). Em carcinoma hepatocelular há redução significativa dos níveis de ceramida, uma molécula pro-apoptótica, favorecendo desta forma a proliferação celular (PRALHADA RAO; VAIDYANATHAN; RENGASAMY; OOMMEN *et al.*, 2013). Portanto, o desequilíbrio da homeostase dos esfingolipídios resulta no favorecimento de fatores chave da carcinogênese (ZHANG; DESAI; OLIVERA; SEKI *et al.*, 1991). Neste cenário, três esfingolipídios vêm se destacando nos processos de desenvolvimento e progressão da doença, sendo eles: ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato (FURUYA; SHIMIZU; KAWAMORI, 2011).

1.3. Ceramida: estrutura, função e câncer

A ceramida é um esfingolipídio bioativo, composto por uma esfingosina ligada numa cadeia de ácido graxo (SADDOUGH; SONG; OGRET MEN, 2008). Esta molécula é um importante precursor metabólico e estrutural de esfingolipídios complexos, como a esfingomielina e a esfingosina-1-fosfato (SADDOUGH; SONG; OGRET MEN, 2008). A ceramida vem sendo associada a regulação da proliferação celular, apoptose e ciclo celular (PATWARDHAN; LIU, 2011), em resposta a diversos estímulos extracelulares, incluindo estresse oxidativo e fatores de necrose tumoral (DON; LIM; COUTTAS, 2014). Os alvos mais comuns das ceramidas são proteínas fosfatases e quinases, que regulam

importantes vias celulares, como proteína quinase B (AKT), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008).

A localização subcelular da ceramida é um fator que influencia na sua função biológica (SAHU; HANNUN; YAO, 2019). Moléculas de ceramida compartimentalizadas na membrana celular influenciam vias de morte celular e inibição de crescimento (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008). Ceramidas na mitocôndria podem regular proteínas da família Bcl-2, propiciando a liberação do citocromo C e a permeabilidade da membrana mitocondrial (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008). Desta forma, a quantidade de ceramidas presente na mitocôndria pode levar a célula à morte pela via intrínseca da apoptose (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008). Em organelas como os lisossomos, a ceramida pode levar a ativação induzida por clivagem de BID (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008), uma proteína pró-apoptótica que favorece a permeabilização da membrana mitocôndria externa, levando a ativação da via apoptótica (BILLEN; SHAMAS-DIN; ANDREWS, 2009). No núcleo, a ceramida induz splicing alternativo das proteínas pró-apoptóticas Bcl-x e caspase-9 (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008). Além de ter função importante na inibição da expressão de enzimas transcriptase reversa da telomerase (hTERT), responsáveis por catalisar alongamento e manutenção dos telômeros dos cromossomos (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008).

As funções biológicas da ceramida também vem sendo associadas aos diferentes comprimentos de cadeia de ácido graxo (DON; LIM; COUTTAS, 2014). Tornando ainda mais complexo o entendimento dessa molécula. Duas moléculas C16:0 Cer e C18:0 Cer vem sendo descritas com funções divergentes na biologia celular. Níveis elevados de C16:0 Cer estão associados a fenótipos mais agressivos de câncer (DON; LIM; COUTTAS, 2014). Enquanto, C18:0 Cer é descrita como molécula antitumoral, por sua função pró-apoptótica. Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) já foi descrito que níveis reduzidos de C18:0 Cer foram relacionados a maiores índices de invasão linfovascular e metástase (SADDOUGHI; SONG; OGRET MEN, 2008). Sendo assim, a ceramida é um esfingolípídeo que apresenta grande influência no destino celular por estar relacionada com vias pró-apoptóticas e proliferativas (DON; LIM; COUTTAS, 2014).

1.4. Esfingosina e Esfingosina-1-fosfato: Estrutura, função e câncer

A esfingosina é um dos mais simples esfingolipídios. Esta molécula é sintetizada principalmente pela hidrólise da ceramida. Suas funções celulares estão relacionadas a sensibilização celular a apoptose e a senescência (ZHOU; BLOM, 2015). A esfingosina pode também se ligar a diferentes proteínas atuando como supressor tumoral. Mecanismos de regulação da via MAPK e ERK foram associados a esfingosina. Além dessa molécula ser capaz de induzir caspases pró-apoptóticas (DON; LIM; COUTTAS, 2014).

A esfingosina-1-fosfato é produto da fosforilação da esfingosina pelas enzimas esfingosina quinases (SphK) 1 e 2. Essa molécula, assim como a ceramida, apresenta um grande potencial regulatório em diversas vias celulares (DON; LIM; COUTTAS, 2014; ZHANG; DESAI; OLIVERA; SEKI *et al.*, 1991). Os principais processos biológicos regulados por So1P são proliferação e sobrevivência celular, adesão, motilidade, angiogênese e inflamação (CUVILLIER; PIRIANOV; KLEUSER; VANEK *et al.*, 1996; PULKOSKI-GROSS; DONALDSON; OBEID, 2015). As sinalizações ou ações via esfingosina-1-fosfato ocorrem principalmente por meio de cinco receptores acoplados à proteína G, de maneira autócrina, parácrina ou/e endócrina (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY *et al.*, 2016; TAKABE; SPIEGEL, 2014). No entanto também podem ocorrer de maneira independente de receptor, já foi descrito que no citoplasma a esfingosina-1-fosfato pode ativar a sinalização de fator nuclear kappa B (NF-κB), descrita por promover proliferação de células tumorais, angiogênese, suprime a apoptose e facilita a metástase à distância por induzir transição epitelial mesenquimal (XIA ; SHEN; VERMA, 2014). O receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma também é alvo da So1P, que é responsável por regular a neo-angiogênese em células endoteliais humanas (OGRETMEN, 2018). No núcleo este esfingolipídio está associado ao bloqueio da desacetilação de histona H3 na região promotora do proto-oncogene FOS (OGRETMEN, 2018).

Outras sinalizações mediadas por S1P é a mobilização de células T, B e natural killer (PROIA; HLA, 2015). O recrutamento das células de defesa do organismo pode ocorrer em resposta aos níveis de esfingosina-1-fosfato, pois este esfingolipídio atua como mediador quimiotático (DON; LIM; COUTTAS, 2014). Na proliferação, está associada ao aumento do estímulo à transição do ciclo celular de G1 para fase S (ZHOU; BLOM, 2015).

A angiogênese, também pode ser regulada por meio da formação e ativação de caderina do endotélio vascular e integrina, que são fatores importantes na migração de células vasculares endoteliais. A migração celular é influenciada por esfingosina-1-fosfato por interferir na dinâmica do citoesqueleto por meio de Rac GTPase induzindo a montagem de actina no córtex celular (MENDELSON; EVANS; HLA, 2014).

Portanto a esfingosina-1-fosfato exerce importante papel no microambiente tumoral, principalmente por estar envolvida em processos críticos de progressão do câncer, sendo estes a sobrevivência celular, proliferação, migração, angiogênese e resposta imune (TAKABE; SPIEGEL, 2014).

1.5. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e esfingolipídios

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um termo genérico que engloba neoplasias de diferentes sítios anatômicos, os quais incluem cavidade oral, língua, faringe, laringe, glândulas salivares, cavidade nasal e seios paranasais (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY *et al.*, 2016). Desses cânceres aproximadamente 90% são histologicamente classificados como, carcinoma espinocelular, e tem origem no epitélio da mucosa oral (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; TAHMASEBI; ALIKHANI; YAZDANIAN; YAZDANIAN *et al.*, 2020). Mais de 50% tem como o sítio primário a língua e assoalho da boca, seguidos pela gengiva, palato, mucosa bucal e labial (LI; SHEN; BAVARIAN; YANG *et al.*, 2020).

A estatística é que no Brasil tenha aproximadamente 15 mil novos casos no ano de 2020, sendo o quinto câncer mais comum entre os homens (INCA, 2020). No cenário mundial, neste mesmo ano, estima-se 371.638 novos casos, correspondendo ao décimo sétimo câncer mais incidente (FERLAY; ERVIK; LAM; COLOMBET *et al.*, 2018). Os pacientes acometidos por essa doença tem uma taxa de sobrevida de 50% em 5 anos (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2010). O agravante neste tipo de câncer é que uma grande parcela dos pacientes (50 a 60%) é diagnosticada em estágio III ou IV, sendo o estágio avançado da doença. Destes aproximadamente 50% apresentam recidivas locorregionais ou a distância no primeiro ano de tratamento (AZAD; BAIRATI; QIU; GIRGIS *et al.*, 2016).

As terapias disponíveis atualmente limitam-se a cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia. Devido à localização do tumor é comum ocorrer perda de grandes áreas

da região afetada, levando desde prejuízos estéticos até o comprometimento funcional, como perda da fala e deglutição (BECKHAM; ELOJEIMY; CHENG; TURNER *et al.*, 2010). Há um grande desafio em aumentar as taxas de diagnóstico precoce e desenvolver novas abordagens terapêuticas em CECP. Os esfingolipídios vem se destacando como alternativas terapêuticas para o tratamento e diagnóstico de cânceres, visto que o metabolismo de biossíntese dos lipídios é alterado nestas condições (HUANG; FRETER, 2015). A relação entre os esfingolipídios e CECP ainda pouco explorada.

Um estudo randômico avaliou os níveis de ceramida em 45 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, com diferentes sítios incluindo câncer de cavidade oral, laringe e cavidade nasal, e identificou uma forte relação entre a redução ceramida (especialmente a C18:0 Cer) em tecidos tumorais, invasão linfovascular e metástase (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007). Em leucoplasia, câncer de laringe e de boca foi descrito que ocorre uma diminuição progressiva de ceramida conforme o tecido saudável se transforma em maligno (BECKHAM; ELOJEIMY; CHENG; TURNER *et al.*, 2010). A redução de ceramida contribui para a maior motilidade celular e diminuição de sinalização por proteína fosfatase 2 (PP2A), que regula, por exemplo, a invasão vascular (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007). Essa sinalização pode estar sendo favorecida pelo aumento da ligação de PP2A com seu inibidor, a proteína SET (LI; MAKKINJE; DAMUNI, 1996). Uma vez que a SET é um alvo de ligação da ceramida, essa interação inibe sinais mitógenos e estimula fatores pro-apoptose, por ativação de PP2A (KALEV; SABLINA, 2011; MUKHOPADHYAY; SADDOUGH; SONG; SULTAN *et al.*, 2009). O conjunto de dados citados suportam a visão que a ceramida desempenha importantes funções na progressão do tumor, assim como sua desregulação está associada a piores parâmetros clínicos (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007).

O esfingolipídio S1P vem sendo descrito alterado em câncer. Em câncer de esôfago, que possui uma taxa de sobrevivência menor de 20%, a S1P exerce grande influência sobre o aumento da invasão celular e migração por ativar ERK, um membro da via proliferativa de MAPK (BECKHAM; ELOJEIMY; CHENG; TURNER *et al.*, 2010). Em câncer de tireoide foi descrito que níveis maiores de S1P acarreta aumento da migração das células, por meio de sinalização autocrina e ativação da via MAPK (BECKHAM; ELOJEIMY; CHENG; TURNER *et al.*, 2010). Existem dados sobre análises de tumores de mama por espectrometria de massas que demonstraram que os níveis de esfingosina-

1-fosfato são maiores em tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais de mama (NAGAHASHI; TSUCHIDA; MORO; HASEGAWA et al., 2016). Pela primeira vez, foi mostrado que pacientes com metástase nos linfonodos apresentam maiores níveis de esfingosina-1-fosfato quando comparados com pacientes com linfonodo negativo (TSUCHIDA; NAGAHASHI; NAKAJIMA; MORO et al., 2016).

Alguns estudos são voltados para a análise da enzima esfingosina quinase, que é responsável por fosforilação da esfingosina transformando em esfingosina-1-fosfato. O aumento da atividade desta enzima encontra-se envolvido na carcinogênese, invasão, metástase e radiosensibilização de tumores de língua (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY et al., 2016). Um estudo com 124 pacientes com câncer de esôfago identificou uma correlação entre maior expressão de enzima esfingosina quinase 1 com piores taxas de sobrevivência e maior taxa de sobrevida com menores expressões da enzima (TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; IINO et al., 2013). Além disso a maior expressão de esfingosina quinase apresentou correlação com a profundidade da invasão tumoral e metástase nos linfonodos (TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; IINO et al., 2013).

Mais recentemente um estudo *in vivo*, analisou o perfil de três esfingolipídios (ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato) (BAI; LIU; BIELAWSKI; HANNUN, 2019). Neste estudo foram analisados, xenoenxerto de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, e diferentes órgãos do modelo animal (pulmão, fígado, cérebro, baço, bexiga, rim, coração), além do plasma, para traçar o perfil de alguns esfingolipídios. Os resultados mostraram que os níveis dos esfingolipídios analisados diferem entre os órgãos analisados. No cérebro foram encontrados maiores níveis de ceramida do que no rim, onde os níveis mais elevados eram de esfingosina. No plasma, foi possível identificar níveis de ceramidas, porém o esfingolipídio mais abundante foi a esfingosina-1-fosfato.

É evidente o potencial envolvimento dos esfingolipídios em CECP, principalmente pela hipótese de estarem envolvidos nos mecanismos de desenvolvimento e progressão tumorigênico. Desta forma, se torna necessário ampliar os conhecimentos sobre o perfil destas moléculas nos pacientes com CECP e no microambiente tumoral. Possibilitando um melhor entendimento do comportamento dessas moléculas em CECP e o potencial dos esfingolipídios como candidatos a marcadores e alvos terapêuticos.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo determinar o perfil dos esfingolipídios em amostras de plasma e tecido (tumor e margem cirúrgica) de pacientes com CECP para avaliar potenciais associações com parâmetros clínicos e patológicos, e comparar o perfil do plasma com um grupo controle. Além de estudar a relação da superexpressão da proteína SET com esfingolipídios em linhagem de queratinócitos orais (NOK-SI).

5. Conclusões

Esse estudo é o primeiro no Brasil analisar 28 esfingolipídios por espectrometria de massa, em amostras de plasma e tecido de pacientes com CECp, em controles (plasmas de indivíduos saudáveis e tecido de margem cirúrgica de pacientes). No total foram analisadas 198 amostras, sendo 42 de tecido tumoral, 42 de margem cirúrgica, 56 plasmas de pacientes com CECp e 58 plasmas de indivíduos saudáveis. Até o momento, não tem um estudo como esse, que agrupou tanto um número de amostras relevantes de plasma e tecido tumoral, quanto analisou uma grande diversidade de esfingolipídios.

Concluimos que o presente trabalho contribuiu de forma significativa para um melhor entendimento dos esfingolipídios no CECp, revelando quais esfingolipídios podem ter potencial valor para diagnóstico, acompanhamento e prognóstico dos pacientes. Além disto, nossos resultados revelaram não somente como é o metabolismo destes lipídios em CECp, mas quais esfingolipídios podem ter papéis importantes no desenvolvimento e progressão deste tipo de câncer. Alterações no metabolismo dos esfingolipídios também foi encontrado associado a superexpressão da proteína SET em linhagem celular de queratinócitos, certamente essa proteína exerce um papel fundamental no processo de tumorigênese. Os dados aqui encontrados poderão contribuir no estudo dos esfingolipídios a fim de fornecer novas perspectivas e estratégias terapêuticas o câncer de cabeça e pescoço.

Referências

Gomez-Muñoz, Antonio. The Role of Ceramide 1-Phosphate in Tumor Cell Survival and Dissemination. **Advances in cancer research**, 140, 2018.

ABRAHAN, C.; MIRANDA, G.; AGNOLAZZA, D.; POLITI, L. *et al.* Synthesis of sphingosine is essential for oxidative stress-induced apoptosis of photoreceptors. **Investigative ophthalmology & visual science**, 51, n. 2, 2010.

ABRAHÃO, R.; PERDOMO, S.; PINTO, L. F. R.; CARVALHO, F. N. *et al.* Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study. **JCO Glob Oncol**, 6:486-499, 2020.

ANDRIEU-ABADIE, N.; GOUAZÉ, V.; SALVAYRE, R.; LEVADE, T. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, 31, n. 6, 2001.

APOSTOLOPOULOU, M.; GORDILLO, R.; KOLIAKI, C.; GANCHEVA, S. *et al.* Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. **Diabetes Care**, 41(6):1235-1243, 2018.

AZAD, A. K.; BAIRATI, I.; QIU, X.; GIRGIS, H. *et al.* A genome-wide association study of non-HPV-related head and neck squamous cell carcinoma identifies prognostic genetic sequence variants in the MAP-kinase and hormone pathways. **Cancer Epidemiol**, 42, p. 173-180, 2016.

BAE, M.; BANDARU, V. V. R.; PATEL, N.; HAUGHEY, N. J. Ceramide metabolism analysis in a model of binge drinking reveals both neuroprotective and toxic effects of ethanol. **J Neurochem**, 131(5): 645–654, 2014.

BAI, A.; LIU, X.; BIELAWSKI, J.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipid profile in a xenograft mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, 14, n. 4, p. e0215770, 2019.

BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *In: J Lipid Res*, v. 50, p. S91-96, 2009.

BECKHAM, T. H.; ELOJEIMY, S.; CHENG, J. C.; TURNER, L. S. *et al.* Targeting sphingolipid metabolism in head and neck cancer: rational therapeutic potentials. **Expert Opin Ther Targets**, 14, n. 5, p. 529-539, 2010.

BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, 27, n. 1, 2009.

BRESLOW, D. K.; WEISSMAN, J. S. Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. **Mol Cell**, 40, n. 2, p. 267-279, 2010.

BUDACH, V.; TINHOFER, I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review. **Lancet Oncol** 20, p. e313-e326, 2019.

CHATTERJEE, S. B.; HOU, J.; BANDARU, V. V. R.; PEZHOUH, M. K. *et al.* Lactosylceramide Synthase β -1,4-GalT-V: A Novel Target for the Diagnosis and Therapy of Human Colorectal Cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, 508, n. 2, 2019.

CHEN, L.; CHEN, H.; LI, Y.; LI, L. *et al.* Endocannabinoid and ceramide levels are altered in patients with colorectal cancer. **Oncology Reports**, 34, n. 1, p. 447-454, 2015.

CUVILLIER, O.; PIRIANOV, G.; KLEUSER, B.; VANEK, P. G. *et al.* Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. **Nature**, 381, n. 6585, p. 800-803, 1996.

DON, A. S.; LIM, X. Y.; COUTTAS, T. A. Re-Configuration of Sphingolipid Metabolism by Oncogenic Transformation. *In*: **Biomolecules**, v. 4, p. 315-353, 2014.

DU, E.; MAZUL, A. L.; FARQUHAR, D.; BRENNAN, P. *et al.* Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. **The Laryngoscope**, vol. 129,11: 2506-2513, 2019.

ELKASHTY, O. A.; ASHRY, R.; TRAN, S. D. Head and neck cancer management and cancer stem cells implication. **Saudi Dent J**, 31, n. 4, p. 395-416, 2019.

FABRIAS, G.; MUÑOZ-OLAYA, J.; CINGOLANI, F.; SIGNORELLI, P. *et al.* Dihydroceramide Desaturase and Dihydrosphingolipids: Debutant Players in the Sphingolipid Arena. **Progress in lipid research**, 51, n. 2, 2012.

FAVALE, N. O.; SANTACREU, B. J.; PESCIO, L. G.; MARQUEZ, M. G. *et al.* Sphingomyelin metabolism is involved in the differentiation of MDCK cells induced by environmental hypertonicity. *In*: **J Lipid Res**, v. 56, p. 786-800, 2015.

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; COLOMBET, M. *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow**. 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.

FURUYA, H.; SHIMIZU, Y.; KAWAMORI, T. Sphingolipids in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 30, n. 3-4, p. 567-576, 2011.

FUTERMAN, A. H. Chapter 10 - Sphingolipids. *In*: RIDGWAY, N. D. e MCLEOD, R. S. (Ed.). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Sixth Edition). **Boston: Elsevier**, p. 297-326, 2016.

GODFREY, J.; JEANGUENIN, L.; CASTRO, N.; OLNEY, J. J. *et al.* Chronic Voluntary Ethanol Consumption Induces Favorable Ceramide Profiles in Selectively Bred Alcohol-Preferring (P) Rats. **PLoS One**, 10(9):e0139012, 2015.

GOMEZ-MUÑOZ, A. The role of ceramide 1-phosphate in tumor cell survival and dissemination. *In*: **Advances in Cancer Research**: Elsevier, v. 140, p. 217-234, 2018.

GRAMMATIKOS, G.; SCHOELL, N.; FERREIRÓS, N.; BON, D. *et al.* Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16- ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 5; 7(14): 18095–18105, 2016.

GUPTA, G.; BAUMLIN, N.; POON, J.; AHMED, B. *et al.* Airway Resistance Caused by Sphingomyelin Synthase 2 Insufficiency in Response to Cigarette Smoke. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 62(3):342-353, 2020

HANNUN, Y. A.; LUBERTO, C.; ARGRAVES, K. M. Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling. **Biochemistry**, 40(16):4893-4903, 2001.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, n. 2, p. 139-150, 2008.

HARTMANN, D.; LUCKS, J.; FUCHS, S.; SCHIFFMANN, S. *et al.* Long Chain Ceramides and Very Long Chain Ceramides Have Opposite Effects on Human Breast and Colon Cancer Cell Growth. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 44, n. 4, 2012 Apr 2012.

HOLLIDAY JR, M. W.; COX, S. B.; KANG, M. H.; MAURER, B. J. C22:0- and C24:0-dihydroceramides Confer Mixed Cytotoxicity in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *In: PLoS One*, 2013.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **International journal of molecular sciences**, 16, n. 1, 2015.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>.

IONESCU, N.; DE FREITAS, C.; BUENO, A. A. Perturbations in Blood Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Fatty Acid Composition in a Sample Population of Cigarette Smokers. *In: Indian J Clin Biochem*, v. 28, p. 361-367, 2013.

KALEV, P.; SABLINA, A. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 11, n. 1, 2011.

KARAHATAY, S.; THOMAS, K.; KOYBASI, S.; SENKAL, C. E. *et al.* Clinical Relevance of Ceramide Metabolism in the Pathogenesis of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC): Attenuation of C18-ceramide in HNSCC Tumors Correlates with Lymphovascular Invasion and Nodal Metastasis. **Cancer Lett**, 256, n. 1, p. 101-111, 2007.

KHAYRULLIN, A.; KRISHNAN, P.; MARTINEZ-NATER, L.; MENDHE, B. *et al.* Very Long-Chain C24:1 Ceramide Is Increased in Serum Extracellular Vesicles with Aging and Can Induce Senescence in Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells. *In: Cells*. v. 8, 2019.

KIM, J. W.; PARK, Y.; ROH, J.-L.; CHO, K.-J. C. *et al.* Prognostic Value of Glucosylceramide Synthase and P-glycoprotein Expression in Oral Cavity Cancer. **International journal of clinical oncology**, 21, n. 5, 2016 .

KITATANI, K.; IDKOWIAK-BALDYS, J.; HANNUN, Y. A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. **Cell Signal**, 20, n. 6, p. 1010-1018, 2008.

KOLTER, T. A view on sphingolipids and disease. **Chem Phys Lipids**, 164, n. 6, p. 590-606, 2011.

KOYBASI, S.; SENKAL, C. E.; SUNDARARAJ, K.; SPASSIEVA, S. *et al.* Defects in Cell Growth Regulation by C18:0-Ceramide and Longevity Assurance Gene 1 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **J Biol Chem**, 279(43):44311-44319, 2004.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, 11, n. 1, p. 9-22, 2010.

LEOPOLDINO, A. M.; SQUARIZE, C. H.; GARCIA, C. B.; ALMEIDA, L. O. *et al.* SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncology**, 48, n. 11, p. 1106-1113, 2012.

LI, C. C.; SHEN, Z.; BAVARIAN, R.; YANG, F. *et al.* Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. **Surg Oncol Clin N Am**, 29, n. 1, p. 127-144, 2020.

LI, M.; MAKKINJE, A.; DAMUNI, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. **J Biol Chem**, 271, n. 19, p. 11059-11062, 1996.

LIANG, J.; NAGAHASHI, M.; KIM, E. Y.; HARIKUMAR, K. B. *et al.* Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell**, 23, n. 1, p. 107-120, 2013.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, 327, n. 5961, p. 46-50, 2010.

MAPS, L. **LIPID MAPS Lipidomics Gateway**. 2020. Disponível em: <https://www.lipidmaps.org/data/structure/index.php>.

MENDELSON, K.; EVANS, T.; HLA, T. Sphingosine 1-phosphate signalling. **Development**, 141, n. 1, p. 5-9, 2014.

MIZUMURA, K.; JUSTICE, M. J.; SCHWEITZER, K. S.; KRISHNAN, S. *et al.* Sphingolipid regulation of lung epithelial cell mitophagy and necroptosis during cigarette smoke exposure. **FASEB J** . vol. 32, p. 4, 2018.

MUKHOPADHYAY, A.; SADDUGHI, S. A.; SONG, P.; SULTAN, I. *et al.* Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is

involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. **FASEB J**, 23, n. 3, p. 751-763, 2009.

MÜHLE, C.; WEINLAND, C.; GULBINS, E.; LENZ, B. *et al.* Peripheral Acid Sphingomyelinase Activity Is Associated with Biomarkers and Phenotypes of Alcohol Use and Dependence in Patients and Healthy Controls. *In: Int J Mol Sci*, v. 19, 2018.

NAGAHASHI, M.; RAMACHANDRAN, S.; KIM, E. Y.; ALLEGOOD, J. C. *et al.* Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. **Cancer Res**, 72, n. 3, p. 726-735, 1 2012.

NAGAHASHI, M.; TSUCHIDA, J.; MORO, K.; HASEGAWA, M. *et al.* High levels of sphingolipids in human breast cancer. **J Surg Res**, 204, n. 2, p. 435-444, 2016.

NEMA, R.; VISHWAKARMA, S.; AGARWAL, R.; PANDAY, R. K. *et al.* Emerging role of sphingosine-1-phosphate signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *In: Onco Targets Ther*, v. 9, p. 3269-3280, 2016.

OAKS, J.; OGRETMEN, B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. **Front Oncol**, 4, 2014.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nat Rev Cancer**, 18, n. 1, p. 33-50, 2018.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Cancer**, 4, n. 8, p. 604, 2004.

PATWARDHAN, G. A.; LIU, Y. Y. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. **Prog Lipid Res**, 50, n. 1, p. 104-114, 2011.

PONNAPAKKAM, T.; SAULSBERRY, T.; HILL, T.; ODOM-HILL, M. *et al.* Inhibition of Breast Tumor growth in Mice After Treatment with Ceramide Analog 315. **Anticancer Drugs**, 29, n. 9, p. 898-903, 2018.

PRALHADA RAO, R.; VAIDYANATHAN, N.; RENGASAMY, M.; OOMMEN, A. M. *et al.* Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. **J Lipids**, 2013.

PRALHADA RAO, R. V., N. RENGASAMY, M. MAMMEN OOMMEN, A. SOMAIYA, N. JAGANNATH, M. R. Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. **J Lipids**, 2013.

PROIA, R. L.; HLA, T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *In: J Clin Invest*, v. 125, p. 1379-1387, 2015.

PRUETT, S. T. Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols*. *In: J Lipid Res*, v. 49, p. 1621-1639, 2008.

PULKOSKI-GROSS, M. J.; DONALDSON, J. C.; OBEID, L. M. Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 50, n. 4, p. 298-313, 2015.

RAO, R. P.; ACHARYA, J. K. Sphingolipids and Membrane Biology as Determined from Genetic Models. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 85, n. 1-2, p. 1-16, 2008.

REICHEL, M.; HÖNIG, S.; LIEBISCH, G.; LÜTH, A. *et al.* Alterations of Plasma Glycerophospholipid and Sphingolipid Species in Male Alcohol-Dependent Patients. **Biochimica et biophysica acta**, 1851, n. 11, 2015.

RIBEIRO, I. P.; CAMELO, F.; ESTEVES, L.; MENOITA, J. *et al.* Genomic predictive model for recurrence and metastasis development in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Sci Rep**, 7: 13897, 2017.

RIVERA, I.-G.; ORDOÑEZ, M.; PRESA, N.; GANGOITI, P. *et al.* Ceramide 1-phosphate Regulates Cell Migration and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells. **Biochemical pharmacology**, 102, 2016.

ROH, J.-L.; KIM, E. H.; PARK, J. Y.; KIM, J. W. Inhibition of Glucosylceramide Synthase Sensitizes Head and Neck Cancer to Cisplatin. **Molecular cancer therapeutics**, 14, n. 8, 2015 2015.

SADDOUGHI, S. A.; SONG, P.; OGRETMEN, B. Roles of Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapeutics. **Subcell Biochem**, 49, p. 413-440, 2008.

SAHU, S. K.; HANNUN, Y. A.; YAO, N. Emergence of membrane sphingolipids as a potential therapeutic target. **Biochimie**, 158, p. 257-264, 2019.

SAITO, M.; COOPER, T. B.; VADASZ, C. Alterações induzidas pelo etanol no conteúdo de triglicerídeos, ceramides e glucosylceramides em neurônios cultivados. **Álcool Clin Exp Res**, 29(8):1374-83, 2005.

SCHIFFMANN, S.; SANDNER, J.; BIROD, K.; WOBST, I. *et al.* Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. **Carcinogenesis**, 30, n. 5, p. 745-752, 2009.

SCHIFFMANN, S.; SANDNER, J.; BIROD, K.; WOBST, I. *et al.* Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. **Carcinogenesis**, 30, n. 5, p. 745-752, 2020.

SEPAROVIC, D.; SHIELDS, A. F.; PHILIP, P. A.; BIELAWSKI, J. *et al.* Altered Levels of Serum Ceramide, Sphingosine and Sphingomyelin Are Associated with Colorectal Cancer: A Retrospective Pilot Study. **Anticancer Res**, 37, n. 3, p. 1213-1218, 2017.

SHANER, R. L.; ALLEGOOD, J. C.; PARK, H.; WANG, E. *et al.* Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. **J Lipid Res**, 50, n. 8, p. 1692-1707, 2009.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, 387, n. 6633, p. 569-572, 1997.

TAHMASEBI, E.; ALIKHANI, M.; YAZDANIAN, A.; YAZDANIAN, M. *et al.* The current markers of cancer stem cell in oral cancers. **Life Sci**, 249, p. 117483, 2020.

TAKABE, K.; SPIEGEL, S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *In: J Lipid Res.* v. 55, p. 1839-1846, 2014.

TAMASHIRO, P. M.; FURUYA, H.; SHIMIZU, Y.; IINO, K. *et al.* The impact of sphingosine kinase-1 in head and neck cancer. **Biomolecules**, 3, n. 3, p. 481-513, 2013.

TAYLOR, O. J.; THATCHER, M. O.; CARR, S. T.; GIBBS, J. L. *et al.* High-Mobility Group Box 1 Disrupts Metabolic Function with Cigarette Smoke Exposure in a Ceramide-Dependent Manner. **Int J Mol Sci.**, 18(5), 2017.

TSUCHIDA, J.; NAGAHASHI, M.; NAKAJIMA, M.; MORO, K. *et al.* Breast cancer S1P is associated with pSphK1 and lymphatic metastasis. **J Surg Res**, 205, n. 1, p. 85-94, 2016.

VAN MONSJOU, H.; WREESMANN, V.; VAN DEN BREKEL, M.; BALM, A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Young Patients. **Oral oncology**, 49, n. 2013.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- κ B, an active player in human cancers. **Cancer Immunol Res.**, 2(9):823-830, 2014.

YILMAZ, T.; HOSAL, A.; GEDIKOĞLU, G.; ONERCI, M. *et al.* Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. **American journal of otolaryngology**, 19, n. 2, 1998.

YOSHIKAWA, Y.; YOSHIKAWA, T.; DOMAE, E.; HIRAI, Y. *et al.* Knockdown of Sphingomyelin Synthase 2 Inhibits Osteoclastogenesis by Decreasing RANKL Expression in Mouse Primary Osteoblasts. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, 40, n. 5, 2019.

ZHANG, H.; DESAI, N. N.; OLIVERA, A.; SEKI, T. *et al.* Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. **J Cell Biol**, 114, n. 1, p. 155-167, 1991.

ZHOU, K.; BLOM, T. Trafficking and Functions of Bioactive Sphingolipids: Lessons from Cells and Model Membranes. *In: Lipid Insights.* v. 8, p. 11-20, 2015.

Anexo A - Parecer de aprovação CEP do projeto temático: SET e esfingolipídeos em câncer de cabeça e pescoço: sinalização, alvos e terapia antitumoral.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: SET e esfingolipídeos em câncer de cabeça e pescoço: sinalização, alvos e terapia antitumoral.

Pesquisador: Andreia Machado Leopoldino

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 90532418.6.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.416.563

Apresentação do Projeto:

Trata-se de apreciação à resposta de pendências no parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Idem parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou os seguintes documentos:

(1) PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1228290_E1

(2) resposta_parecer_V5

(3) TCLEv3

(4) formulario_SAME_HC_FMRP

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Versão número 6 do referido protocolo em resposta às pendências apontadas no parecer emitido em 15/04/19 (Considerado pendente "ad referendum"), onde foram apontadas as seguintes

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fotp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.416.563

pendências:

(1) Considerações sobre o TCLE:

Remover a seguinte sentença: "Confirmando também que entreguei uma via deste documento para o participante e manterei uma via sob a responsabilidade do pesquisador responsável".

Esta informação já está contida na sentença final do TCLE (Você assinará este documento em duas vias sendo que uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável).

(2) Considerações sobre o Formulário SAME - Serviço de Arquivos Médicos do HC/FMRP:

Apresentar novo Formulário SAME com a assinatura e carimbo do orientador/pesquisador responsável e assinatura e carimbo do Docente FMRP da Área Específica.

Em resposta, a pesquisadora informou que as modificações solicitadas foram realizadas na nova versão do TCLE (TCLEv3) e também anexaram novo formulário do SAME do HC-FMRP/USP assinado pela Profa. Andreia Leopoldino (como pesquisadora responsável pelo estudo) e pelo Prof. Hilton Marcos Alves Ricz (Chefe da Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMRP). O período de autorização para pesquisa nos prontuários foi estabelecido de 05/05/2019 a 30/06/2023.

Na emenda, não há qualquer alteração da metodologia científica aprovada pelo CEP nas avaliações prévias, onde o projeto propõe estabelecer o papel dos esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço (CCP), com ênfase em carcinoma epidermóide, bem como investigar o papel da proteína SET no processo de sinalização dos esfingolipídios. Os ensaios envolvendo a participação de indivíduos utilizarão amostras de soro de participantes com câncer e fragmentos de tumor e da margem cirúrgica obtidas de biobancos. As amostras biológicas serão submetidas aos testes de espectrometria de massas para a caracterização do perfil dos esfingolipídios. Nos tumores também serão analisadas, por meio de imuno-histoquímica, as proteínas SphK1 e SphK2, e por PCR em tempo real, os níveis de RNAm para os respectivos genes incluindo S1P liase. Também serão utilizados os dados clínico-patológicos presentes nos prontuários dos participantes das quais as amostras serão advindas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em 26/06/2019. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.416.563

alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_122829_9_E1.pdf	17/04/2019 15:49:55		Aceito
Outros	resposta_parecer_v5.pdf	17/04/2019 15:47:16	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv3.pdf	17/04/2019 15:46:30	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Outros	formulario_SAME_HC_FMRP.pdf	17/04/2019 15:46:11	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termocompromissoV4.pdf	04/04/2019 13:20:46	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Outros	resposta_parecerV4.pdf	04/04/2019 13:20:08	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Outros	oficio_emenda_CEP1.pdf	05/02/2019 17:00:01	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	05/02/2019 16:48:45	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HC_1.pdf	05/02/2019 16:48:21	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_HC.pdf	01/02/2019 11:56:45	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Outros	Parecer_PI.pdf	12/12/2018 11:44:03	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Outros	Lipidomics_analysis_VCU_Andreia.	11/12/2018	Andreia Machado	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fctfp.usp.br

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-**

Continuação do Parecer: 3.416.563

Outros	pdf	14:56:35	Leopoldino	Aceito
Outros	resposta_parecer_CEP.pdf	22/06/2018 16:52:51	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_versao_1.pdf	15/05/2018 12:21:39	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisador_versao_1.pdf	15/05/2018 12:15:50	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco_IMT_Paulo_Assinado_versao_1.pdf	15/05/2018 12:15:30	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco_ICESP_Roger_assinado_versao_1.pdf	15/05/2018 12:15:14	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_versao_1.pdf	15/05/2018 12:13:17	Andreia Machado Leopoldino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Junho de 2019

Assinado por:
Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fctfp.usp.br

Anexo B – Parecer de aprovação CEP do projeto de mestrado: Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Perfil de esfingolipídios no câncer de cabeça e pescoço.

Pesquisador: Andreia Machado Leopoldino

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 90532318.1.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.416.670

Apresentação do Projeto:

O projeto pretende avaliar o potencial impacto dos níveis de esfingolipídios no câncer. Para isso, os pesquisadores pretendem determinar o perfil dos diferentes esfingolipídios em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço para avaliar possíveis associações com parâmetros clínicos e patológicos. Serão utilizadas amostras de plasma, sangue e saliva bem como de fragmentos de tumores e margens cirúrgicas dos pacientes com CCP para extração dos esfingolipídios.

Nesta versão será analisada emenda ao protocolo já aprovado, conforme justificativa apresentada pela pesquisadora.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente trabalho é determinar o perfil dos esfingolipídios em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço para avaliar potenciais associações com parâmetros clínicos e patológicos. Espera-se que ao final deste estudo, seja possível estabelecer uma relação entre os níveis de esfingolipídios em tecidos tumorais versus saudáveis para um melhor entendimento da função dessas moléculas nos aspectos clínicos e patológicos das neoplasias selecionadas no estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Avenida do Café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-903
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.416.670

Não existem riscos associados a pesquisa porque serão utilizadas amostras de biobancos.

Benefícios:

Os resultados obtidos apartir do estudo proposto poderá identificar esfingolipídios associados com parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço que auxiliaram no prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma solicitação de emenda, justificada pela necessidade de inclusão de outro centro colaborador para obtenção de amostras de doadores no projeto de pesquisa.

No presente estudo serão incluídos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (n=100). O protocolo será submetido a análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da FCFRP-USP. Todas as amostras que serão utilizadas fazem parte do BioBanco USP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) cujo responsável é o Dr Roger Chammas, USP-SP e do Hospital de Clinicas de Ribeirão Preto – USP cujo o responsável é o Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas, que serão colaboradores neste estudo. As amostras de indivíduos saudáveis (n=50) serão fornecidas pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP e do EERP-USP, cujo responsável é o Prof. Dr. Riccardo Lacchini.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram os seguintes documentos:

- Carta de justificativa para a emenda com solicitação de dispensa de TCLE no novo centro coparticipante;
- nova versão do projeto de pesquisa;
- Autorização para utilização de amostras guardadas em biorrepositório no novo centro coparticipante;
- Parecer projeto I (Parecer CEP da EERP-USP sobre projeto de CAAE nº 51408515.9.0000.5393)
- TCLE projeto I (TCLE do referido projeto que prevê coleta e armazenamento de material)
- Parecer projeto II (Parecer CEP da EERP-USP sobre projeto CAAE nº 33001414.1.0000.5393)
- TCLE projeto II (TCLE do referido projeto que prevê coleta e armazenamento de material).

Recomendações:

Nada consta.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.416.670

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A documentação apresentada está de acordo com as normas éticas vigentes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 186ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1307951_E2.pdf	19/03/2019 18:45:55		Aceito
Outros	Emenda.pdf	19/03/2019 18:41:33	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Raquel_fev2019_CEP.pdf	01/03/2019 14:09:20	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	TCLE_projeto_II.pdf	01/03/2019 11:16:36	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	TCLE_projeto_I.pdf	01/03/2019 11:16:20	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	Parecer_projeto_II.pdf	01/03/2019 11:15:45	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	Parecer_projeto_I.pdf	01/03/2019 11:14:30	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_biorrepositorio.pdf	01/03/2019 11:13:57	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	Parecer_PI_ICESP.pdf	28/11/2018 16:33:15	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_versao_1.pdf	23/05/2018 11:11:15	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisador_versao_1.pdf	23/05/2018 11:10:54	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_versao_1.pdf	23/05/2018 11:09:52	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Outros	Patologia_Evandro_versao_1.pdf	18/05/2018 11:38:44	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Declaração de Manuseio Material	Biobanco_IMT_Paulo_versao_1.pdf	18/05/2018 11:37:47	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-**

Continuação do Parecer: 3.416.670

Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco_IMT_Paulo_versao_1.pdf	18/05/2018 11:37:47	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco_ICESP_Roger_versao_1.pdf	18/05/2018 11:37:38	RAQUEL ROMAN FAEDO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Junho de 2019

Assinado por:

**Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador(a))**

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br