



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 esfingolípídios 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 Briadori 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 Peoporine 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	31
Figura 4. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados aos fatores de risco, tabagismo e etilismo.....	34
Figura 5. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a classificação clínica do tumor (cT) e tamanho do tumor (cm)	35
Figura 6. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a estadiamento	36
Figura 7. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a invasão perineural e metástase.....	37
Figura 8 Mapa de calor mostra os níveis dos esfingolipídios de plasmas controle e paciente CECP	38
Figura 9: Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de indivíduos controle e pacientes com CECP	39
Figura 10: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao tabagismo.....	40
Figura 11: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao etilismo	41
Figura 12: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados linfonodo positivo (pN+), invasão perineural, recorrência locorregional e metástase	43
Figura 13: Concentração dos esfingolipídios (nM) com níveis alterados entre tecido tumoral e margem cirúrgica de pacientes com CECP	44
Figura 14: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes com CECP	45
Figura 15: Taxa de risco (HR) para esfingolipídios em CECP (plasma e tumor)	46
Figura 16: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolipídios nos plasmas dos pacientes com CECP	47
Figura 17:Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolipídios nos tecidos tumorais dos pacientes com CECP	47

Figura 18: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global considerando os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes com CECP	48
Figura 19: Curva ROC referente aos esfingolipídios dos plasmas dos pacientes com CECP.	49
Figura 20: Curva ROC referente as combinações dos esfingolipídios dos plasmas dos pacientes com CECP.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográfica e clinico- patológicas dos grupos caso e controle.	33
---	----

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	26
3.1. Delineamento experimental	26
3.2. Casuística e amostras biológicas	26
3.3. Preparação das linhagens celulares para extração de esfingolipídios	27
3.4. Identificação e quantificação de esfingolipídios a partir de amostras biológicas por espectrometria de massas.....	28
3.5. Análises estatísticas	29
4. Resultados e Discussão	30
4.1. Perfil de esfingolipídios nas linhagens de NOK-SI com aumento da proteína SET selvagem e SET com mutação	30
4.2. Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CECP e indivíduos controle no estudo	32
4.3. Associação entre os níveis de esfingolipídios do plasma com características clínico-patológicas de pacientes com CECP	33
4.4. Comparação entre o perfil de esfingolipídios do plasma de pacientes CECP e plasma do grupo controle	37
4.5. Associação dos níveis de esfingolipídios com características clínico-patológicas do tecido de pacientes com CECP	39
4.6. Análise comparativa do perfil esfingolipídico do tecido tumoral e da margem cirúrgica de pacientes com CECP	43

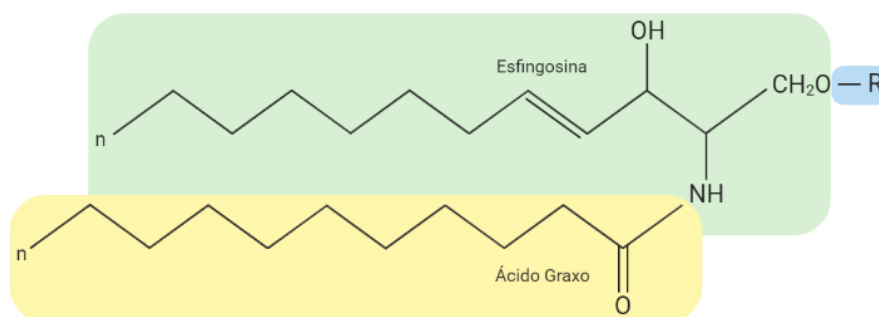
4.7. Esfingolípídios plasmáticos e no tumor podem ser indicadores de prognóstico em pacientes com CECP	44
4.8. Avaliação do potencial diagnóstico dos esfingolípídios no plasma	49
5. Conclusões.....	51
Referências	52
Anexo A - Parecer de aprovação CEP do projeto temático: SET e esfingolípídeos em câncer de cabeça e pescoço: sinalização, alvos e terapia antitumoral.	59
Anexo B – Parecer de aprovação CEP do projeto de mestrado: Perfil de esfingolípídios no câncer de cabeça e pescoço.....	63

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.



Substituinte (R)	Esfingolipídio
H	Ceramida
Fosfocolina	Esfingomielina
Açúcar	Glicosfingolipídio

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).

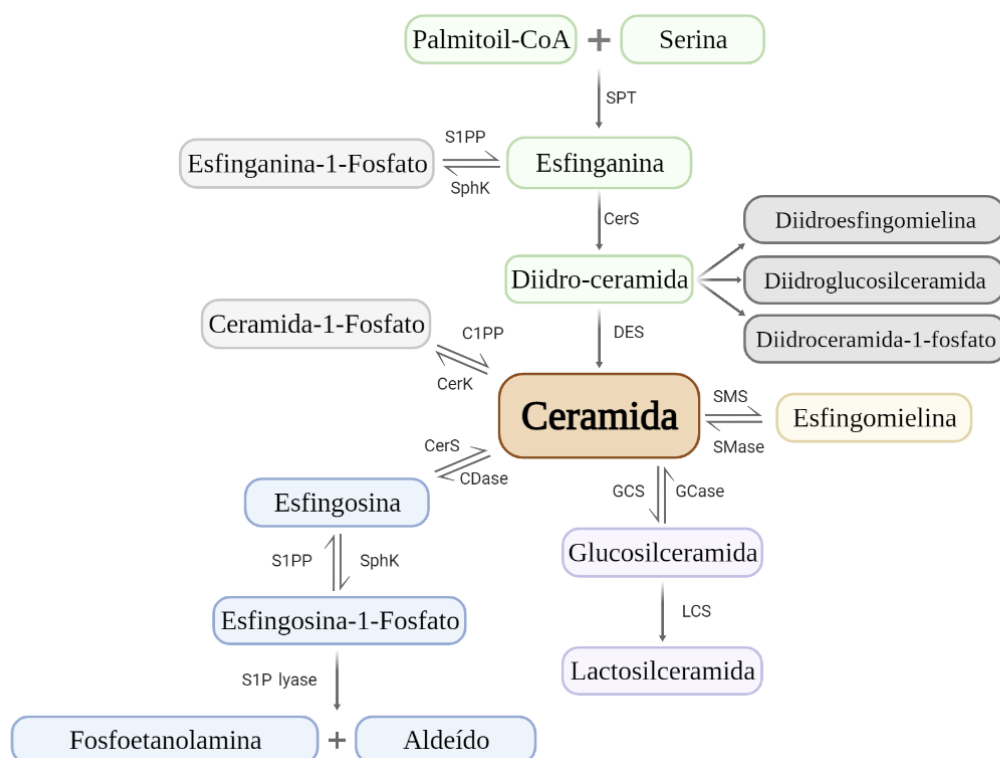


Figura 2. Metabolismo dos esfingolípídios. A via de novo (verde) sintetiza ceramida através da serina palmitoiltransferase (SPT), (diidro) ceramida sintase (CerS) e diidroceramida desaturase (DES). A via de salvação (roxo) gera ceramida pela hidrólise de glicosilceramidas. A ceramida também pode ser 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 (SADDOUGHI; SONG; OGRETMEN, 2008). Esta molécula é um importante precursor metabólico e estrutural de esfingolipídios complexos, como a esfingomiéline e a esfingosina-1-fosfato (SADDOUGHI; SONG; OGRETMEN, 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; OGRETMEN, 2008).

A localização subcelular da ceramida é um fator que influencia na sua função biológica (SAHU; HANNUN; YAO, 2019). Moléculas de ceramida compartmentalizadas na membrana celular influenciam vias de morte celular e inibição de crescimento (SADDOUGHI; SONG; OGRETMEN, 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; OGRETMEN, 2008). Desta forma, a quantidade de ceramidas presente na mitocôndria pode levar a célula à morte pela via intrínseca da apoptose (SADDOUGHI; SONG; OGRETMEN, 2008). Em organelas como os lisossomos, a ceramida pode levar a ativação induzida por clivagem de BID (SADDOUGHI; SONG; OGRETMEN, 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; OGRETMEN, 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; OGRETMEN, 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; OGRETMEN, 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; SADDOUGHI; 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).

3. Materiais e Métodos

3.1. Delineamento experimental

Amostras de plasma e fragmentos pareados do tumor e da margem cirúrgica de pacientes com CECP, e plasma de indivíduos controle foram utilizados nesse estudo para obter o perfil de esfingolipídios. A quantificação dos esfingolipídios presente nas amostras biológicas foi realizada por cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-ESI-MS / MS). A partir dos dados obtidos foram analisadas potenciais associações de esfingolipídios com parâmetros clínicos e patológicos da doença estudada. Para o estudo da potencial relação dos esfingolipídios e da proteína SET, que está aumentada em CECP (LEOPOLDINO; SQUARIZE; GARCIA; ALMEIDA *et al.*, 2012), foram utilizadas linhagens celulares sem e com a superexpressão da proteína SET selvagem e a SET mutada.

3.2. Casuística e amostras biológicas

No presente estudo foram incluídos: pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e indivíduos controle que não apresentavam nenhum tipo de câncer (grupo controle). O projeto de mestrado e o projeto temático foram submetidos para análise e aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa em humanos da FCFRP-USP, e pelas Instituições parceiras ICESP-FM-USP e EERP (CAAE: 90532318.1.0000.5403 e 90532418.6.0000.5403).

O primeiro grupo de amostras biológicas do estudo foi obtido por meio de colaboração com os médicos Dr. Leandro Luongo de Matos, Dr. Marco Kulcsar e Dr. Luiz Paulo Kowalski, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina de São Paulo, USP. As amostras de plasma (n=56), fragmentos de tumores (n=42) e margens cirúrgicas (n=42) pareadas estavam armazenadas no BioBanco do ICESP/FM-USP, credenciado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), cujo responsável é o Prof. Dr. Roger Chammas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP-SP).

O segundo grupo de amostras de plasma de indivíduos controle (n=58) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Ricardo Lacchini da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP (EERP-USP), cujas amostras estavam armazenadas em Biorrepositório no seu laboratório no Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas, EERP-USP, sob sua responsabilidade.

Os esfingolipídios foram extraídos de amostras de plasma (80 µL), fragmentos congelados de tumores e de margem cirúrgica (aproximadamente 10 mg) para determinar o perfil de esfingolipídios por espectrometria de massas. Foram também incluídas amostras de plasma (80 µL) de indivíduos controle cujo critérios de inclusão foram maiores de 18 anos, não oncológico e sem diagnóstico de doença (controle, n= 58) para compararmos com os pacientes. Os critérios de inclusão dos pacientes foram: diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e disponibilidade de amostras para as análises propostas no projeto. Critérios de exclusão para ambos os grupos controle e pacientes: menores de 18 anos e portadores de HIV. Os parâmetros clínicos e patológicos dos pacientes (tipo de neoplasia, grau de diferenciação, tamanho do tumor, metástase, infiltrado inflamatório, invasão perineural, linfonodo comprometido, entre outros) foram obtidos dos prontuários e analisados para identificar potenciais associações com os esfingolipídios analisados. A estimativa do número de indivíduos para o estudo foi realizada com base em outros trabalhos publicados na literatura. Todo o trabalho foi conduzido de acordo com as normas e conduta ética em pesquisa com humanos, tal como o sigilo e respeito com relação aos pacientes e indivíduos do grupo controle.

3.3. Preparação das linhagens celulares para extração de esfingolipídios

As linhagens NOK-SI (queratinócito oral não tumoral imortalizado) com superexpressão da proteína SET WT (selvagem) e SET com mutação em Ser9 foram obtidas e selecionadas conforme protocolo já estabelecido no laboratório. As células com superexpressão da proteína SET WT foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (Sigma - Aldrich, St Louis, MO, EUA), suplementado ou não com piruvato na concentração de 1 mM (Pir), a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Ao final, o meio foi retirado e armazenado, sendo que 80 µl foram utilizados para extração de esfingolipídios. Um total de 1x10⁶ células foram coletadas, lavadas com PBS 1x e submetidas a extração de esfingolipídios.

3.4. Identificação e quantificação de esfingolipídios a partir de amostras biológicas por espectrometria de massas

As amostras biológicas foram armazenadas em freezer -80C° em biorrepositório sob responsabilidade da Profa. Andréia M. Leopoldino, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Os esfingolipídios foram extraídos e analisados por espectrometria de massas (MS) para obtenção do perfil de esfingolipídios nas diferentes amostras biológicas (plasma, células, tecidos tumorais e margens cirúrgicas). O protocolo utilizado foi o descrito por Shaner et al. (SHANER; ALLEGOOD; PARK; WANG *et al.*, 2009).

Em todas as análises por LC-ESI-MS/MS, incluímos uma curva de calibração, que foi uma mistura de esfingolipídios comercial (Avanti Lipid) nas concentrações 1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM e 1 nM. Após a etapa de extração, as amostras foram ressuspensas na fase móvel e analisadas por LC-ESI-MS/MS, conforme descrito por Shaner et al. O MIX de esfingolipídios comercial (Avanti Lipid) é composto por 25 µM de cada lipídio: Esfingosina (C17 base); Esfinganina (C17 base); Esfingosina-1-fosfato (C17 base); Esfinganina-1-fosfato (C17 base); Lactosil(β) C12 Ceramida; C12:0 Esfingomielina; Glucosil(β) C12 Ceramida; C12:0 Ceramida; C12:0 Ceramida-1-fosfato.

A análise dos esfingolipídios por MS foi realizada em colaboração com o Prof. Noberto Peporine Lopes e o pós doutorando Rodrigo Moreira, na Facility de Espectrometria de Massas da FCFRP-USP. Um total de 28 esfingolipídios foram analisados no presente projeto: esfingosina (d18:1 So), esfinganina (d18:0 Sa), esfingosina-1-fosfato (d18:1 So1P), esfinganina-1-fosfato (d18:0 Sa1P), C16:0 ceramida-1-fosfato (C16:0 Cer1P), C24:0 ceramida-1-fosfato (C24:0 Cer1P), C16:0 ceramida (C16:0 Cer), C18:0 ceramida (C18:0 Cer), C24:1 ceramida (C24:1 Cer), C24:0 ceramida (C24:0 Cer), C25:0 ceramida (C25:0 Cer), C16:0 diidroceramida (C16:0 DHCer), C18:0 diidroceramida (C18:0 DHCer), C24:1 diidroceramida (C24:1 DHCer), C24:0 diidroceramida (C24:0 DHCer), C16:0 glucosilceramida (C16:0 GlcCer), C18:0 glucosilceramida (C18:0 GlcCer), C24:1 glucosilceramida (C24:1 GlcCer), C16:0 diidroglicosilceramida (C16:0 DHGlcCer), C18:0 diidroglicosilceramida (C18:0 DHGlcCer), C24:0 diidroglicosilceramida (C24:0 DHGlcCer), C24:0 diidroceramida-1-fosfato (C24:0 DHCer1P), C16:0 lactosilceramida (C16:0 LacCer), C24:0 lactosilceramida (C24:0 LacCer), C18:0 esfingomielina (C18:0 SM), C24:0 esfingomielina (C24:0 SM), C18:0 diidroesfingomielina (C18:0 DHSM) e C24:0 diidroesfingomielina (C24:0 DHSM).

3.5. Análises estatísticas

As diferenças estatísticas entre as médias dos grupos foram testadas por ANOVA de uma via, para todos os lipídios, seguida pela correção do teste múltiplo de Benjamini-Hochberg. A análise post-hoc foi realizada pelo teste de Tukey. O agrupamento hierárquico (para amostras e metabólitos) foi realizado utilizando a medida de dissimilaridade de Canberra e o método de agrupamento de Ward. A Análise de Coordenadas Principais foi criada usando distâncias euclidianas. Modelos de Regressão de Riscos Proporcionais de Cox univariados e multivariados foram adotados neste estudo para avaliar a correlação do tempo de sobrevivência global e do intervalo livre de doença com uma ou mais covariáveis. Modelos de regressão de Cox foram implementados usando o pacote de análise Survival (v3.2-3) disponível em R (R é ambiente de software livre para computação estatística e gráfica). As curvas de sobrevivência global e livre de doença foram desenhadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas aplicando o teste de Log-rank. O pacote de análise Survminer (v0.4.7) disponível em R foi utilizado para traçar as curvas de Kaplan-Meier. O pacote de análise pROC (v1.16.2) disponível em R foi usado para realizar a análise de Curva de Característica de Operação do Receptor (ROC) e para calcular a área sob a curva (AUC). Todas essas análises foram conduzidas utilizando RStudio (v1.3.959). Nas análises dos dados dos pacientes, contamos com a colaboração do jovem pesquisador Dr. Ricardo Roberto da Silva, FCFRP-USP, e do pós doutorando Dr. Gabriel da Silva, do nosso grupo de pesquisa na FCFRP-USP.

4. Resultados e Discussão

4.1. Perfil de esfingolipídios nas linhagens de NOK-SI com aumento da proteína SET selvagem e SET com mutação

Ao analisar os perfis obtidos por espectrometria de massa, observou-se que há diferença entre o perfil obtido nas linhagens NOK-SI e nos meios de cultura das respectivas células (figura 3). Os perfis dos meios de cultura foram agrupados em dois grupos, meio da célula NOK Plenti Ø (vetor vazio; controle) juntamente com a NOK/SET-Ser9 e a NOK/SET na condição com Piruvato. Sendo que os esfingolipídios com as maiores concentrações foram d18:0 Sa1P, seguida da C18:0 SM em todos os meios analisados. Já nas linhagens, o agrupamento não ocorreu da mesma maneira. Três grupos foram formados, o primeiro grupo incluiu a linhagem NOK plenti Ø e a NOK/SET, o segundo das células em piruvato, e um terceiro NOK/SET-Ser9. A linhagem SET comparada ao controle NOK plenti Ø apresentou níveis mais elevados de C24:0 DHCer, d18:1 So e d18:1 So1P. Estudos prévios já mostraram que tanto a ceramida quanto o FTY720 (um análogo da esfingosina) podem inibir a proteína SET e reativar a via PP2A (OAKS; OGRET MEN, 2014). Enquanto, o aumento de esfingosina-1-fostato tem sido associada a diversos mecanismos importantes no câncer, tais como migração, proliferação e estresse oxidativo (APOSTOLOPOULOU; GORDILLO; KOLIAKI; GANCHEVA *et al.*, 2018). O balanço entre S1P e ceramida tem impacto direto na sobrevivência celular, o que sugere a SET não somente uma molécula alvo da ceramida, mas como um potencial regulador desse balanço na célula.

No perfil da NOK-SET Piruvato encontramos menores concentrações da maioria das ceramidas, C16:0 LacCer e d18:1 So1P. Esses esfingolipídios foram associados ao estresse oxidativo, por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, inibir a cadeia respiratória e sensibilizar a permeabilidade mitocondrial (APOSTOLOPOULOU; GORDILLO; KOLIAKI; GANCHEVA *et al.*, 2018). Portanto, a redução dessas moléculas pode estar sendo favorecida pela condição anti-oxidante em que a linhagem foi cultivada, reforçando um *cross-talking* entre estresse oxidativo e esfingolipídios (ABRAHAN; MIRANDA; AGNOLAZZA; POLITI *et al.*, 2010; ANDRIEU-ABADIE; GOUAZÉ; SALVAYRE; LEVADE, 2001).

A linhagem NOK/SET-Ser9 apresentou a maioria dos esfingolipídios reduzidos e tem um perfil completamente diferente das demais linhagens. Os dados indicam que as modificações na linhagem NOK-SI foram capazes de alterar o metabolismo dos

esfingolípídios, e que a proteína SET tem importante papel no metabolismo dos esfingolípídios. Serão necessários mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais a SET pode afetar o metabolismo e a sinalização celular dos esfingolípídios, conseqüentemente, qual o papel desses em CECP.

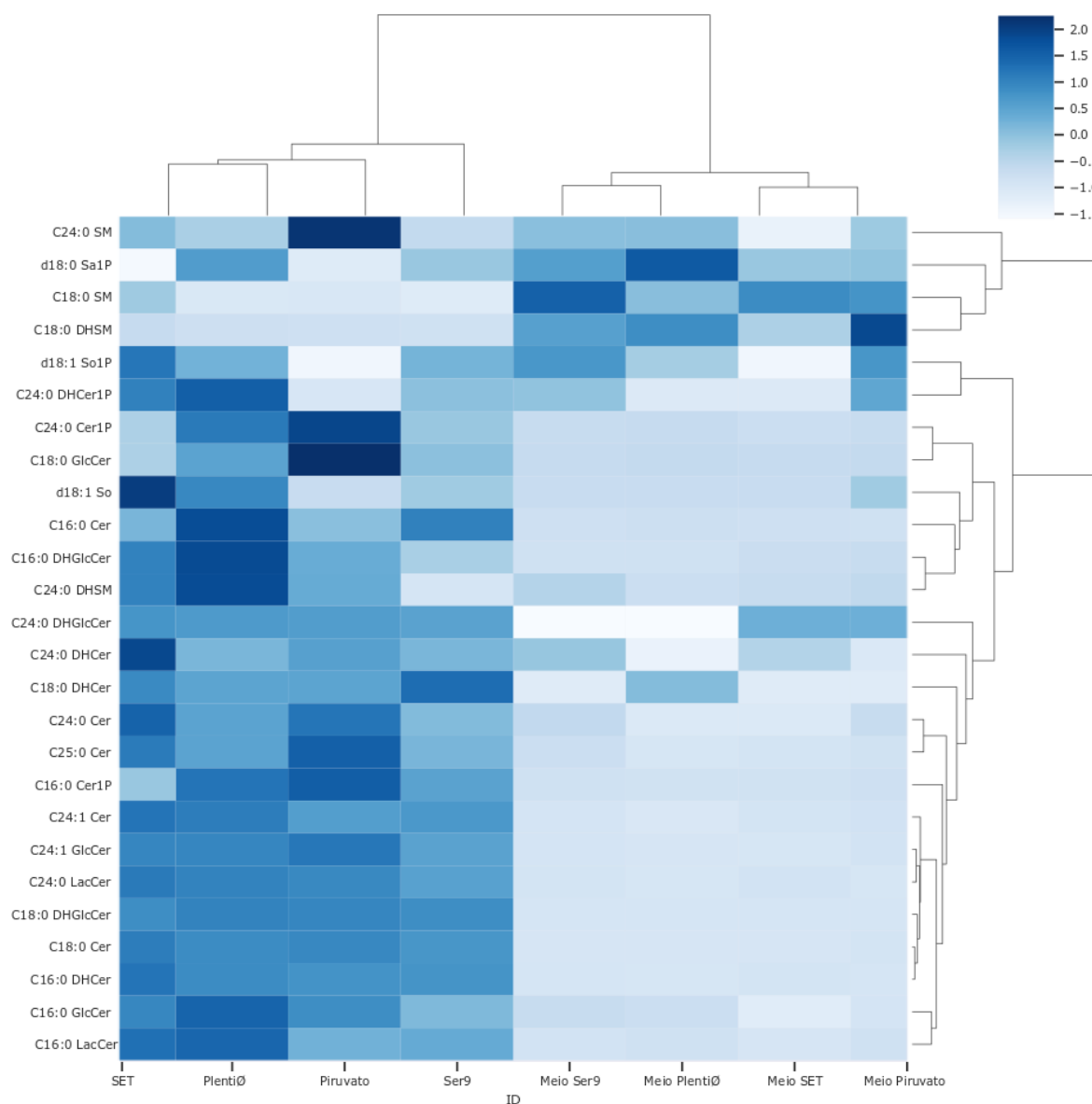


Figura 3 Mapa de calor mostra os níveis dos esfingolípídios das linhagens celulares. As colunas representam as amostras NOK-SI com o vetor vazio (Plenti Ø), superexpressão da proteína SET WT (SET), SET com mutação Ser9 (Ser9) e superexpressão da proteína SET WT com meio suplementado com piruvato (Piruvato), e os meios onde foram cultivadas as mesmas linhagens, enquanto as linhas representam as espécies esfingolípídicas.

4.2. Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CECP e indivíduos controle no estudo

No presente estudo foram utilizados dados pareados de caso-controle, tendo como amostras biológicas: plasma e tecido. Um total de 56 amostras de plasma caso, 58 plasma controle e 84 amostras de tecido, sendo pareados 42 fragmentos do tumor e 42 margens cirúrgica do mesmo indivíduo foram analisadas. As características clínico-patológicas, assim como demográficas estão apresentadas na tabela 1. A média de idade dos pacientes encontra-se próximo a 60 anos, a maioria é do gênero masculino, tabagistas e/ou etilistas. Nas características patológicas, a maioria dos tumores (74%) encontra-se no estadiamento IV. O sítio primário mais acometido é a língua com 50% dos pacientes, e a outra metade incluiu soalho, gengiva, mucosa jugal, área retromolar e palato mole. O perfil encontrado é característico deste tipo de carcinoma, visto que a maioria dos pacientes é masculino de idade avançada tabagistas e/ou etilistas, que são fatores de risco bem descrito (VAN MONSJOU; WREESMANN; VAN DEN BREKEL; BALM, 2013). O perfil do controle apresenta uma idade média de 52 anos, são do sexo masculino, a maioria não é tabagista (59%) e 67% consome álcool, o que representa o comportamento atual da população. Neste grupo de indivíduos buscou-se perfis semelhantes ao grupo caso, reduzindo os vieses dos resultados associados as características dos indivíduos, resultando em uma análise experimental mais robusta.

Tabela 1. Características demográfica e clínico- patológicas dos grupos caso e controle.

Características	Tecido CECP			Plasma CECP			Plasma Controle		
	N	%	Média	N	%	Média	N	%	Média
Número de amostras	42			56			58		
Idade									
<50	11	26	59,79	13	23	59,55	24	41	51,86
≥50	31	74		43	77		34	59	
Gênero									
Masculino	34	81		44	79		58	100	
Feminino	8	19		12	21		0	0	
Tabagista									
Sim	35	83		47	84		24	41	
Não	7	17		9	16		34	59	
Etilista									
Sim	32	76		42	75		39	67	
Não	10	24		14	25		19	33	
Estádio									
I	1	2		1	2				
II	4	10		5	9				
III	6	14		9	16				
IV	31	74		41	73				
pN									
Positivo	22	52		32	57				
Negativo	20	48		24	43				
Metástase									
Sim	5	12		6	11				
Não	37	88		49	88				
Invasão Perineural									
Positivo	32	76		39	70				
Negativo	10	24		17	30				
Sítio Primário									
Mucosa Bucal	3	7		5	9				
Soalho da Boca	9	21		16	29				
Gengiva	6	14		6	11				
Área retromolar	2	5		2	4				
Palato Mole	1	2		1	2				
Língua	21	50		26	46				

4.3. Associação entre os níveis de esfingolipídios do plasma com características clínico-patológicas de pacientes com CECP

O perfil dos esfingolipídios das amostras de plasma de pacientes com CECP, obtidos por espectrometria de massa, foram comparadas com os dados clínico-patológicos. Essa abordagem teve como propósito entender as associações entre os parâmetros selecionados e o perfil dos vinte e oito diferentes esfingolipídios analisados. No plasma foram encontrados oito diferentes esfingolipídios, pertencentes as classes das Cer, DHCer, LacCer, SM e DHSM. Os fatores de risco, tabagismo e etilismo, foram associados a menores concentrações de C18:0 SM (figura 4). Essa redução já havia sido mostrada em um estudo que comparou o plasma de indivíduos fumantes e não fumantes (IONESCU; DE FREITAS; BUENO, 2013). Além disso a redução da enzima esfingomielina sintetase, responsável para transformação de ceramida em

esfingomielina, foi relatado em estudos *in vivo* quando compararam a exposição ou não a fumaça (GUPTA; BAUMLIN; POON; AHMED *et al.*, 2020). Há evidências que o abuso crônico de álcool está associado a menores níveis de SM e ao aumento da enzima esfingomielinase, responsável pela hidrólise da esfingomielina (MÜHLE; WEINLAND; GULBINS; LENZ *et al.*, 2018; REICHEL; HÖNIG; LIEBISCH; LÜTH *et al.*, 2015).

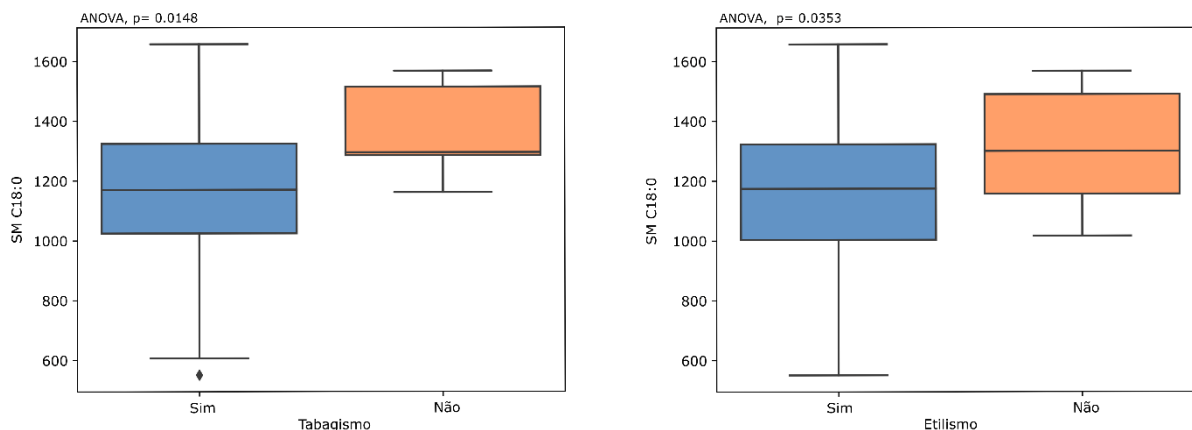


Figura 4. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados aos fatores de risco, tabagismo e etilismo. Os níveis de C18:0 esfingomielina (C18:0 SM) no plasma foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Na análise dos esfingolipídios em relação aos parâmetros referentes a classificação do tumor (cT) e o tamanho (cm), identificamos duas moléculas com menores concentrações quando havia um pior prognóstico, ou seja, tumores maiores (cT 3-4 e tamanho de tumor >4 cm) (figura 5). Ceramida de cadeia longa, como a encontrada alterada no nosso trabalho, foi descrita como importante fator para regular senescência e induzir apoptose em células-tronco mesenquimais primárias da medula óssea (KHAYRULLIN; KRISHNAN; MARTINEZ-NATER; MENDHE *et al.*, 2019). Além disso, existem evidências que análogos de ceramida podem reduzir significativamente o volume e peso em xenoenxerto de câncer de mama (PONNAPAKKAM; SAULSBERRY; HILL; ODOM-HILL *et al.*, 2018). Alguns estudos mostraram que a DHCer também pode apresentar um papel antitumoral, assim como a Cer. Um estudo com células T demonstrou que C24:0 DHCer apresentava citotoxicidade neste tipo celular (HOLLIDAY JR; COX; KANG; MAURER, 2013). A inibição da enzima Des, responsável pela transformação de DHCer em Cer, demonstrou-se em vários estudos como responsável por desencadear a apoptose e necrose. Além de inibir crescimento por parada de ciclo celular em G0/G1 em linhagens de neuroblastoma (FABRIAS; MUÑOZ-OLAYA ; CINGOLANI; SIGNORELLI *et al.*, 2012). Aparentemente, esses esfingolipídios exercem um papel antitumoral, portanto a

diminuição das suas concentrações pode estar favorecendo o crescimento e progressão do tumor CECP.

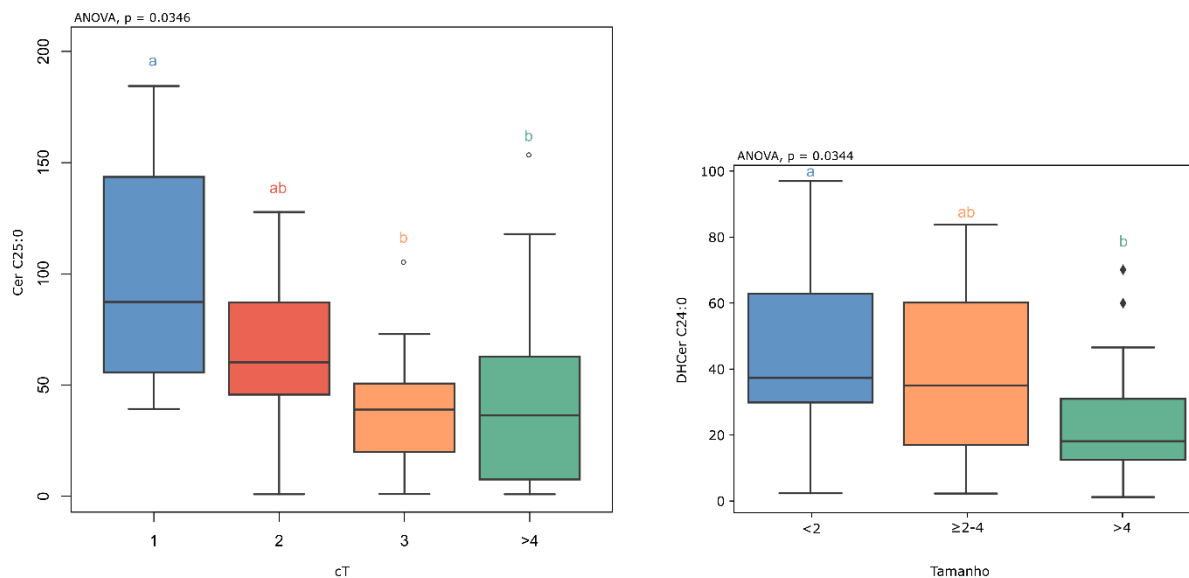


Figura 5. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a classificação clínica do tumor (cT) e tamanho do tumor (cm). Os níveis de C25:0 ceramida (C25:0 Cer) e C24:0 diidrocermida (C24:0 DHCer) no plasma foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as categorias.

Concentrações menores de C18:0 SM e C24:0 SM tiveram associação com estadiamento, nossos dados mostram que há uma redução de ambas esfingomielinas no estágio grau III (figura 6). Na literatura, encontramos evidência que em câncer colorretal a redução da C24:0 SM está associada ao estágio IV (SEPAROVIC; SHIELDS; PHILIP; BIELAWSKI *et al.*, 2017). Nós propomos que essa diminuição das SM no estágio III pode estar relacionada as alterações celulares necessárias para a progressão do CECP, visto que a partir deste estadiamento são encontradas metástases linfonodais. Um estudo *in vitro* mostrou que proteínas de adesão célula-célula, como E-caderina, β -catenina e α -catenina, necessitam de SM para o processo de adesão e diferenciação celular correta (FAVALE; SANTACREU; PESCIIO; MARQUEZ *et al.*, 2015). Outro estudo mais recente mostra que a diminuição de SM leva a menor diferenciação de células de osteoclastos (YOSHIKAWA; YOSHIKAWA; DOMAE; HIRAI *et al.*, 2019). Esses dados indicam que provavelmente as C18:0 SM e C24:0 SM exercem um papel importante no processo de diferenciação celular, e possivelmente, na transição epitélio-mesenquimal.

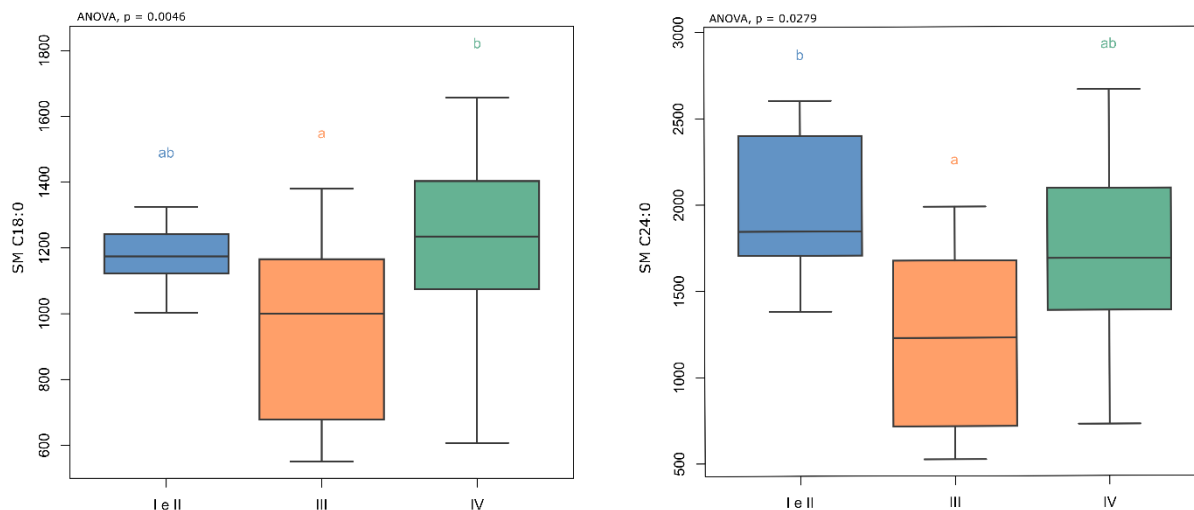


Figura 6. Concentração dos esfingolípídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a estadiamento. Os níveis de C18:0 esfingomielina (C18:0 SM) e C24:0 esfingomielina (C24:0 SM) no plasma foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as categorias.

Alguns esfingolípídios ainda são pouco estudados, devido as suas ações como bioativos serem descobertas recentes, como as LacCer e os diidroesfingolípídios. Nas nossas análises, a C16:0 LacCer e C24:0 LacCer foram associadas a invasão perineural (figura 7). Há evidências que o aumento de LacCer leva ao aumento da proliferação celular e angiogênese, por ativação de AKT e mTOR (CHATTERJEE; HOU; BANDARU; PEZHOUH *et al.*, 2019). Identificamos também o aumento de C18:0 DHCer associado tanto a invasão perineural quanto a metástase (figura 7). Essa alteração, juntamente com aumento de C18:0 DHSM que foi associado com metástase (figura 7), poderia sugerir uma tentativa das células de reduzirem os níveis de ceramidas, que poderiam agir como inibidoras de crescimento. Como mencionado antes, o desequilíbrio da homeostase de ceramidas (redução) pode levar a célula a processos tumorigênicos (CHATTERJEE; HOU; BANDARU; PEZHOUH *et al.*, 2019; HARTMANN; LUCKS; FUCHS; SCHIFFMANN *et al.*, 2012).

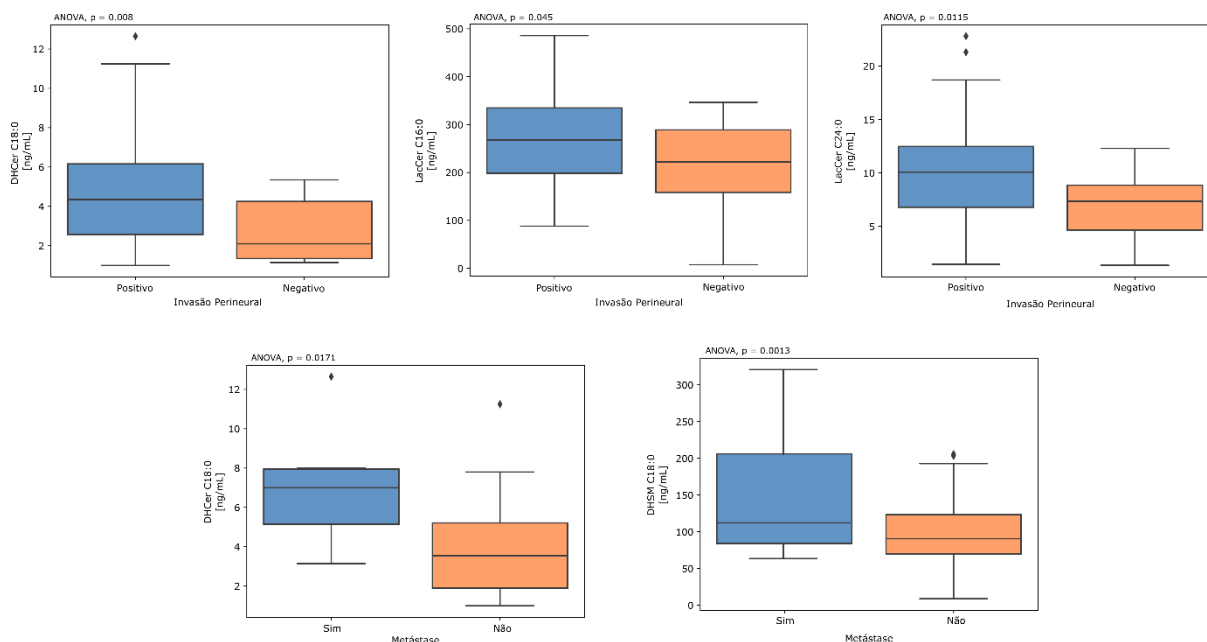


Figura 7. Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de pacientes com CECP associados a invasão perineural e metástase à distância. Os níveis de C18:0 diidroceramida (C18:0 DHCer), C16:0 lactosilceramida (C16:0 LacCer), C24:0 Lactosilceramida (C24:0 LacCer) e C18:0 diidroesfingomiéline (C18:0 DHSM) no plasma foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Em suma, propomos que níveis reduzidos de C25:0 Cer, C24:0 DHCer, C24:0 SM e níveis aumentados de C18:0 SM, C18:0 DHCer, C18:0 DHSM, C16:0 LacCer e C24:0 LacCer podem ser candidatos a indicadores de pior prognóstico em pacientes com CECP.

4.4. Comparação entre o perfil de esfingolipídios do plasma de pacientes CECP e plasma do grupo controle

Os perfis plasmáticos de esfingolipídios do grupo controle e caso obtidos nas análises de espectrometria de massa foram dispostos em um mapa de calor, afim de entendermos de maneira mais clara como essas moléculas estão se comportando nesses dois grupos. Os esfingolipídios se reuniram em três grupamentos hierárquicos principais, dois deles continham plasma controle e o terceiro plasma paciente. O perfil sugere que o plasma dos pacientes com CECP é diferente do controle (figura 8).

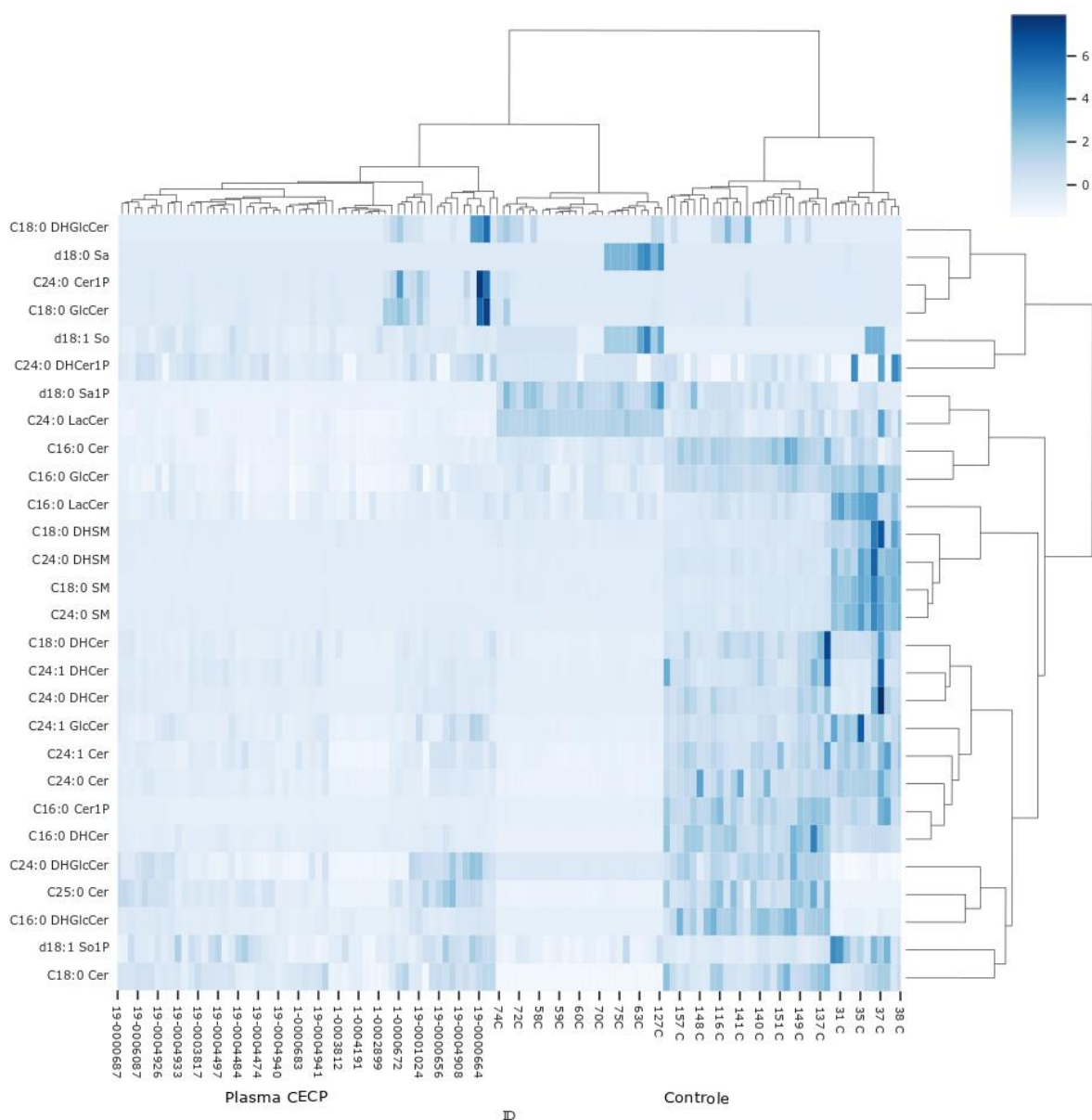


Figura 8 Mapa de calor mostra os níveis dos esfingolípídios de plasmas controle e paciente CECP. As colunas representam as amostras de plasmas dos pacientes com CECP e o controle, enquanto as linhas representam as espécies esfingolípídicas. O aumento dos níveis é representado pelo aumento da intensidade da cor azul.

Análises estatísticas identificaram diferenças significativas entre plasma de controle e dos pacientes em 23 dos 28 esfingolípídios estudados. Destes, C24:0 Cer1P, C18:0 GlcCer e d18:1 So tiveram níveis maiores no plasma dos pacientes (figura 9). Cer1P de cadeia longa, como a encontrada alterada nesse estudo, foi associada a estimular a proliferação, inibir morte celular e promover migração e invasão em diferentes tipos de cânceres. Os mecanismos celulares que levam a essas alterações é a ativação das vias MEK/ERK e PI3K/AKT (A, 2018; RIVERA; ORDÓÑEZ; PRESA; GANGOITI *et al.*, 2016). Dois estudos descreveram a relação da glucosilceramida sintase, responsável por converter ceramida em glicosilceramida, em CECP. Há evidências que essa enzima está

superexpressa em aproximadamente 70% dos cânceres espinocelular de cavidade oral e está associada a pior prognóstico e fenótipos mais agressivos. Principalmente por facilitar a progressão, metástase e a resistência a medicamentos, como a cisplatina (KIM; PARK; ROH; CHO *et al.*, 2016; ROH; KIM; PARK; KIM, 2015).

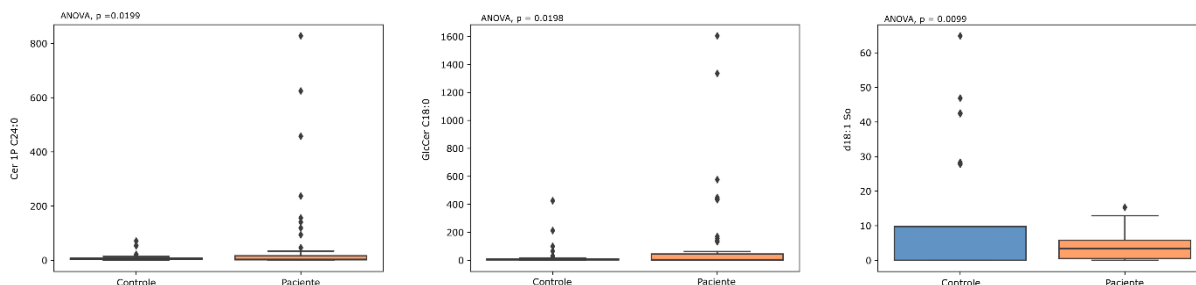


Figura 9: Concentração dos esfingolipídios (nM) do plasma de indivíduos controle e pacientes com CECP. Os níveis de C24:0 ceramida -1-fosfato (C24:0 Cer1P), C18:0 glicosilceramida (C18:0 GlcCer) e esfingosina (d18:1 So) no plasma foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Os demais esfingolipídios tiveram seus níveis reduzidos no plasma de pacientes, sendo eles: Sa, Sa1P; C16:0 Cer, C24:0 Cer e C24:1 Cer; C16:0 DHCer, C18:0 DHCer, C24:0 DHCer e C24:1 DHCer; C16:0 Cer1P; C16:0 GlcCer e C24:1 GlcCer; C16:0 DHGlcCer e C24:0 DHGlcCer; C16:0 LacCer e C24:0 LacCer; C18:0 SM e C24 SM; e C18:0 DHSM e C24:0 DHSM.

4.5. Associação dos níveis de esfingolipídios com características clínico-patológicas do tecido de pacientes com CECP

Assim como no plasma, o perfil dos esfingolipídios das amostras de tecidos (tumor *versus* margem cirúrgica) de pacientes com CECP foram associados as características clínico-patológicas, e doze esfingolipídios foram identificados com níveis alterados. Entre eles estão representantes das classes Sa1P, Cer, DHCer, Cer1P, GlcCer, LacCer.

O tabagismo foi relacionado a oito moléculas esfingolipídicas. Uma delas é a Sa1P, que apresentou-se em concentrações maiores em indivíduos fumantes (figura 10). Não se tem relatos na literatura dessa alteração relacionada ao tabagismo, no entanto esta elevação dos níveis de Sa1P foi observada em amostras de saliva de pacientes com câncer oral quando comparadas com indivíduos controle. As demais sete moléculas tiveram uma relação oposta, quando os indivíduos eram tabagistas os níveis de C16:0 Cer; C18:0 Cer; C24:1 Cer; C25:0 Cer; C16:0 DHCer; C24:0 DHCer; e C24:1 DHCer foram menores (figura 10).

A relação da ceramida com o tabagismo é bem descrita em doenças pulmonares, como exemplo o câncer de pulmão, devido ao epitélio pulmonar ser afetado diretamente pela fumaça do cigarro. Neste tipo específico de tecido, o tabagismo pode promover a elevação das concentrações de C16:0 Cer e vem sendo associada a morte celular por estresse oxidativo, por diversas vias, como apoptose, mitofagia e necroptose. As C16:0 DHCer, C24:0 DHCer e C24:1 DHCer foram associadas em células pulmonares com o aumento de autofagia pro-sobrevivência (MIZUMURA; JUSTICE; SCHWEITZER; KRISHNAN *et al.*, 2018; TAYLOR; THATCHER; CARR; GIBBS *et al.*, 2017). Todavia os resultados obtidos no nosso trabalho, indicam que em CECP a relação do tabagismo com essas duas classes de esfingolípídios é negativa. Indicando que o tabagismo exerce uma resposta distinta em CECP, reduzindo significativamente os níveis de Cer e DHCer no tecido tumoral, o que pode favorecer o desenvolvimento e a progressão do câncer e confirma o papel do tabaco e álcool como fatores de risco.

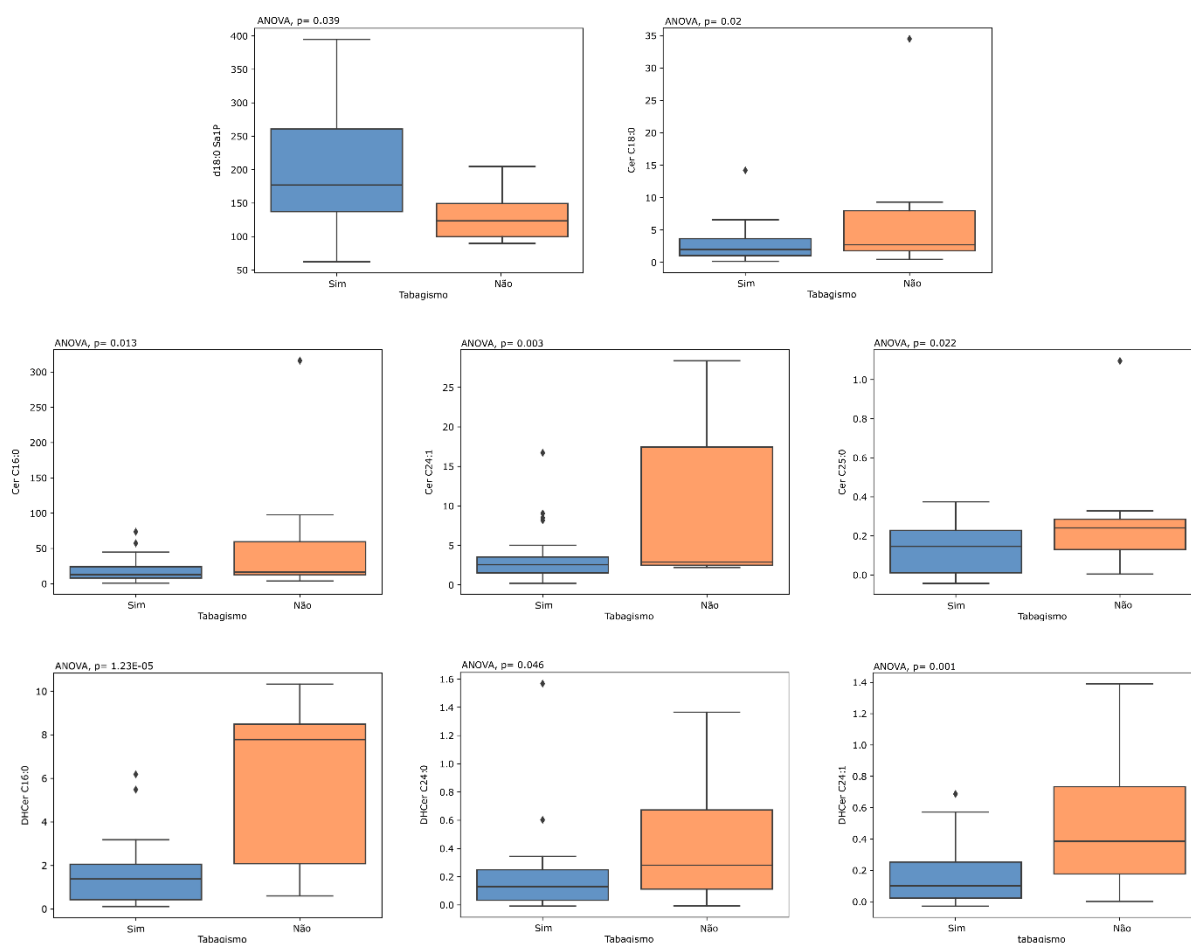


Figura 10: Concentração dos esfingolípídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao tabagismo. Os níveis esfinganina (d18:0 Sa), C16:0 Ceramida (C16:0 Cer), C18:0 Ceramida (C18:0 Cer), C24:1 Ceramida (C24:1 Cer), C25:0 Ceramida (C25:0 Cer), C16:0 diidroceramida (C16:0 DHCer), C24:0 diidroceramida (C24:0 DHCer) e C24:1 diidroceramida (C24:1 DHCer) no tecido foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Assim como no tabagismo as C18:0 Cer; C24:0 Cer; C16:0 DHCer; C24:0 DHCer, além da C24:1 GlcCer e C16:0 LacCer foram encontradas reduzidas quando associadas ao etilismo (figura 11). Ainda não se tem estudos que esclareçam essas relações, no entanto em ensaios *in vivo* especula-se que há uma relação entre a redução de C18:0 Cer e C24:0 Cer no cérebro de animais que consumiam álcool e a sua abstinência levou ao aumento dessas moléculas (BAE; BANDARU; PATEL; HAUGHEY, 2014). Um outro estudo *in vivo* mostrou que o consumo de álcool está relacionado a redução do perfil de ceramidas tanto no tecido cerebral como cardíaco (GODFREY; JEANGUENIN; CASTRO; OLNEY *et al.*, 2015). A redução da GlcCer também foi associada ao consumo de álcool em linhagens celulares cerebrais (SAITO; COOPER; VADASZ 2005). Esses dados sugerem que possivelmente esses dois fatores de risco podem levar a um distúrbio no metabolismo dos esfingolipídios, como a redução significativa dessas moléculas.

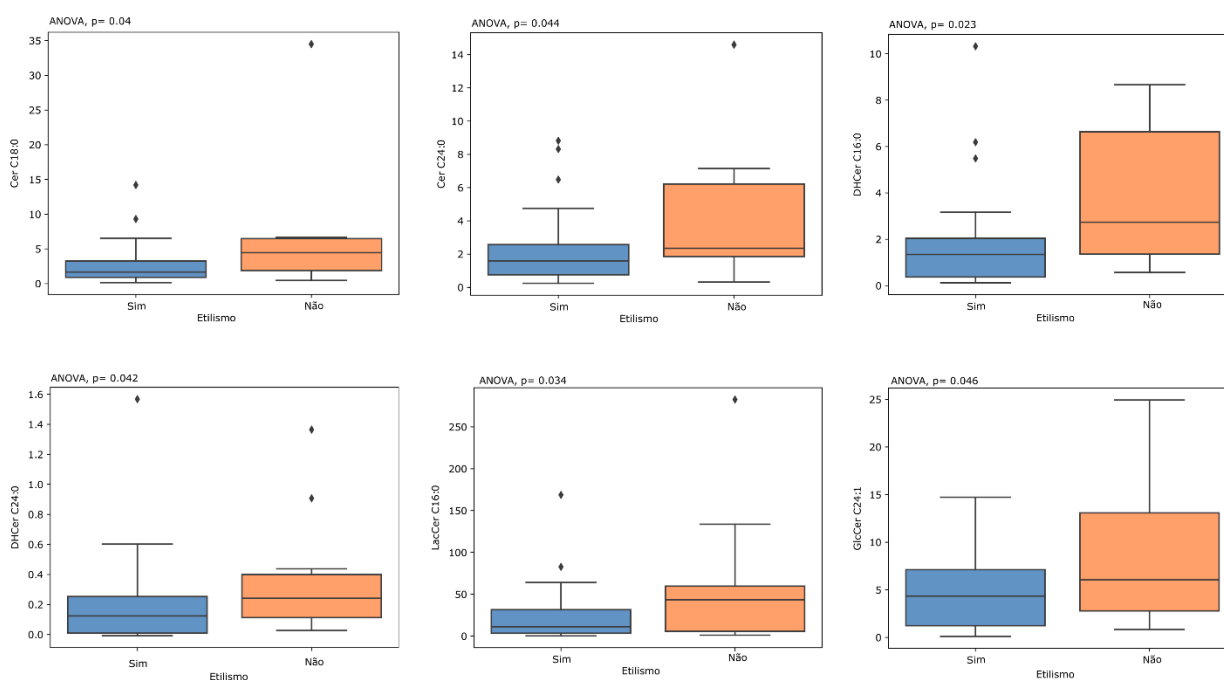


Figura 11: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados ao etilismo. Os níveis C18:0 Ceramida (C18:0 Cer), C24:0 Ceramida (C24:0 Cer), C16:0 diidroceramida (C16:0 DHCer) C24:0 diidroceramida (C24:0 DHCer), C16:0 lactosilceramida (C16:0 LacCer) e C24:1 glucosilceramida (C24:1 GlcCer) no tecido foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Nossos resultados mostraram que há associação de metástase linfonodal com aumento nas concentrações de C24:0 Cer (figura 12). Em estudo prévio de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi observada uma tendência ao aumento dos níveis de C24:0 Cer associado a linfonodo positivo (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007). Essa mesma relação também vem sendo observada em câncer

de mama com status de linfonodo positivo (SCHIFFMANN; SANDNER; BIROD; WOBST *et al.*, 2020). Os nossos dados mostram que há uma forte correlação entre C24:0 Cer e o parâmetro patológico estudado.

A C18:0 ceramida é um esfingolípido bastante estudado, principalmente pelo seu papel antitumoral, e a sua redução tem sido associada a tecidos tumorais quando comparados com não tumorais. Em CECP, a redução de C18:0 Cer foi associada com invasão angiolímfática e metástase em linfonodo (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007). Nossos dados evidenciam a redução de C18:0 Cer no tecido tumoral e mostram associação da diminuição dos níveis com a presença de invasão perineural (figura 12), que é um fator relacionado a piores prognósticos e baixa sobrevida (YILMAZ; HOSAL; GEDIKOĞLU; ONERCI *et al.*, 1998).

A C16:0 Cer apresentou uma regulação negativa das suas concentrações associada a ocorrência de recidiva locorregional (figura 12). Na literatura, alguns trabalhos descrevem o aumento de C16:0 Cer em diferentes tipos de tecidos tumorais, como mama, colorretal e CECP (CHEN; CHEN; LI; LI *et al.*, 2015; KOYBASI; SENKAL; SUNDARARAJ; SPASSIEVA *et al.*, 2004; SCHIFFMANN; SANDNER; BIROD; WOBST *et al.*, 2009). Além disto, em tecidos tumorais de CECP foi descrita uma potencial relação entre o aumento dos níveis de C16:0 Cer e a redução de C18:0 Cer, quando comparados a tecidos não tumorais, no entanto, essa modulação não foi associado a nenhum parâmetro clínico analisado (KARAHATAY; THOMAS; KOYBASI; SENKAL *et al.*, 2007).

Nossos dados mostraram que a redução das concentrações teciduais de C24:0 Cer1P estão relacionadas a presença de metástase (figura 12). Entretanto, há evidências de que um receptor específico de Cer1P é capaz de estimular o potencial de migração/invasão celular, por meio da ativação das vias de sinalização MEK / ERK1-2 e PI3K / Akt, e da regulação positiva do fator de transcrição NF-κB (GOMEZ-MUÑOZ, 2018). Essas observações foram obtidas tanto em células leucêmicas quanto em células de câncer pancreático. Outros autores também citam o papel como molécula como quimioatraente, o que pode estar favorecendo o desenvolvimento tumoral (RIVERA; ORDOÑEZ; PRESA; GANGOITI *et al.*, 2016). Cabe ressaltar, que apesar das concentrações de C24:0 Cer1P no tecido tumoral serem menores do que na margem cirúrgica, identificamos altos níveis no plasma dos pacientes quando comparado ao grupo controle, sugerindo um cenário tumor-específico com níveis diferentes no microambiente tumoral *versus* sangue. Sendo assim, propomos que a C24:0 Cer tem um papel mais relevante no microambiente tumoral para a progressão do CECP do que a

C24:0 Cer1P, mesmo porque em pacientes com CECP a taxa de metástase linfonodal é muito mais alta do que metástases em outros tecidos (Tabela 1).

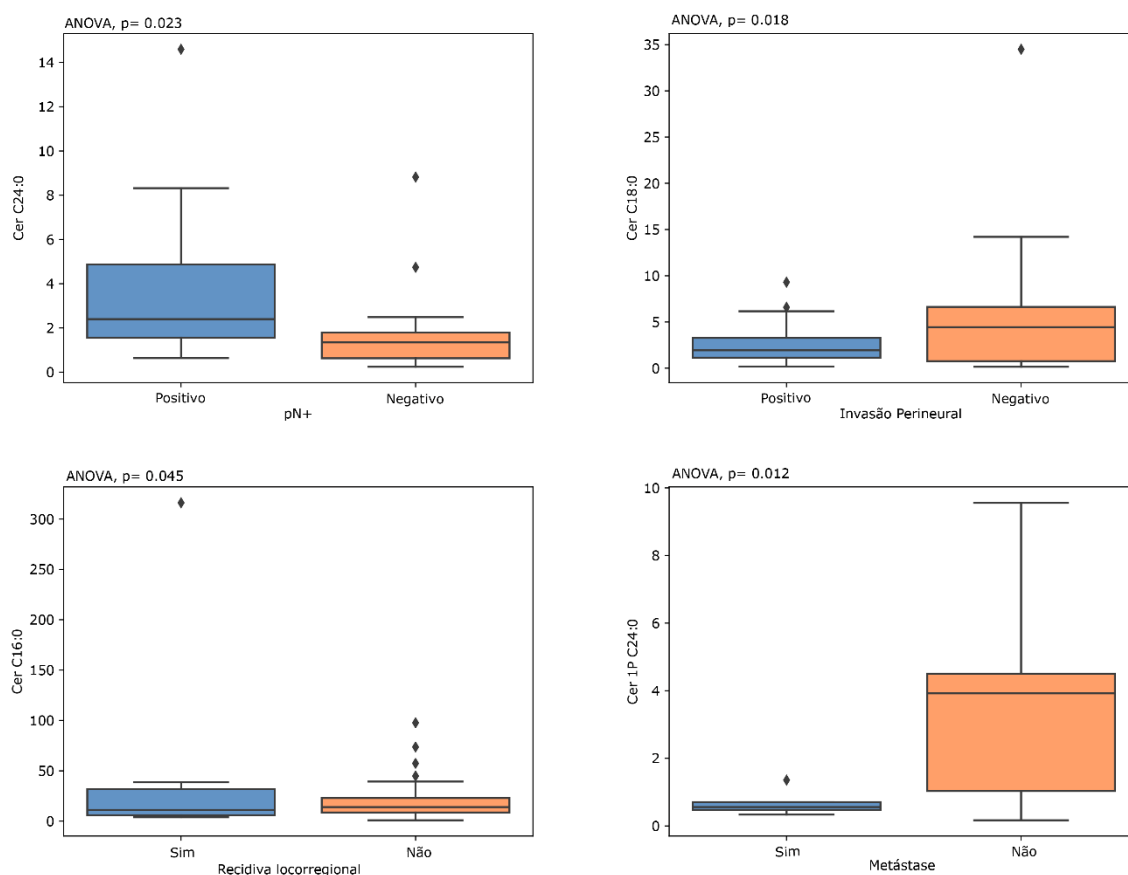


Figura 12: Concentração dos esfingolipídios (nM) do tecido tumoral de indivíduos com CECP associados linfonodo positivo (pN+), invasão perineural, recorrência locorregional e metástase à distância. Os níveis de C25:0 ceramida (C24:0 Cer), C18:0 ceramida (C18:0 Cer), C16:0 ceramida (C16:0 Cer) e C24:0 ceramida-1-fostato (C24:0 Cer1P) no tecido foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

Por fim, no tecido tumoral foram encontrados onze esfingolipídios relacionados com o etilismo ou/e tabagismo. Destes apenas a Sa1P teve uma correlação positiva, as demais Cer (C16:0, C18:0, C24:0, C24:1 e C25:0), DHCer (C16:0, C24:0 e C24:1), C24:1 GlcCer e C16:0 LacCer apresentaram uma relação negativa. Além disso, níveis reduzidos de C24:0 Cer1P, C16:0 Cer e C18:0 Cer, e aumento de C24:0 Cer foram associados a parâmetros tumorais mais agressivos.

4.6. Análise comparativa do perfil esfingolipídico do tecido tumoral e da margem cirúrgica de pacientes com CECP

Posteriormente, às análises do tecido tumoral com os dados clínico-patológicos, os resultados dos esfingolipídios de tecidos tumorais foram comparados com os dados de

tecidos da margem cirúrgica. Esses resultados permitem compreender de maneira mais clara como os esfingolípídios podem estar se comportando quando há a presença do câncer. Dois esfingolípídios foram encontrados em concentrações significativamente maiores em tecido tumoral, a Sa e Sa1P (figura 13). Como os níveis de Sa1P estão bem mais elevados do que os de Sa, acreditamos que se deve ao fato do fluxo metabólico estar convertendo Sa em Sa1P. Portanto, é interessante analisarmos o papel da Sa1P em câncer, assim como das esfingosina quinases que são responsáveis pela fosforilação da Sa e So. Em carcinoma hepatocelular foi descrito o aumento de Sa1P, onde os níveis séricos foram analisados (GRAMMATIKOS; SCHOELL; FERREIRÓS; BON *et al.*, 2016).

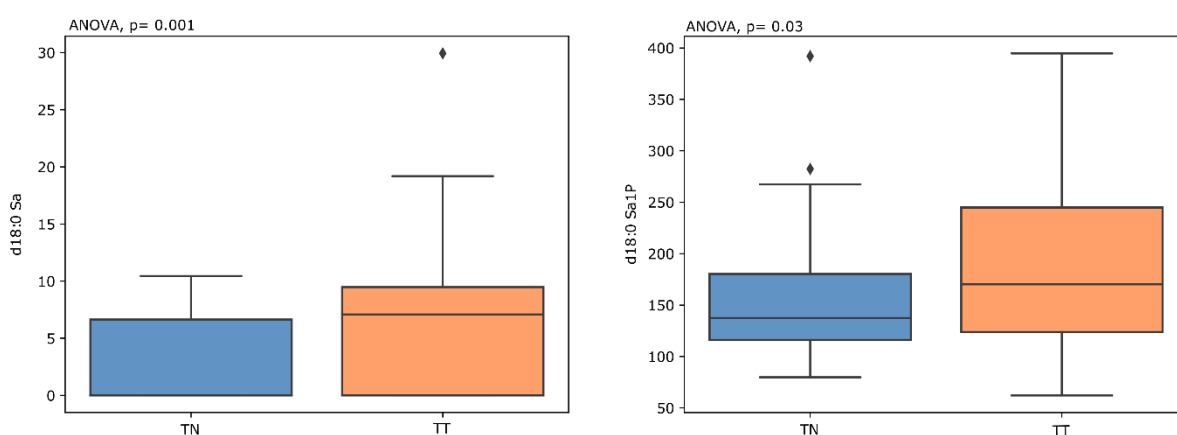


Figura 13: Concentração dos esfingolípídios (nM) com níveis alterados entre tecido tumoral e margem cirúrgica de pacientes com CECP. Os níveis de esfinganina (d18:0 Sa) e esfinganina-1-fosfato (d18:0 Sa1P) no tecido foram determinados por espectrometria de massa. Os valores médios são mostrados pelas linhas horizontais. $P < 0.05$ foram considerados diferentes estatisticamente.

4.7. Esfingolípídios plasmáticos e no tumor podem ser indicadores de prognóstico em pacientes com CECP

As curvas de sobrevida global dos pacientes com CECP incluídos no presente estudo de esfingolípídios em plasma e tecido tumoral estão mostradas na figura 14. No grupo de pacientes do estudo com plasma foram avaliados 56 pacientes, sendo que destes 20 vieram a óbito, com sobrevida de 26,9 meses (figura 14-A). No grupo de pacientes do estudo com tecido tumoral/margem foram avaliados 42 pacientes, com 15 óbitos e uma média de 25,19 meses de sobrevida (figura 14-B). A sobrevida encontrada foi a esperada, visto que em CECP a maioria das recorrências e mortes ocorre nos primeiros dois a três anos da doença (DU; MAZUL; FARQUHAR; BRENNAN *et al.*, 2019; RIBEIRO; CAMELO; ESTEVES; MENOITA *et al.*, 2017).

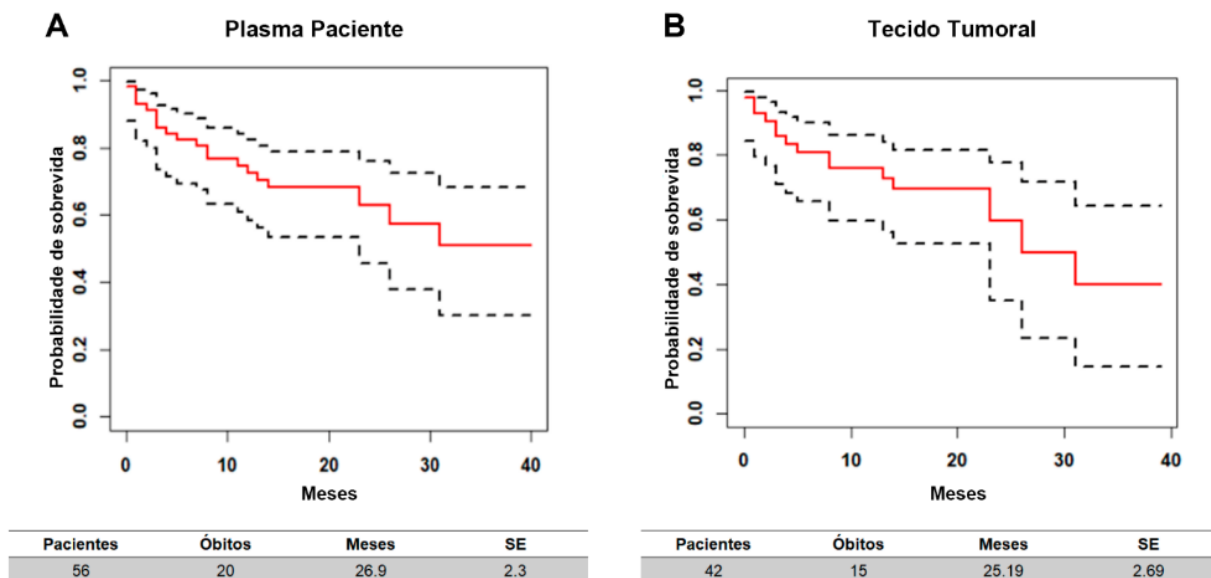


Figura 14: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes com CECP. Dados de sobrevida referente aos 56 pacientes utilizados nas análises de plasma (A). Dados referentes aos 42 pacientes utilizados nas análises de tecido (B).

Posteriormente, a taxa de risco ou *Hazard Ratio* (HR) foi estimada usando os dados de esfingolípídios tanto para plasma quanto para tecido tumoral, e indica a taxa de risco de morte. Portanto, para valores maiores que 1 a taxa de risco de morte associado ao esfingolípídio em CECP é maior e quando for inferior a 1 a taxa de risco é menor.

Nas amostras de plasma, quatro moléculas apresentaram significância neste teste estatístico ($p < 0,05$), sendo que a C24:1 Cer; e C24:1 GlcCer tiveram um valor de HR maior que 1, indicando um risco maior de óbito (Figura 15). E outros dois esfingolípídios, C24:0 Cer e C25:0 Cer tiveram HR menor que 1, indicando um menor risco. Nas amostras de tecido tumoral as C16:0 e C24:0 Cer; C16:0 DHCer; e C24:0 DHSM foram identificadas com maior risco (figura 15). Esses resultados mostram que esses esfingolípídios podem estar associados a um desfecho favorável ou não em CECP, dependendo das suas concentrações no plasma e no tecido tumoral.

Modelos de Regressão de Riscos Proporcionais de Cox univariados do plasma de pacientes com CECP

	HR	95% CI	Valor-p
d18.1.So > 3	1.99	0.72-5.52	0.18
d18.1.SolP > 100	1.69	0.66-4.28	0.26
d18.0.Sa1P > 10	0.77	0.29-2.01	0.59
Cer.1P.C16.0 > 30	0.62	0.25-1.51	0.29
Cer.1P.C24.0 > 5	0.71	0.28-1.81	0.48
Cer.C16.0 > 79	2.82	0.99-8.05	0.053
Cer.C18.0 > 18	0.89	0.36-2.21	0.79
Cer.C24.1 > 250	2.46	1.01-5.99	0.047
Cer.C24.0 > 765	0.39	0.16-0.97	0.043
Cer.C25.0 > 44	0.37	0.15-0.92	0.032
DHCer.C16.0 > 6.8	1.78	0.72-4.39	0.21
DHCer.C18.0 > 3.9	0.95	0.39-2.29	0.9
DHCer.C24.1 > 15	0.62	0.26-1.52	0.29
DHCer.C24.0 > 30	0.48	0.18-1.22	0.12
GlcCer.C16.0 > 95	1.24	0.51-3.04	0.63
GlcCer.C18.0 > 30	0.85	0.32-2.24	0.74
GlcCer.C24.1 > 180	2.82	1.16-6.87	0.022
DHGlcCer.C16.0 > 1.0	0.55	0.22-1.36	0.19
DHGlcCer.C18.0 > 1.0	1.06	0.35-3.21	0.92
DHGlcCer.C24.0 > 4.0	1.38	0.57-3.34	0.47
DHCer1P.C24.0 > 3.6	0.61	0.23-1.54	0.29
LacCer.C16.0 > 250	1.44	0.59-3.49	0.42
LacCer.C24.0 > 9	1.34	0.54-3.36	0.53
SM.C18.0 > 1200	1.2	0.49-2.92	0.69
SM.C24.0 > 1500	0.42	0.16-1.07	0.07
DHSM.C12.0 > 0.5	0.52	0.19-1.44	0.21
DHSM.C18.0 > 100	0.56	0.19-1.55	0.26
DHSM.C24.0 > 35	0.75	0.31-1.82	0.52

Modelos de Regressão de Riscos Proporcionais de Cox univariados do tecido de pacientes com CECP

	HR	95% CI	Valor-p
d18.1.So > 0	1.02	0.33-3.19	0.97
d18.0.Sa > 10	0.48	0.11-2.17	0.34
d18.1.SolP > 5	1.87	0.59-5.97	0.29
d18.0.Sa1P > 180	0.69	0.22-2.19	0.53
Cer.1P.C16.0 > 50	0.46	0.12-1.73	0.25
Cer.1P.C24.0 > 3	0.93	0.29-2.92	0.9
Cer.C16.0 > 20	3.19	1.14-8.96	0.027
Cer.C18.0 > 2	1.09	0.38-3.17	0.86
Cer.C24.1 > 2.5	1.47	0.49-4.35	0.48
Cer.C24.0 > 2.5	3.5	1.1-11.1	0.033
Cer.C25.0 > 0.2	1.14	0.36-3.64	0.82
DHCer.C16.0 > 2	3.35	1.05-10.77	0.042
DHCer.C18.0 > 0.1	0.91	0.32-2.64	0.87
DHCer.C24.1 > 0.2	0.89	0.28-2.84	0.85
DHCer.C24.0 > 0.15	0.56	0.18-1.71	0.31
GlcCer.C16.0 > 10	1.2	0.39-3.64	0.74
GlcCer.C18.0 > 3	1.83	0.59-5.58	0.29
GlcCer.C24.1 > 5	0.94	0.33-2.68	0.91
DHGlcCer.C16.0 > 0.4	1.4	0.49-3.99	0.53
DHGlcCer.C18.0 > 0.3	0.31	0.08-1.23	0.096
DHGlcCer.C24.0 > 0.3	0.66	0.21-2.12	0.49
DHCer1P.C24.0 > 0.3	1.49	0.53-4.18	0.45
LacCer.C16.0 > 30	1.96	0.65-5.98	0.23
LacCer.C24.0 > 2	1.66	0.58-4.71	0.34
SM.C18.0 > 20	0.96	0.33-2.79	0.94
SM.C24.0 > 27	1.94	0.67-5.6	0.22
DHSM.C18.0 > 5	0.62	0.20-1.88	0.39
DHSM.C24.0 > 2	3.66	1.28-10.45	0.015

Figura 15: Taxa de risco (HR) para esfingolipídios em CECP (plasma e tumor). Análise regressão de Hazard proporcional a Cox univariada para as concentrações de esfingolipídios (nM) no plasma e no tecido tumoral de pacientes com CECP. Intervalo de confiança (CI) de 95% e valor de $p < 0.05$.

Em seguida, definimos as curvas de sobrevida global com os esfingolipídios analisados no plasma e no tecido, sendo que dez moléculas mostraram significância estatística ($p < 0.05$), podendo ser indicador de prognóstico em pacientes com CECP (figura 16 e 17). No plasma foram identificadas seis diferentes moléculas (C16:0 Cer; C24:0 Cer; C24:1 Cer; C25:0 Cer; C24:0 DHCer; e C24:1 GlcCer) associadas a uma redução na probabilidade de sobrevida dos pacientes. As Ceramidas C16:0 e C24:1 apresentaram uma redução da taxa de sobrevida quando suas concentrações foram maiores que 80 e 250 nM, respectivamente. A GlcCer também apresentou a mesma associação, quando a concentração foi superior a 180 nM. As outras três moléculas tiveram uma probabilidade de sobrevida reduzida quando o valor era menor que o de referência, que foram definidos para Cer C24:0 > 764 nM; Cer C25:0 > 44 nM e DHCer C24:0 > 31 nM.

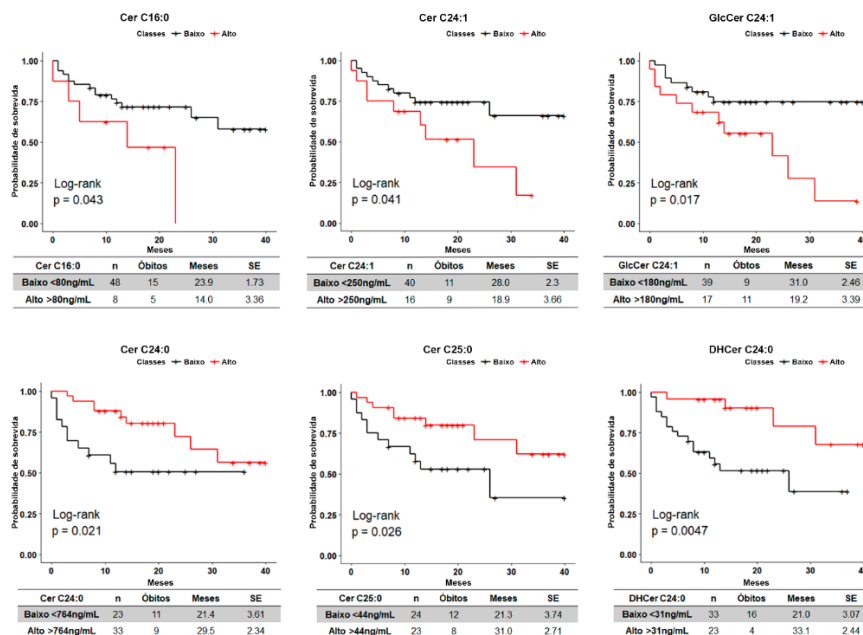


Figura 16: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolípídios nos plasmas dos pacientes com CECP. Linha preta valores abaixo e linha vermelha valores acima do valor estabelecido para o esfingolípídio. Foram considerados significativos Log-rank<0.05.

Nas amostras de tecidos tumorais, duas Ceramidas (C16:0 Cer e C24:0 Cer) e dois diidroesfingilipídios (C16:0 DHCer e C24:0 DHSM) foram associados com a redução na probabilidade de sobrevida dos pacientes (figura 17). As maiores concentrações das quatro moléculas foram associadas a menor probabilidade de sobrevida. Sendo o valor de referência da C16:0 Cer>20 nM; C24:0 Cer>2,5 nM, da C16:0 DHCer e C24:0 DHSM>2.776 nM.

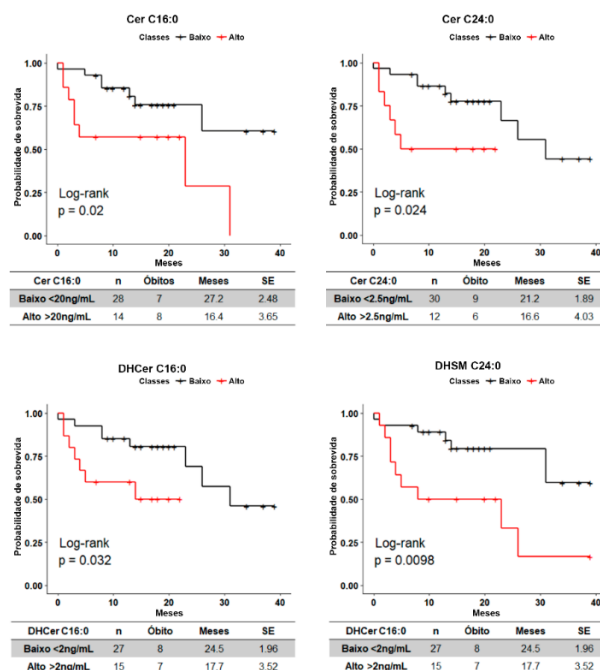


Figura 17: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global para esfingolípídios nos tecidos tumorais dos pacientes com CECP. Linha preta valores abaixo e linha vermelha valores acima do valor estabelecido para o esfingolípídio. Foram considerados significativos Log-rank<0.05.

Os gráficos de sobrevida global também foram analisados baseados nos fatores clínico-patológicos (figura 18). O estadiamento clínico refere-se a localização e a extensão do câncer e é classificado de I a IV. Em nossas análises, agrupamos os três primeiros estágios em um grupo e o estágio IV em outro, afim de obtermos um número mais robusto para a análise. Os resultados mostram que no estágio mais avançado da doença (IV) a probabilidade de sobrevida é reduzida. Sendo que a sobrevida média reduz de 34,6 meses para 23,9 meses de um grupo para o outro. Este resultado está de acordo com outros trabalhos da literatura em CECP (ABRAHÃO; PERDOMO; PINTO; CARVALHO *et al.*, 2020)

O tamanho do tumor é outro parâmetro que influencia na sobrevida (BUDACH; TINHOFER, 2019). Identificamos uma relação inversamente proporcional entre o tamanho do tumor e a taxa de sobrevida. Isso significa que quanto maior o tumor, menor é a sobrevida global, sendo que a diferença da média entre cada grupo foi de 10 meses.

A presença de metástase linfonodal, invasão perineural e angiolinfática foram relacionadas a taxas de sobrevida menores em comparação a indivíduos que não tinham estas características. A sobrevida média apresentou uma queda significativa quando o paciente era positivo para os 3 parâmetros analisados, dos quais a invasão angiolinfática teve o pior prognóstico, alterando de 30,4 para 16,6 meses a sobrevida.

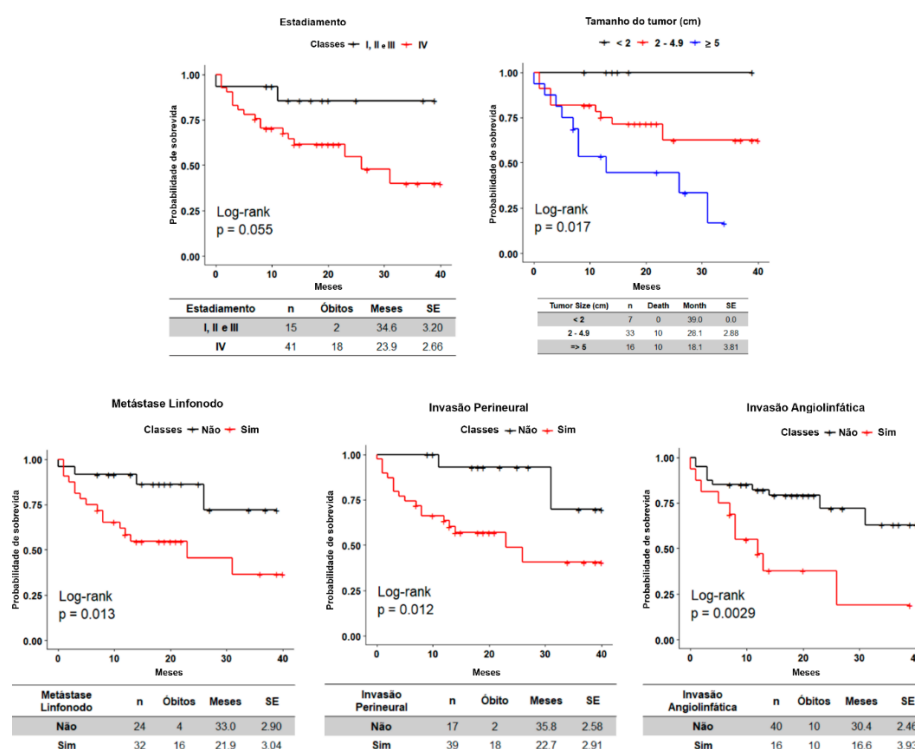


Figura 18: Gráfico de Kaplan-Meier de sobrevida global considerando os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes com CECP. Foram considerados significativos Log-rank < 0.05.

4.8. Avaliação do potencial diagnóstico dos esfingolipídios no plasma

Com base nos nossos dados de esfingolipídios das amostras de plasma dos pacientes e do grupo controle buscamos identificar o potencial diagnóstico de cada metabolito analisado por MS. Para isso realizamos a análise de ROC (Característica de Operação do Receptor), aonde buscou-se concentrações lipídicas que reduzissem o falso positivo (1 - especificidade) mantendo o máximo possível de sensibilidade (verdadeiro positivo). Seis esfingolipídios se enquadraram nos critérios estabelecidos, apresentando um grau de separabilidade (AUC) acima de 80%. A Sa1P apresentou um AUC de 0,975 para concentrações <70 nM, a C16:0 Cer em concentração <125 nM obteve um AUC de 0,931, C16:0 Cer1P <5000 nM AUC de 0,846, C16:0 LacCer <20 nM AUC de 0,949, C18:0 DHSM < 300 nM AUC 0,855, C24:0 DHSM <100 nM AUC 0,918 (figura 19).

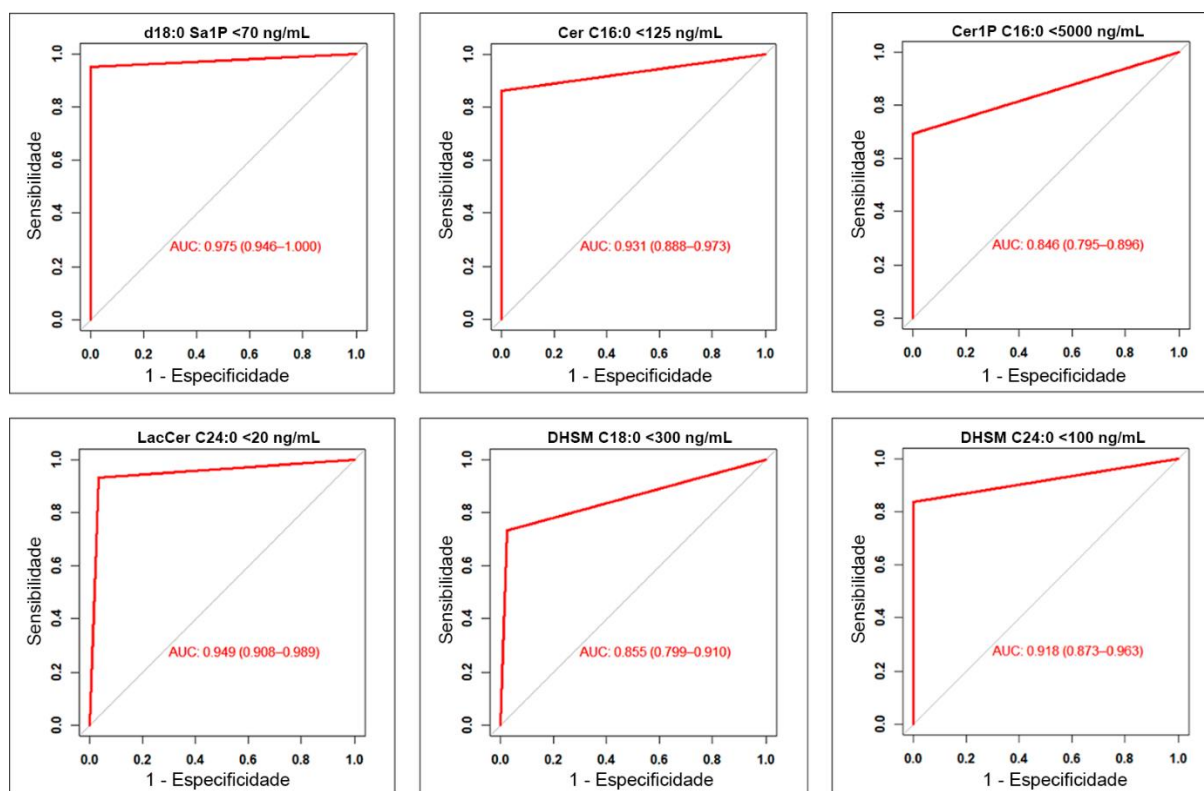


Figura 19: Curva ROC referente aos esfingolipídios dos plasmas dos pacientes com CECP.

Para propor um potencial teste diagnóstico mais robusto, as moléculas foram combinadas (figura 20). De forma inédita, identificamos duas combinações que tiveram um modelo perfeito com AUC de 1, sendo elas Sa1P combinado com C24:0 DHSM e Sa1P combinado com C16:0 Cer1P. As demais combinações apresentaram AUC superior a 0,95 demonstrando serem ótimas alternativas para o diagnóstico também.

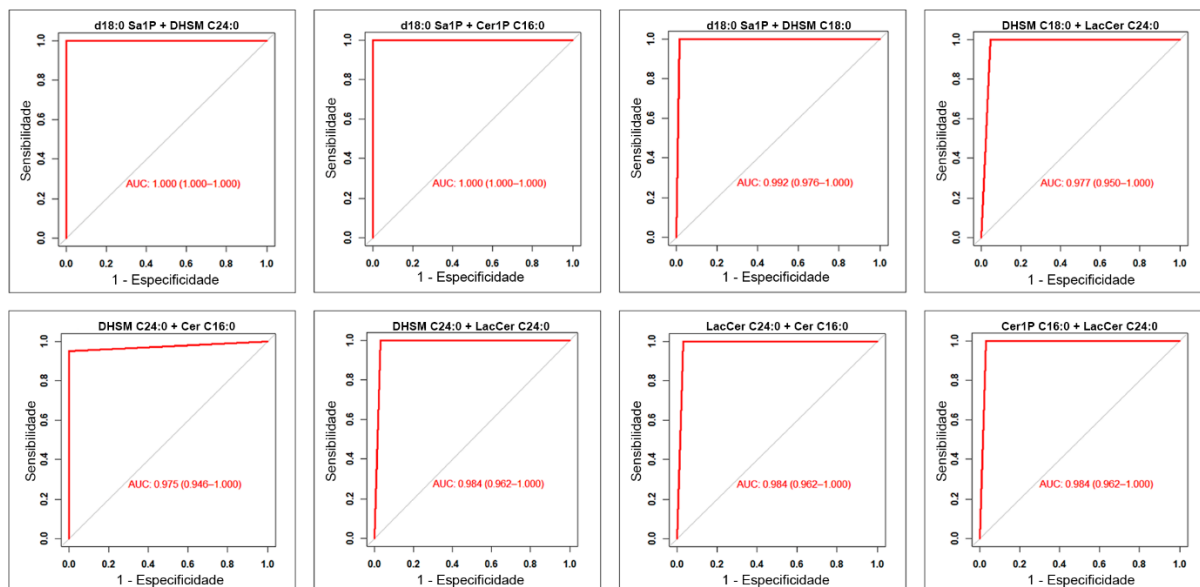


Figura 20: Curva ROC referente às combinações dos esfingolípídios dos plasmas dos pacientes com CECP.

Com base nesses resultados, é possível sugerir que os esfingolípídios selecionados no nosso estudo, podem auxiliar no diagnóstico, acompanhamento e prognóstico do CECP utilizando amostras de plasma. Esses resultados trazem maior esclarecimento sobre o potencial envolvimento dos esfingolípídios em CECP.

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.; SADDOUGHI, 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.

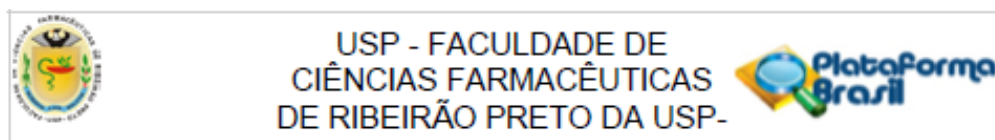
YILMAZ, T.; HOSAL, A.; GEDIKOĞLU, G.; ONERCI, M. *et al.* Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. **American journal of otolaryngology**, 19, n. 2, 1998.

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_1228299_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: "Confirmo também que entreguei uma via deste documento para o participante e mantereí 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.

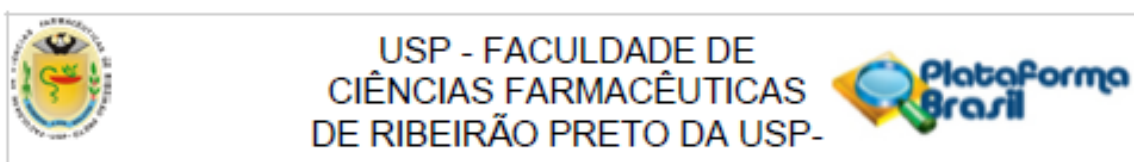
Em resposta, a pesquisadora informou que as modificações solicitadas foram realizadas na nova versão do TCLE (TCLEv3) e também anexaram novo formulário do SAME do HC-FMRP/USP assinado pela Profa. Andreia Leopoldino (como pesquisadora responsável pelo estudo) e pelo Prof. Hilton Marcos Alves Ricz (Chefe 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 esfingolípídios 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 esfingolípídios. 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 esfingolípídios. 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 28/06/2019. 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@fctfp.usp.br



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_BASICAS_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	temocompromissoV4.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 16:49:45	Andreia Machado Leopoldino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HC_1.pdf	05/02/2019 16:46:21	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:

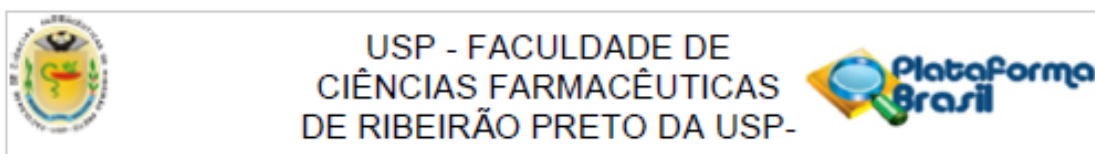
Não

RIBEIRAO PRETO, 28 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		CEP: 14.040-903
Bairro: Monte Alegre		
UF: SP	Município: RIBEIRAO PRETO	
Telefone: (16)3315-4213	Fax: (16)3315-4892	E-mail: cep@fcrfp.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 a partir 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 Clínicas 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@fctrp.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_130795_1_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