

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PI3K,
AKT E GLUT1 NA MODULAÇÃO DA VIA GLICOLÍTICA
EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

2022

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PI3K,
AKT E GLUT1 NA MODULAÇÃO DA VIA GLICOLÍTICA
EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Odontologia Clínica e Experimental).

Orientadoras

Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira

Profa. Dra. Danielle Dutra Voigt

2022

**CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO
NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

GIOVANNETTI-MENEZES, Natascha.

Análise da expressão gênica de IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1 na modulação da via glicolítica em carcinoma de células escamosas oral. Rio de Janeiro, UNIGRANRIO, Faculdade de Odontologia, PPGO, 2022.

XIX, 115 f.

Tese – Doutor em Odontologia -Clínica Odontológica

1. Carcinoma de células escamosas oral. 2. Via glicolítica.

3. IGF1R 4. PI3K.

5. AKT 6. GLUT1

I.UNIGRANRIO

II. Análise da expressão gênica de IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1 na modulação da via glicolítica em carcinoma de células escamosas oral.

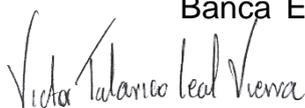
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PI3K, AKT E GLUT1 NA
MODULAÇÃO DA VIA GLICOLÍTICA EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ORAL

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Clínica Odontológica).

Aprovada em 05 de outubro de 2022.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Victor Talarico Leal Vieira (Presidente da Banca)
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO/AFYA

Prof. Dr. Marcos Fábio Henriques dos Santos (Membro da Banca)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Marcos Santos

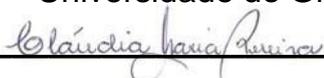
Assinado de forma digital por Marcos Santos
Dados: 2022.10.18 08:16:28 -03'00'



Profa. Dra. Sara Gemini Piperni (Membro da Banca)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Prof. Dr. Paulo André da Silva (Membro da Banca)
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO/AFYA



Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira (Orientadora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Profa. Dra. Danielle Dutra Voigt (Orientadora)
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO/AFYA

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha
mãe, Branca, pelo esforço em
sustentar os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, para que eu pudesse chegar até aqui e por todas as oportunidades e conquistas obtidas ao longo da minha trajetória.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Pereira, pela sua confiança, dedicação, paciência e por todos os seus ensinamentos teóricos e laboratoriais, incentivo à participação de Congressos, sendo uma orientadora sempre muito prestativa e oferecendo todo o suporte necessário do início ao fim, para a concretização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Danielle Dutra Voigt, por todo carinho e ensinamentos durante as atividades de bancada, principalmente pelo seu precioso auxílio na etapa final, para a conclusão deste estudo.

À Prof^a. Dr^a. Carina Maciel Boghossian pela disponibilidade, confiança, incentivo à participação de Congressos e importante auxílio na fase inicial do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Flávio Rodrigues Ferreira Alves, pelo carinho, incentivo e colaboração para este estudo ser concluído.

Aos professores da Clínica de Graduação do Departamento de Estomatologia da UNIGRANRIO: Prof. Luiz Carlos Moreira, Prof^a. Vânia e Prof. Rodrigo, por transmitir seus conhecimentos, experiências e auxílio na coleta das amostras de biópsias de CCEO e levantamento dos dados nos prontuários clínicos.

Aos professores da Clínica de Graduação e Pós-Graduação dos Departamentos de Periodontia e Implantodontia, Prof^a. Marcela Melo, Prof. Luiz Paulo Barreto e Prof. Rodrigo Granato que colaboraram para a obtenção das amostras clínicas do grupo controle.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof. Dr. Paulo André da Silva, Prof. Dr. Plínio Senna e Prof. Dr. Marcos Fábio Henriques dos Santos, pelas críticas e sugestões construtivas que ajudaram no desenvolvimento desse

trabalho.

A todos os demais professores e colaboradores dos Programas de Pós-Graduação ODONTOCLINEX e BIOTRANS pela dedicação ao ensino e pesquisa.

Aos amigos do curso de Doutorado: André, Marcia, Flávio, Alessandro, Sílvia, Walter e Fernanda pela amizade e companheirismo.

Aos colegas dos Laboratórios LAMP e LABGEN da UNIGRANRIO: Sílvia, Rômulo, Hadassa, em especial à Ana Beatriz Lima, pelo companheirismo e ensinamentos, durante as atividades de bancada.

A todos os pacientes que participaram da pesquisa e que com muita boa vontade e paciência contribuíram para este estudo.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia: Andréia e Maurício, pelo apoio e colaboração oferecidos durante o curso.

Às instituições de fomento à pesquisa e a pós-graduação: CAPES, CNPq, FAPERJ e Pró-Reitoria da UNIGRANRIO pelo suporte financeiro.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração desse estudo, gostaria de expressar o meu mais profundo agradecimento.

EPÍGRAFE

“A educação mais elevada é aquela que não nos dá meramente informação, mas faz com que a nossa vida esteja em harmonia com toda a existência”.

Rabindranath Tagore

ÍNDICE

RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 O carcinoma de células escamosas oral (CCEO)	2
1.1.1 Epidemiologia.....	3
1.1.2 Fatores de Risco.....	3
1.1.3 Características Clínicas e Diagnóstico do CCEO.....	6
1.1.4 Características Histopatológicas.....	7
1.1.5 Metástase, estadiamento, prognóstico, escolha do tratamento e sobrevida.....	9
1.2 O metabolismo energético celular	12
1.2.1 A via glicolítica	13
1.2.2 Alteração do metabolismo celular: uma das principais características metabólicas do câncer	15
1.2.3 Efeito Warburg: metabolismo da glicose aeróbica nas células oncogênicas	16
1.2.4 Reprogramação metabólica e a influência do microambiente tumoral	19
1.3 Proteínas envolvidas na via glicolítica das células tumorais	23
1.3.1 Receptor de fator crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R)	25
1.3.2 Proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).....	27
1.3.3 Proteína quinase serina/treonina AKT (AKT).....	29

1.3.4	Proteína transportadora de glicose (GLUT).....	30
	A avaliação do metabolismo tumoral alterado através do método	
1.3.5	de PET-SCAN e sua relação com a expressão de GLUT nas células tumorais... ..	36
2	JUSTIFICATIVA	40
3.	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo Principal	41
3.2	Objetivos Específicos.....	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	População do Estudo	42
4.1.1	Critérios de inclusão.....	42
4.1.2	Critérios de exclusão.....	43
4.2	Amostras	43
4.2.1	Amostras de cultura de células.....	43
4.2.2	Amostras de tecido de mucosa oral de pacientes	44
4.3	Análise Molecular	46
4.3.1	Análise molecular nas amostras de linhagens de células.....	46
4.3.2	Análise molecular nas amostras de tecido obtidas dos pacientes	47
4.4	Avaliação da expressão dos genes IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 por qPCR	48
4.4.1	Extração de RNA das amostras	48
4.4.2	Confecção de cDNA.....	48
4.4.3	Reação de qPCR	49
4.5	Análise Estatística	51
5.	RESULTADOS	52
5.1	Análise comparativa da expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 na linhagem celular de queratinócitos normais (HaCaT) e na linhagem celular de câncer de língua (SCC25).....	52
5.2	Expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 na linhagem celular SCC25.	53

5.3	Dados Histopatológicos e Moleculares das Amostras de biópsias dos pacientes.....	54
5.4	Dados Sociodemográficos e hábitos de vida (tabagismo e etilismo) dos pacientes	55
5.5	Amplificação de amostras de RNA dos pacientes com carcinoma de células escamosas e com mucosa oral saudável.....	59
5.6	Análise dos parâmetros sociodemográficos associados à expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 na amostra individual dos pacientes.	62
6.	DISCUSSÃO	68
7.	CONCLUSÕES	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9.	ANEXOS	86
	ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	86
	ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	87
	ANEXO 3 – Prontuário-Ficha Clínica para Projeto de Pesquisa I.....	91
	ANEXO 4 - Prontuário-Ficha Clínica para Projeto de Pesquisa II	93

RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) apresenta uma alta taxa de mortalidade na população mundial, em grande parte devido ao seu diagnóstico tardio e à resistência aos medicamentos. Na busca de novos biomarcadores do processo de carcinogênese oral, destaca-se a mudança do fenótipo metabólico das células neoplásicas, fenômeno conhecido como Efeito Warburg. Nele, observa-se um aumento de expressão de proteínas envolvidas na via glicolítica, pelas células tumorais, com o objetivo de aumentar a captação de glicose. **Objetivos:** Analisar a expressão das proteínas *IGF1R*, *PI3K*, *AKT* e *GLUT1*, em amostras de linhagens celulares e amostras de biópsia de pacientes com CCEO. **Material e Métodos:** Foi extraído o RNA total das amostras para a confecção dos cDNAs que permitiram a avaliação dos genes *IGF1R*, *PIK3CA*, *AKT1* e *SLC2A* por qPCR. Foram avaliadas duas linhagens celulares: uma tumoral de CCEO de língua (SCC 25) e uma normal de queratinócitos (HaCat). Amostras de biópsias foram obtidas de indivíduos com mucosa oral saudável (MS=7) e diagnosticados com CCEO (CCEO=10). **Resultados:** Nas amostras de linhagem celular de CCEO (SCC25), os dados mostraram hiperexpressão de *PI3K* e *AKT* e hipoexpressão de *GLUT1*, enquanto não houve diferença significativa para a *IGF1R*, ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). Entre os grupos de pacientes, não houve diferença significativa para a expressão de *IGF1R*, enquanto para *PI3K*, *AKT* e *GLUT1* apesar de se mostrarem hiperexpressos no grupo CCEO, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,0845$; teste de Mann-Whitney). **Conclusão:** Os dados demonstram que na linhagem tumoral (SCC25) a via canônica *PI3K/AKT* está hiperexpressa, porém não houve associação com *IGF1R* e *GLUT1*. Não foi observada associação na variação de expressão de *IGF1R*, *PI3K*, *AKT* e *GLUT1* em nossa amostra da população de pacientes com carcinoma de células escamosas oral.

Palavras-chave: CCEO, *IGF1R*, *PI3K*, *AKT*, *GLUT1*.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a high mortality rate in the world population, largely due to its late diagnosis and drug resistance. In the search for new biomarkers of the oral carcinogenesis process, the change in the metabolic phenotype of neoplastic cells stands out, a phenomenon known as the Warburg Effect. In it, an increase in the expression of proteins involved in the glycolytic pathway by tumor cells is observed, with the aim of increasing glucose uptake.

Objectives: To analyze the expression of IGF1R, PI3K, AKT and GLUT1 proteins in cell line samples and biopsy samples from patients with OSCC. **Material and**

Methods: Total RNA was extracted from the samples for the preparation of cDNAs that allowed the evaluation of the IGF1R, PIK3CA, AKT1 and SLC2A genes by qPCR. Two cell lines were evaluated: a tumor cell line from OSCC of the tongue (SCC 25) and a normal cell line from keratinocytes (HaCat). Biopsy samples were obtained from subjects with healthy oral mucosa (MH=7) and diagnosed with OSCC (OSCC=10). **Results:** In the OSCC cell line samples (SCC25), the data showed overexpression of PI3K and AKT and underexpression of GLUT1, while there was no significant difference for IGF1R, ($p > 0.05$; Mann-Whitney test). Among the groups of patients, there was no significant difference for the expression of IGF1R, while for PI3K, AKT and GLUT1, despite being overexpressed in the OSCC group, no statistically significant difference was found ($p > 0.0845$; Mann-Whitney test). **Conclusion:** The data demonstrate that in the tumor cell line (SCC25) the canonical PI3K/AKT pathway is overexpressed, but there was no association with IGF1R and GLUT1. No association was observed in the variation of IGF1R, PI3K, AKT and GLUT1 expression in our sample population of patients with oral squamous cell carcinoma.

Keywords: OSCC, IGF1R, PI3K, AKT, GLUT1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Apresentação clínica do CCEO.....	6
Figura 2.	Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) de borda lateral da língua.....	8
Figura 3.	Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa (OXPHOS), glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (Efeito de Warburg).....	16
Figura 4.	Esquema representando o microambiente tumoral e as contribuições baseadas na matriz extracelular (ECM) que dão suporte ao processo de transição epitélio- mesênquima e invasão do carcinoma de células escamosas oral (CCEO).....	20
Figura 5.	Esquema da reprogramação do metabolismo celular tumoral decorrente de eventos oncogênicos.....	22
Figura 6.	Transdução do sinal do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e superativação da via glicolítica.....	24
Figura 7.	Mecanismos de transporte da glicose para as células: Transporte Passivo e Transporte Ativo... ..	31
Figura 8.	Achados clínicos e de FDG -PET de um paciente de 78 anos com CCEO de língua.....	37

Figura 9.	Fluxograma representativo da metodologia empregada na pesquisa.....	45
Figura 10.	Esquema ilustrativo da comparação de expressão gênica de IGF1R, PI3K, AKT1 e GLUT1, entre a linhagem celular de carcinoma de células escamosas (CCE) de língua (SCC 25) e a linhagem celular de queratinócitos normais (HaCat), através da técnica de qPCR.....	46
Figura 11.	Esquema ilustrativo da análise molecular de expressão gênica de IGF1R, PI3K, AKT1 e GLUT1, entre as amostras clínicas de biópsia de CCEO (OSCC) e mucosa oral normal através da técnica de qPCR.....	47
Figura 12.	Expressão gênica de <i>IGF1R</i> , <i>PK3CA</i> , <i>AKT1</i> e <i>SLC2A1</i> (<i>GLUT1</i>) por qPCR, nas linhagens celulares de queratinócitos normais (HaCaT) e de CCE de língua (SCC25)	54
Figura 13.	Expressão gênica comparativa entre GAPDH (CTL), IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) por qPCR, na linhagem celular de câncer de língua (SCC25)	60
Figura 14.	Imagens de gel de agarose a 1,5%, ilustrando a amplificação da β -actina (amplicon 353 bp), nas amostras da transcrição reversa dos cDNAs dos pacientes.....	61
Figura 15.	Expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) por qPCR, em indivíduos com Mucosa Saudável e CCEO	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados sociodemográficos e presença de hábitos da amostra dos pacientes participantes do estudo com Mucosa Oral Saudável (MS) e Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO).....	57
Tabela 2.	Parâmetros clínicos-patológicos da amostra de pacientes portadores de Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO).....	58
Tabela 3	Parâmetros sociodemográficos e de expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) nos pacientes do Grupo de Mucosa Oral Saudável (MS).....	63
Tabela 4	Parâmetros clínicos-patológicos, sociodemográficos e de expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) nos pacientes do Grupo de Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AKT: *serine/threonine kinase*

AKT1: *serine/threonine kinase 1*

ATP: adenosina trifosfato

CAFs: fibroblastos associados ao câncer

CCECP: Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço

CCEO: Carcinoma de Células Escamosas Oral

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CNS/MS: Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde

CO₂: dióxido de carbono

C₆H₁₂O₆: glicose

Ct: *Cycle threshold*

DNA: ácido desoxirriboucleico

ECM: matriz extracelular

ELK: *ETS Like protein*

ERK: *Extracellular-signal Regulated Kinase*

18F-FDG :18-flúor, 2 deoxiglicose

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GDP: *guanosine diphosphate*

GLUT: proteína transportadora de Glicose

GLUT1: proteína transportadora de Glicose tipo 1

Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*

GST: genes supressores de tumores

GTP: *guanosine triphosphate*

HaCaT: *aneuploid immortal keratinocyte cell line from adult human skin*

Hela: *Henrietta Lacks Cell Line*

H&E: hematoxilina-eosina

HIF-1 α : fator induzido por hipoxia-1 alfa

HPV: papilloma vírus humano

H₂O: água

IGF-1R: receptor de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IR: receptor de insulina

IRS1/IRS2: *Insulin Receptor Substrate-1/ Insulin Receptor Substrate-2*

LABA Laboratório de Biotecnologia Aplicada

LDHA: enzima lactato-desidrogenase

LLC: leucemia linfocítica crônica

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MCL-1: *myeloid cell leukemia-1*

MEK: *mitogen extracellular kinase*

miRNAs: microRNAs

mRNA: RNA mensageiro

Myc: *myelocytomatosis oncogene*

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

O₂: oxigênio

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSCC: *oral squamous cell carcinoma*

OXPHOS: *Oxidative Phosphorylation* (fosforilação oxidativa)

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDK-1: piruvato desidrogenase quinase -1

PDK: *phosphoinositide-dependent kinase*

PET-SCAN: Tomografia/ Escaneamento por emissão de pósitrons

Ph: potencial hidrogeniônico

PI: *phosphatidylinositol*

PI3K: *fosfatidilinositol-3-kinase*

PIK3CA: *fosfatidilinositol-4,5-bisfosphate 3-kinase subunidade catalítica alfa*

PTEN: *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

p85 e p110: subunidades 85 e 110 da *phosphatidylinositol 3 kinase*

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RAF: *murine sarcoma viral oncogene homolog*;

Ras *rat sarcoma viral oncogene homolog*

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RQ: quantificação relativa

SCCs: células-tronco cancerosas

SCC25: *squamous cell carcinoma of the oral tongue*

SCO2: síntese da proteína citocromo c oxidase

SHC: *Src homology collagen*

SHP: *Src homology phosphatase*

SLC2A1: *solute carrier family 2-member 1*

SGLT: proteína co-transportadora dependente de sódio

SOS 1: *son of sevenless 1*

TC: Tomografia Computadorizada

TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNM: Sistema TNM de estadiamento dos tumores

Tp53: *tumor protein p53*

UNIGRANRIO: Universidade do Grande Rio

UFF: Universidade Federal Fluminense

UICC: *Union for International Cancer Control*

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VHL: proteína von *Hippel-Lindau*

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é um tumor maligno que afeta a cavidade oral, sendo responsável por uma alta morbidade e mortalidade na população mundial. Além de mudanças no estilo de vida do paciente, seu prognóstico se relaciona a outros aspectos, como a presença de comorbidades, estadiamento tumoral e alterações nas vias celulares (IRIMIE et al., 2018; ECKERT et al.,2020).

Mesmo com o uso de tratamento multimodal, as taxas de sobrevida para pacientes com CCEO avançado, permanecem baixas, principalmente devido ao seu diagnóstico tardio e ao desenvolvimento de resistência a medicamentos. Sendo assim, apesar dos avanços verificados nas pesquisas, não houve nas últimas décadas nenhuma melhora no prognóstico deste câncer (CHAI et al., 2019).

Com base na identificação de novos biomarcadores no processo de carcinogênese oral, vem-se buscando analisar o papel da sinalização de várias vias de regulação das células tumorais, entre elas a via canônica PI3K-AKT (*PI3K- fosfatidilinositol-3-kinase, AKT- serine/threonine kinase*), que pode ser regulada pela proteína IGF1R (receptor de fator de crescimento semelhante a insulina 1). Dentre os diversos eventos moleculares desta via, destaca-se a expressão de oncogenes e a repressão de genes supressores de tumor, a participação de proteínas ligadas à regulação do ciclo celular, a proliferação celular, e principalmente das proteínas ligadas ao metabolismo celular (KUNKEL et al., 2003; KUNKEL et al., 2007; HATZIAPOSTOULOU et al., 2013; GHANAVAT et al., 2021).

Modificações nas vias metabólicas das células tumorais fornecem suporte à rápida proliferação, desempenhando um papel importante na carcinogênese e progressão da doença. Alterações na via glicolítica têm sido descritas em muitos

tipos de neoplasias e podem estar relacionadas ao alto grau de agressividade e invasão do CCEO (KUNKEL et al., 2007). A avidéz das células oncogênicas na captação da glicose, por meio da proteína transportadora de glicose tipo I (GLUT1), e a regulação positiva das principais proteínas ligadas ao metabolismo glicolítico fornecem oportunidades únicas para o diagnóstico precoce, previsão de progressão da doença e resposta ao tratamento (SANDULACHE & MYERS, 2012).

Apesar disso, até o momento, pouco se sabe sobre a influência da expressão das proteínas moduladoras da via glicolítica no processo de carcinogênese do carcinoma de células escamosas oral.

Assim, o foco principal deste estudo foi estudar o metabolismo glicolítico do CCEO através da análise do perfil de expressão gênica das proteínas IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1 em uma amostra de indivíduos portadores de CCEO.

1.1 O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL (CCEO)

O CCEO é uma neoplasia maligna que acomete os tecidos da cavidade oral e tem sua origem no epitélio de revestimento da boca, sendo responsável por aproximadamente 90% do total de casos de câncer oral (SHAH & LYDIATT, 1995; AKANUMA et al., 1999; SCULLY & PORTER, 2000; IRIMIE et al., 2018).

Considerado um importante problema de saúde pública, o câncer oral, está, atualmente, entre as dez neoplasias mais incidentes na população mundial (ECKERT et al., 2020).

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou-se que para cada ano do triênio 2020-2022, sejam diagnosticados 15.210 novos casos de câncer de cavidade oral (11.200 em homens e 4.010 em mulheres). Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,70 casos novos a cada 100 mil pessoas. O sexo masculino apresenta um risco estimado maior, de 9,25 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e para o sexo feminino, de 2,66 casos novos a cada 100 mil mulheres, representando o 12º mais frequente, entre todos os tipos de cânceres, (MS/INCA, 2020).

Normalmente, o câncer oral aumenta sua incidência com a idade e acomete principalmente indivíduos na faixa etária dos 50 aos 80 anos. Entretanto, estudo multicêntrico evidenciou aumento de risco em faixas etárias mais jovens, sugerindo exposições a fatores de risco de forma precoce. Tem predominância do sexo masculino, na proporção de 3:1. Os locais mais acometidos pelo CCEO são a língua assoalho da boca e o palato mole. O restante é encontrado nas gengivas e outros locais da mucosa oral (MS/INCA, 2020).

1.1.2 FATORES DE RISCO

O tabaco, o álcool e a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) são os principais fatores de risco associados ao CCEO. Estudos apontam que 80% dos casos de CCEO são diagnosticados em tabagistas e o risco de os indivíduos fumantes desenvolverem CCEO é proporcional à quantidade de tabaco utilizada (> 1 maço/dia) e a duração do tabagismo (>35 anos). Enquanto a cessação do tabagismo se associa a diminuição gradativa do risco de desenvolvimento de câncer

oral. (SHAH & LYDIATT,1995; DANIEL et al., 2006; MS/INCA, 2020).

O tabaco tem a capacidade de lesar o DNA celular, induzindo efeitos mutagênicos e por isso é considerado um carcinógeno completo. Além de ser um estímulo à proliferação celular pela sua ação irritativa, contêm muitas substâncias citotóxicas em sua composição como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as nitrosaminas e a nicotina, que é uma das substâncias presentes mais importantes (BLOT et al., 1988; ANDRE et al.,1995).

A nicotina possui rápida absorção pelos tecidos da cavidade bucal, promovendo em seguida vasoconstricção, diminuindo a nutrição das células epiteliais. Além disso, essa substância é capaz de reduzir o nível sérico da vitamina C, causando alteração na biossíntese de colágeno e consequente redução das fibras de colágeno e elastina nos tecidos (FRANCO et al., 1989; DAS & NAGPAL, 2002).

A exemplo do que ocorre com as mucosas e a pele, a imunidade local também é reduzida, já que em indivíduos fumantes, foi observada uma deficiência de função de neutrófilos, mostrando uma diminuição de quimiotaxia, fagocitose e aderência, aumentando a susceptibilidade a inflamações e doenças (SCHEIDT et al., 2012).

Outro fator de risco associado ao CCEO é o consumo de bebidas alcoólicas. O álcool pode ter ação direta e/ou indireta na carcinogênese. A ação direta está relacionada com a sua metabolização e consequente liberação dos aldeídos (substâncias carcinogênicas) irritando a mucosa oral, já a sua ação indireta está relacionada ao efeito carcinogênico sinérgico, quando se associa ao tabaco (BLOT et al., 1988), atuando como um solvente das substâncias carcinógenas contidas nele (Andre et al.,1995; Scheidt et al., 2012). Estima-se que quando o álcool e tabaco estão associados, o risco relativo para a ocorrência de CCEO aumenta, sendo potencializado em até 141,6 vezes, de acordo com a quantidade, frequência e duração de consumo (ANDRE et al.,1995).

Mais recentemente, estudos apontaram alguns vírus do grupo do HPV, principalmente dos subtipos 16 e 18, como importantes fatores de risco de câncer de cavidade oral e orofaringe em pacientes mais jovens, sem relato de exposição ao tabaco e/ou ao álcool, (ALBERS et al., 2010). Devido ao fato de o HPV possuir a capacidade de ativar oncogenes e mutar os genes supressores de tumor, é considerado o "vírus sinérgico" mais provável de estar envolvido nos cânceres orais e de orofaringe (GRAVITT et al., 2000).

Os oncogenes e os genes supressores de tumor são genes responsáveis pelo equilíbrio da divisão celular. Os oncogenes são responsáveis por estimular a divisão celular e os genes supressores de tumor possuem a função de "frear" essa divisão. Portanto, é necessário que haja um equilíbrio no funcionamento entre esses dois genes (Bartel,2004; Hammond, 2006; Zhang et al., 2007).

Alterações nestes genes podem levar à expressão alterada de seus produtos, e conseqüente formação de tumores (MACFARLANE & MURPHY, 2010; YAMASAKI et al., 2013; CHAMORRO et al., 2015)

Os oncogenes codificam fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento e podem atuar em moléculas de sinalização internas e regular fatores de transcrição de DNA. Já os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem o ciclo celular ou promovem a morte celular programada (apoptose) (MACFARLANE & MURPHY, 2010). Quando ocorrem alterações nestes genes, eles podem tornar-se inativados ou mutados com conseqüente perda de controle sobre a divisão celular. Mutações espontâneas ou induzidas por algum fator externo (como o vírus HPV16), podem levar ao desequilíbrio durante as várias etapas da divisão celular, predispondo o surgimento do CCEO (HERRERO et al., 2003; KINDT et al., 2019).

1.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DO CCEO

Clinicamente as lesões de CCEO podem apresentar-se com um aspecto leucoplásico, eritroplásico ou eritroleucoplásico. Com sua evolução, pode ocorrer um crescimento exofítico ou endofítico, de base endurecida e áreas de necrose (JADHAV et al., 2013) (**Figura 1 A-E**).

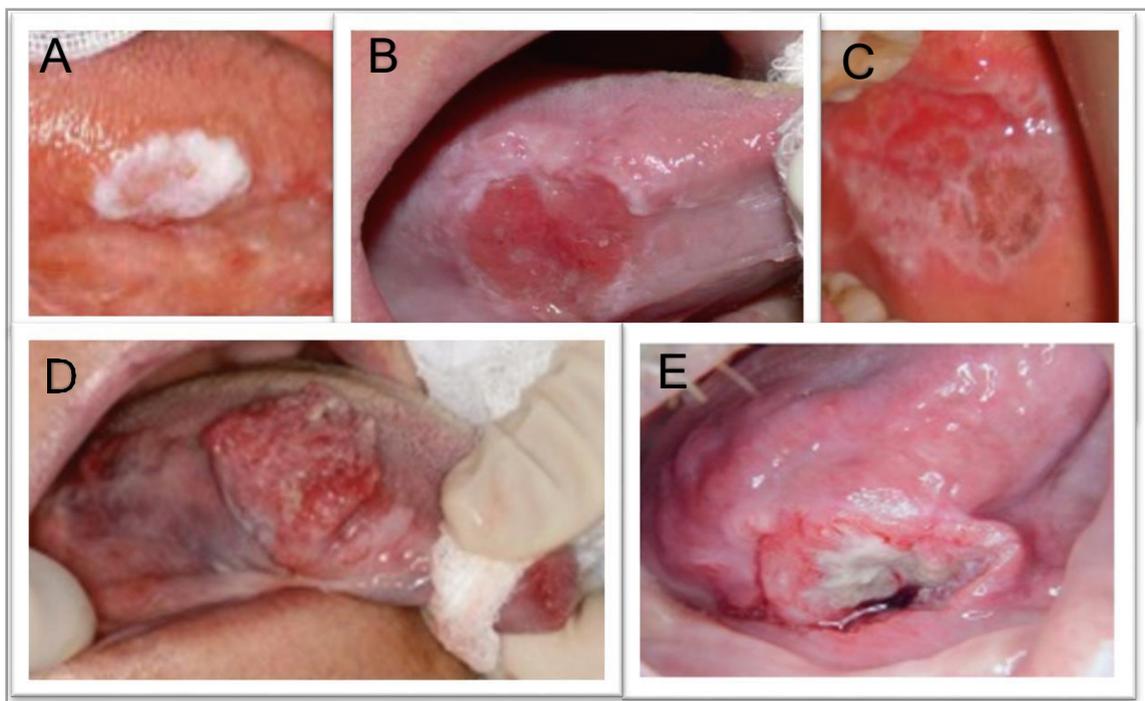


Figura 1. Apresentação clínica do CCEO. (A) Placa leucoplásica (B) Placa eritroplásica (C) Aspecto leucoeritroplásico (D) Lesões exofíticas que se projetam acima da superfície (E) Lesões endofíticas (ulceradas e profundas, bordas em “rolete”). Fonte: Adaptado de JADHAV *et al.* (2013).

As lesões exofíticas caracterizam-se por apresentar uma superfície irregular, papilar ou verruciforme. Estas lesões, normalmente, se apresentam com consistência dura. As lesões endofíticas, normalmente, se apresentam com uma área de ulceração central, com bordas endurecidas "em rolete", indicando invasão local para o interior do tecido (MARKOPOULOS et al., 2012).

O diagnóstico do CCEO deve ser realizado através de anamnese, exame

clínico e histopatológico. No exame clínico, ao ser identificada uma lesão suspeita de neoplasia, deve ser realizada uma biópsia incisional sob anestesia local da região, com a finalidade de se obter uma amostra de tecido bucal. A amostra, uma vez coletada, é encaminhada para o exame histopatológico para a definição do diagnóstico. Para esta análise, devem ser corretamente registradas as dimensões e características da lesão: se é ulcerada, infiltrativa, necrosada, com infecção secundária, se ultrapassa a linha média, se há indícios de invasão óssea e/ou da musculatura profunda (CRUZ et al., 2012).

As lesões muito iniciais, num primeiro momento, podem ser avaliadas sem a necessidade de exame de imagem. Já nos casos mais avançados, quando o tecido ósseo subjacente é atingido, o exame radiográfico poderá mostrar área radiolúcida com margens mal definidas e aspecto de roído de traça. (PALAZS et al., 2017).

1.1.4 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Histologicamente, no CCEO observa-se uma invasão de células epiteliais no tecido conjuntivo, essas células se arranjam em forma de cordões e ilhas. Pode-se observar a formação de pérolas de ceratina, infiltrado inflamatório crônico intenso e a presença de muitos vasos sanguíneos (angiogênese). Além disso as células apresentam atipia celular como: relação núcleo-citoplasma aumentada, hipercromatismo, pleomorfismo celular, núcleos e nucléolos aumentados, diversas mitoses e presença de mitoses atípicas (LOURENÇO et al., 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação histopatológica do CCEO (MS/INCA, 2004) pode ser de 3 tipos:

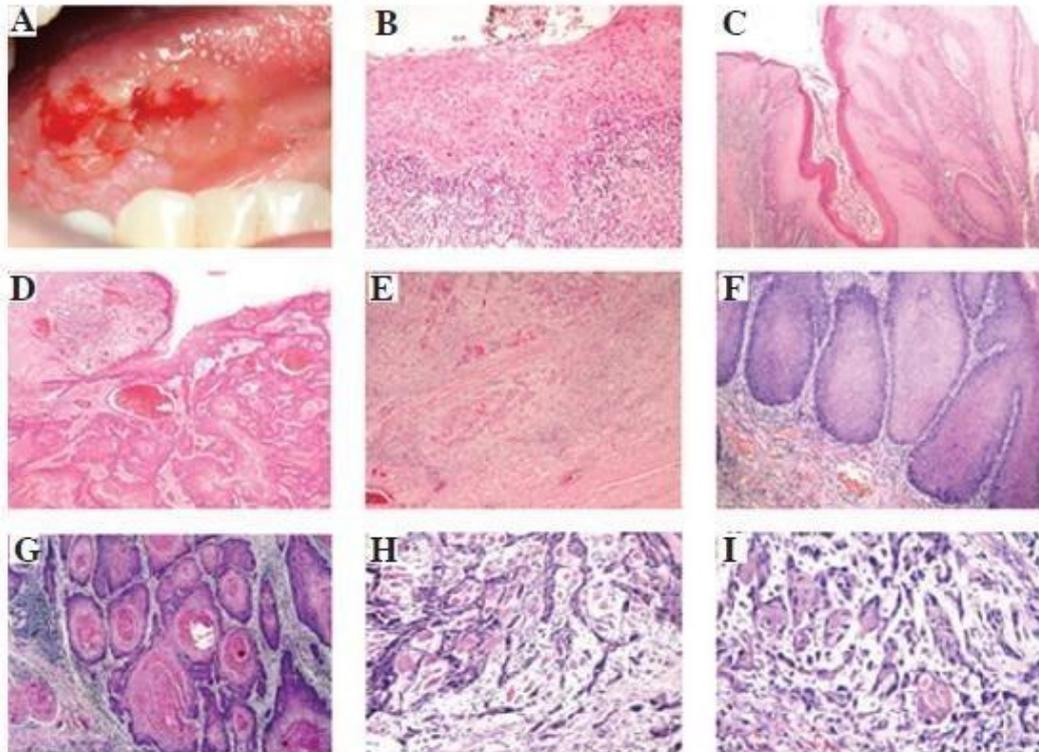


Figura 2. Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) de borda lateral da língua. (A) Imagem clínica; (B-I) Graus histológicos de diferenciação tumoral do CCEO: (B) Displasia severa do epitélio superficial associada a infiltração inflamatória crônica na interface estromal-epitelial do epitélio displásico (coloração, H&E; ampliação, x50). (C) Bem diferenciado, hiperqueratose e inflamação associada à interface estromal - epitelial; (D) moderadamente diferenciado; e (E) infiltração indiferenciada e células dispersas sem demarcação clara entre a invasão do tecido frontal e circundante (coloração, H&E; ampliação, x25). Diferentes padrões de invasão na frente de invasão tumoral de acordo com a morfologia celular: (F) Frentes amplas de invasão; (G) larguras das células das ilhotas; (H) cordões infiltrantes finos; e (I) células individuais invadindo a interface. Fonte: Adaptado de RIVERA & VENEGAS (2014).

- **Bem diferenciado** – Pode-se encontrar semelhança com o tecido de origem da lesão, ou seja, os ceratinócitos ainda não perderam a capacidade de produzir ceratina, nesse padrão encontra-se um maior número de pérolas de ceratina e um menor grau de atipia celular. O tumor cresce em uma velocidade

mais lenta e a tendência para metástase é mais baixa.

- **Pouco diferenciado** - Neste padrão, há predomínios de células imaturas, sendo difícil reconhecer seu tecido de origem. Assim os CCEOs pouco diferenciados caracterizam-se por apresentar mínima ceratinização e um grau de atipia celular bastante elevado. Esses tumores crescem com maior velocidade e tendem a metastizar mais precocemente.
- **Moderadamente diferenciado** - É um padrão intermediário entre os dois tipos classificados acima.

1.1.5 METÁSTASE, ESTADIAMENTO, PROGNÓSTICO, ESCOLHA DO TRATAMENTO E SOBREVIDA

A metástase do CCEO ocorre através da via linfática para os linfonodos cervicais. Os linfonodos cervicais, normalmente, possuem consistência pétrea e apresentam-se aumentados e indolores. Em relação as metástases à distância, os sítios mais comuns são: pulmões, fígado e ossos (FEDELE, 2009; LYDIATT et al., 2017). As metástases dos CCEOs não surgem precocemente, no entanto, o problema ocorre em função do diagnóstico tardio das lesões. Isto se deve ao fato de a grande maioria dos pacientes só procurar atendimento quando a lesão já está evoluída (FRANCO et al., 1989).

O estadiamento dos tumores primários de cabeça e pescoço segue o esquema geral proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e a *Union for International Cancer Control (UICC)* denominado TNM. A letra “T” designa o tamanho do tumor primário em centímetros, a letra “N” o acometimento dos linfonodos locais e sua extensão e a letra “M” designa a presença ou ausência de metástases a distância. Este sistema tem sido usado como sistema padrão para caracterização dos tumores, para propor a terapia adequada e estimar a sobrevida

dos pacientes (AJCC/UICC, 2017).

Em relação ao prognóstico, vários fatores devem ser considerados: graduação histopatológica, localização anatômica do tumor, estilo de vida (hábitos de tabagismo e etilismo), aspectos demográficos (ex: idade e gênero), estado de saúde geral e do sistema imunológico do paciente e grau de alterações de vias moleculares oncogênicas. A partir das três características do sistema TNM, é possível definir um estágio para a lesão. Quanto maior for o estágio, pior o prognóstico para o paciente (LYDIATT et al., 2017).

O sistema TNM de definição é suplementado, se necessário, por outras variáveis que permitam uma melhor avaliação do prognóstico e pode ser alterado ao longo do tempo para incorporar novas variáveis ou ante novas evidências (LYDIATT et al., 2017). O estadiamento atual, baseado na 8ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer da AJCC (AJCC/UICC, 2017), introduziu mudanças significativas que permitem uma melhor estratificação prognóstica dos pacientes em subgrupos clínicos relevantes, porém como não é o objetivo do presente estudo, não será aqui abordado.

A escolha do tipo de tratamento (cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia) do CCEO está relacionada ao estadiamento clínico e ao grau de diferenciação histopatológico do tumor. Pacientes com tumores em estádios iniciais geralmente são tratados com monoterapia (cirurgia ou radioterapia). Por outro lado, o tratamento combinado (cirurgia e radioterapia associada ou não a quimioterapia/imunoterapia) geralmente é recomendado para pacientes com tumores avançados (DANIEL et al., 2006).

Em relação à sobrevida, evidências mostram que aproximadamente 65% dos pacientes sobrevivem mais que 5 anos, com o emprego de terapias isoladas ou associadas, porém dados apontam que existem diferenças significativas de acordo

com o status socioeconômico da população. Segundo FEDELE (2009), a sobrevida de 5 anos para o CCEO varia de 81% para doença localizada, 42% para doença regional, e 17% quando há metástases.

O escaneamento de tumores pela tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN), método que avalia o metabolismo tumoral alterado através de um análogo fluorado da glicose, pode auxiliar o diagnóstico e estadiamento do CCEO, por meio da visualização de linfonodos comprometidos e da localização de metástases à distância (MS/INCA, 2018).

Estudos relacionados ao monitoramento de tumores sólidos, mostraram que o fenótipo metabólico alterado das células tumorais, como demonstrado no exame de PET-SCAN, desempenha um papel importante na tumorigênese e progressão da doença. Neste contexto, observou-se que o aumento no consumo de glicose, ajuda a fornecer a energia necessária para a proliferação das células tumorais e a maior expressão de transportadores de glicose, reflete a adaptação às condições adversas do ambiente tumoral. (KUNKEL et al., 2007; DEBERARDINIS et al., 2008, HATZIAPOSTOULOU et al., 2013).

Assim, avanços recentes da biologia molecular têm demonstrado que o estudo do metabolismo diferenciado das células tumorais fornece oportunidades únicas para a identificação de novos biomarcadores moleculares importantes para o diagnóstico precoce, avaliação prognóstica e terapêutica (KUNKEL et al., 2007; HATZIAPOSTOULOU et al., 2013).

1.2 O METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

Metabolismo energético celular é o conjunto das reações químicas que ocorrem no interior das células e tem como objetivo satisfazer a necessidade de energia do indivíduo. Para que essas reações ocorram, são necessários substratos energéticos, os quais são obtidos por meio da alimentação. Os carboidratos, os lipídios e as proteínas são as fontes de energia metabólica utilizadas nessas reações. Estes compostos seguem rotas metabólicas distintas e têm como finalidade produzir compostos finais específicos e essenciais para a vida (HASHIRAMOTO et al., 1992).

Durante o processo de respiração celular, a **glicose (C₆H₁₂O₆)** representa o principal carboidrato utilizado pelas células como fonte de energia. Depois que a glicose entra nas células, ela é convertida em piruvato através da via glicolítica. Posteriormente, o piruvato é transformado em acetil-CoA, que é usado como substrato na mitocôndria, para gerar energia química, na forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP). A ATP é constituída por uma ribose ligada à adenina e três grupos fosfato em série, sendo, portanto, um nucleotídeo de RNA. Por esta razão, a glicose é considerada uma precursora versátil, pois além de ser um excelente combustível energético, é capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos nas reações biossintéticas celulares (GRIMM et al., 2014).

O metabolismo da glicose pode ser dividido em três etapas: **1ª- Via Glicolítica (Glicólise)**, **2ª- Ciclo de Krebs (Ciclo do Ácido Tricarboxílico- TCA)** e **3ª - Fosforilação Oxidativa (OXPHOS-Cadeia Respiratória Mitocondrial)**. A ativação dessas vias depende do tipo de célula, da disponibilidade e necessidade de nutrientes, da disponibilidade de oxigênio, da demanda energética e de outras moléculas participantes do processo (HEIDEN et al., 2009)

1.2.1. A VIA GLICOLÍTICA

A via glicolítica é o primeiro estágio do metabolismo e representa a via central de catabolismo de carboidratos. Está presente em todos os tipos de tecidos, sendo considerada a rota com o maior fluxo de carbono na maioria das células para geração de ATP. A quebra glicolítica de glicose é a única fonte de energia metabólica em alguns tecidos de mamíferos e tipos celulares como nas hemácias (DEBERARDINIS et al., 2008). Considerada uma via metabólica muito rápida, devido ao seu curto tempo de vida e baixas concentrações dos intermediários, levou a uma dificuldade inicial na sua determinação (BERG et al., 2014).

Esta via consiste em um processo anaeróbico (**glicólise anaeróbica**) e é representada por uma sequência metabólica composta por um conjunto de dez reações catalisadas por enzimas livres no citosol. Nesta via, uma molécula de glicose é metabolizada produzindo um saldo de duas moléculas de ATP, duas moléculas de piruvato (constituído por três carbonos em cada molécula) e diversas outras moléculas conhecidas como “blocos de construção” que são essenciais para a produção de RNA, DNA, lactose, triglicerídeos e lipídeos (SANDULACHE & MYERS, 2012; BERG et al., 2014).

Na maioria das células humanas normais, na presença de oxigênio (O₂), ou seja, em condições de normóxia, a molécula de piruvato resultante da glicólise, segue a rota do **TCA** resultando na formação de Acetil-CoA, o qual seguirá a rota **OXPHOS** (DEBERARDINIS et al., 2008; HEIDEN et al., 2009; CAIRNS et al., 2011; SANDULACHE & MYERS, 2012).

Nessa sequência de vias metabólicas tradicionais que incluem a **glicólise**, **TCA** e a **OXPHOS**, as células normais maximizam a produção de energia de um suprimento limitado de nutrientes através da combinação dessas vias. A partir dessa sequência de reações metabólicas, ocorrerá a conversão completa e eficiente de

uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$) em molécula de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), maximizando a produção de ATP e reduzindo o potencial em a forma de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) (HEIDEN et al., 2009; CAIRNS et al., 2011; DEBERARDINIS et al., 2008; BERG et al., 2014).

Em condições de hipóxia, na **glicólise anaeróbica**, o **piruvato é convertido** pela enzima lactato-desidrogenase (LDHA), no citosol da célula, a **lactato**, processo conhecido como **fermentação láctica**. Este processo é considerado um artifício metabólico de curto prazo, que é ativado quando o organismo é submetido a um intenso esforço físico em condições de baixa oxigenação muscular. Neste caso, as células musculares estriadas realizam a glicólise anaeróbica de forma alternativa, pois não têm o receptor final da cadeia de transporte de elétrons e dependem principalmente deste processo, para obtenção de ATP. O lactato produzido na reação é exportado para o meio extracelular, levando ao aumento da acidose tecidual e o saldo energético de ATP é bastante reduzido (BERG et al., 2014; LIBERTI et al., 2016; AMORIM et al., 2018).

De acordo com Pasteur, tanto a velocidade da glicólise anaeróbia, quanto a quantidade total de glicose por ela consumida eram muitas vezes maiores em condições anaeróbicas do que sob condições aeróbicas. O chamado **efeito Pasteur** ocorre porque o rendimento em ATP da glicólise, sob condições anaeróbicas (2 ATP por molécula de glicose) é muito menor do que a obtida na oxidação completa (OXPHOS) da glicose até o CO_2 e H_2O , sob condições aeróbicas (36 a 38 ATP por molécula de glicose). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, é necessário consumir muito mais glicose em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas (CHAUDHARY et al., 2015).

Desta forma, a definição pela via parcial ou total do metabolismo da glicose, dependerá da presença de oxigênio e do quão rápido a célula precisa de energia.

Assim, se o organismo não necessitar de energia de forma urgente, as vias podem ser "desativadas", para que haja economia de energia. Os princípios termodinâmicos e os tipos de mecanismos regulatórios que governam a glicólise são comuns a todas as rotas de metabolismo celular. O estudo da glicólise pode, portanto, servir como modelo para muitos aspectos das rotas metabólicas (DEBERARDINIS et al., 2008; BERG et al., 2014).

1.2.2 ALTERAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR: UMA DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DO CÂNCER

Em organismos multicelulares, a maioria das células normais é exposta a um fornecimento constante de variados nutrientes e dispõe de sistemas de regulação para prevenção da proliferação exacerbada de células, assim como para situações em que a disponibilidade de nutrientes excede os níveis necessários para a divisão celular (GRIMM et al., 2014).

No entanto, as células oncogênicas apresentam uma alteração significativa nas vias de sinalização de oncogenes e GST e no funcionamento das suas vias metabólicas (SANDULACHE & MYERS, 2012; LI et al., 2017; ZHONG & ZHOU, 2017; CHEN et al., 2018; CHEN et al., 2019; YANG et al., 2019). Enquanto as células normais obtêm energia, na presença do oxigênio, a partir de uma combinação de nutrientes e de suas vias metabólicas como a glicolítica, TCA e OXPHOS, foi observado que as células tumorais, apresentavam uma preferência por um nutriente e uma via metabólica (DEBERARDINIS et al., 2008; HEIDEN et al., 2009; CAIRNS et al., 2011).

1.2.3 EFEITO WARBURG: METABOLISMO DA GLICOSE AERÓBICA NAS CÉLULAS ONCOGÊNICAS

O médico e bioquímico alemão, Otto Heinrich Warburg, em 1926, constatou, pela primeira vez, que as células neoplásicas apresentavam um metabolismo distinto das células normais (CAIRNS et al., 2011; SANDULACHE & MYERS, 2012; DEBERARDINIS et al., 2008; LIBERTI et al., 2016). Este pesquisador observou que as células neoplásicas utilizavam, preferencialmente, a **glicose e de forma independente de oxigênio, mesmo na sua presença**; produzindo grandes quantidades de lactato e outros produtos do metabolismo anaeróbico. Por esta razão, referiu-se a esse metabolismo como **glicólise aeróbica (Figura 3C)** (HEIDEN et al., 2009).

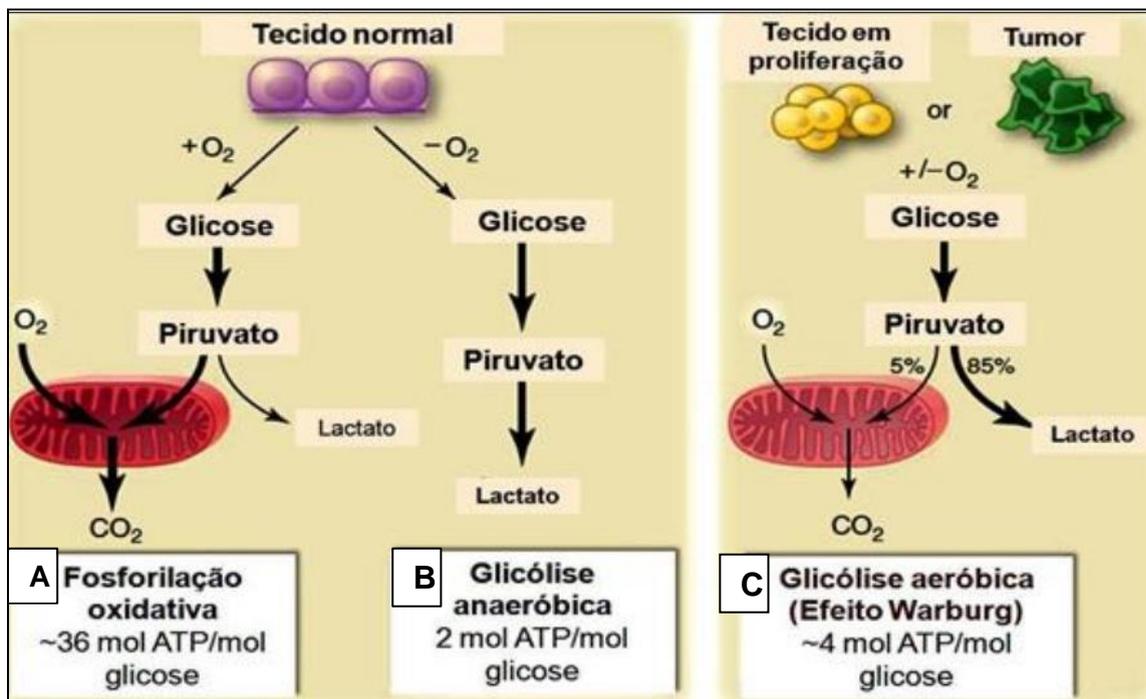


Figura 3. Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa (A), glicólise anaeróbica (B) e glicólise aeróbica (Efeito de Warburg) (C). Fonte: Adaptado de HEIDEN *et al.* (2009).

Warburg observou que a glicólise aeróbica era capaz de produzir energia rápida para suportar altas taxas de crescimento e proliferação dos tumores, por isto,

esta descoberta ficou conhecida como “**Efeito Warburg**”, abrindo novos caminhos para a pesquisa nos campos do metabolismo e respiração celular (WARBURG, 1956). Enquanto que na glicólise aeróbica (Efeito de Warburg) são obtidas apenas 4 moléculas de ATP (**Figura 3C**), na fosforilação oxidativa há uma produção muito maior, de 36 moléculas de ATP (**Figura 3A**). Portanto, para a produção da mesma quantidade de ATP, as células tumorais deveriam consumir 9 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas (HEIDEN et al., 2009).

Posteriormente, na tentativa de explicar esses resultados, Warburg hipotetizou que as células tumorais teriam um defeito nas mitocôndrias, no entanto, esta hipótese foi descartada por outros autores, que demonstraram que a maioria das células tumorais podiam realizar fosforilação oxidativa mesmo com inibição glicolítica, sugerindo a existência de outra explicação para a preferência da glicólise aeróbica nestas células (GATENBY & GILLIES, 2004; HSU & SABATINI, 2008; CAIRNS et al., 2011).

Uma possível explicação para a utilização da glicólise aeróbia, nestas células, seria a importância da rápida produção dos metabólitos intermediários produzidos na via glicolítica, para guiar as demais vias metabólicas que deveriam ser ativadas em seguida (SANDULACHE & MYERS, 2012). A partir desta hipótese, foi possível entender o porquê, apesar de metabolismo aeróbico gerar mais ATP, contraria as necessidades para uma proliferação rápida das células tumorais. Isso explica em parte, os achados de Warburg, em que mesmo na presença de oxigênio, uma célula oncogênica metaboliza a glicose até piruvato (glicólise aeróbica) e simultaneamente o converte em ácido láctico (metabolismo anaeróbico) (DEBERARDINI et al., 2008; LI et al., 2017; CHEN et al., 2018).

Pesquisadores relataram que a velocidade de crescimento dos tumores resulta no aumento exacerbado da exigência de glicólise aeróbica (SANDULACHE

& MYERS, 2012; LI et al., 2017; ZHONG & ZHOU, 2017; CHEN et al., 2018; CHEN et al., 2019; YANG et al., 2019). Ainda nesse sentido, HEIDEN et al. (2009) mostraram que é mais rápido e eficaz utilizar o metabolismo anaeróbico do que o aeróbico considerando o tempo necessário para a formação de ATP e biomassa, a partir de uma molécula de glicose.

Além disso, também foi observado, que o aumento da agressividade tumoral e a diminuição da eficácia de alguns tratamentos têm sido relacionados a baixos níveis de oxigênio. Recentes estudos indicam que os tumores hipóxicos que apresentavam aumento do nível de glicólise, parecem ser mais metastáticos em comparação aos tumores normóxicos. Portanto, o aumento da glicólise é um fenótipo metabólico de prognóstico ruim e metastático em cânceres (SANDULACHE & MYERS, 2012; ZHONG & ZHOU, 2017; ECKERT et al., 2020).

Experimentos realizados em linhagens de células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) contendo mutações mitocondriais, sugeriram que existe um nível de coordenação entre a atividade mitocondrial, regulação negativa da atividade do piruvato desidrogenase quinase -1 (PDK-1) e o acúmulo do fator induzível por hipóxia 1alfa (HIF-1 α). Esse ambiente de hipóxia em células tumorais é resultado de uma vascularização incompatível com a velocidade de proliferação estabelecida pelo processo de formação do tumor e exigiria, que as células ali presentes, dependessem da glicólise (LI et al., 2017; PELTANOVA et al., 2019). De acordo com o “efeito Pasteur”, o oxigênio suprime a glicólise em células normóxicas e ativa a OXPHOS e permite que a mitocôndria oxide o piruvato em CO₂ e H₂O (CHAUDHARY et al., 2015).

Nos últimos anos, embora o Efeito Warburg tenha sido extensivamente estudado, como visto em inúmeras publicações sobre o tema, mesmo assim, ainda existem muitos mecanismos adaptativos relacionados ao metabolismo que ainda

não foram suficientemente esclarecidos (DEBERARDINIS et al., 2008; LI et al., 2017; CHEN et al., 2018).

Como as alterações do metabolismo são consideradas uma característica marcante das células neoplásicas (SANDULACHE & MYERS, 2012; SHANG et al., 2016; FU et al., 2017), avanços se fazem necessários na compreensão da influência de diferentes vias metabólicas na sobrevivência, proliferação e agressividade das células oncogênicas (LI et al., 2017; ZHONG & ZHOU, 2017; CHEN et al., 2018; YANG et al., 2019; PELTANOVA et al., 2019), em especial as alterações metabólicas que dão suporte ao processo tumoral na transição epitélio-mesênquima do CCEO.

1.2.4 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA E A INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL

Uma forte ideia para explicar o efeito de Warburg é que a reprogramação metabólica das células tumorais confere uma vantagem seletiva para a sobrevivência e a proliferação no microambiente tumoral (PELTANOVA et al., 2019). O microambiente tumoral (**Figura 4**) tem um papel fundamental na carcinogênese; e a matriz extracelular (ECM) atua como um repositório dinâmico para uma infinidade de fatores que modulam esse microambiente e promovem a alteração do metabolismo das células-tronco cancerosas (SCCs). As interações entre as SCCs em torno das células estromais, especialmente dos fibroblastos associados ao câncer (CAFs), afetam altamente o crescimento, o metabolismo, metástase e progressão do carcinoma (MARKWELL & WEED, 2015; NALLANTHIGA et al., 2019).

Estudos demonstram que os CAFs facilitam a progressão da doença por meio de eventos epigenéticos, devido a sua sinalização intrínseca desregulada, bem como influencia a remodelação da ECM, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), estado imunológico e estado metabólico (MARKWELL & WEED,

2015). Outros autores relatam que devido a diversidade de tumores e seus microambientes, é possível que, com base na disponibilidade de nutrientes, as SCCs possam manipular seu metabolismo. Isto é enquanto as SCCs em um microambiente hipóxico podem sobreviver por meio da glicólise, as SCCs em um ambiente normóxico usam o metabolismo oxidativo. Além disso, as SCCs podem utilizar metabólitos secretados por CAFs, como lactato e corpos cetônicos, para alimentar OXPHOS (NALLANTHIGHA et al., 2019).

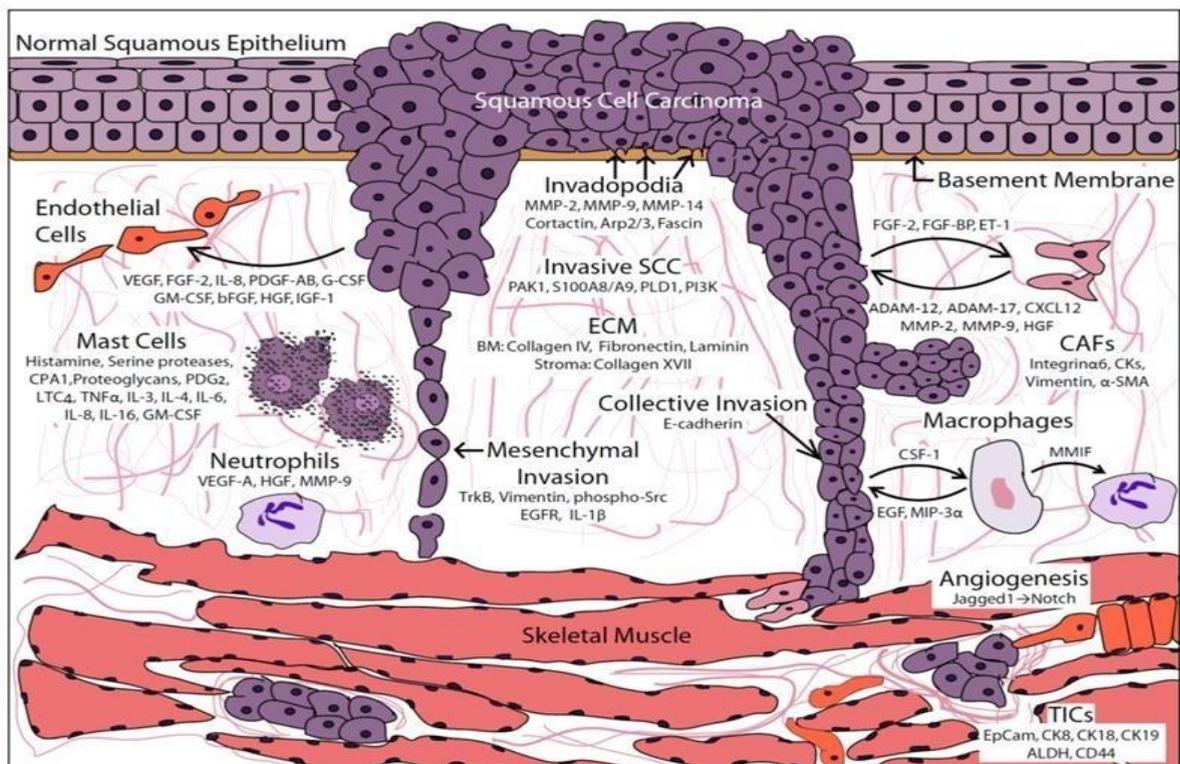


Figura 4. Esquema representando o microambiente tumoral e as contribuições baseadas na matriz extracelular (ECM) que dão suporte ao processo de transição epitélio-mesênquima e invasão do carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Uma massa de células-tronco cancerosas (SCCs) invasivas de CCEO invade o estroma circundante e o tecido muscular da língua oral. As interações entre as SCCs em torno das células estromais e dos fibroblastos associados ao câncer (CAF) afetam altamente o crescimento, o metabolismo, metástase e progressão do carcinoma. Fonte: MARKWELL & WEED (2015).

Foi observado um aumento na síntese de HIF-1 α e de lactato para atender a demanda tumoral de energia e blocos de construção para o seu crescimento

(KONDAVEETI et al., 2015, CHEN et al., 2018). À medida que o tumor se desenvolve, excede os limites de difusão do suprimento sanguíneo local, resultando em hipóxia e estabilização de HIF -1 α , e esta por sua vez, estimula a angiogênese regulando vários fatores, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Entretanto, os novos vasos sanguíneos formados no microambiente tumoral são desorganizados e, portanto, não reduzem a hipóxia. Os níveis de oxigênio em um tumor podem variar tanto espacialmente como temporariamente, e os ciclos resultantes de níveis flutuantes de oxigênio podem então, ser selecionados para tumores que regulam formalmente a glicólise (ECKERT et al., 2020).

É interessante observar que o HIF está sempre relacionado ao nível de oxigênio, como evidenciado pela variação da expressão de HIF no microambiente tumoral, com a exceção de tumores que perderam a proteína von Hippel-Lindau (VHL), que normalmente é o mediador da degradação HIF (HSU & SABATINI, 2008).

Portanto, o efeito de Warburg – que é o desligamento da glicólise dos níveis de oxigênio - não pode ser unicamente explicado pelo aumento na regulação do HIF. Outros mecanismos moleculares provavelmente são importantes, como alterações metabólicas induzidas por ativação oncogênica e perda de supressores de tumores (MELLANEN et al., 1994, AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019) Estas mudanças são necessárias para apoiar o fenótipo metabólico alterado nos tumores e para isto, deve ocorrer a integração e coordenação de múltiplas vias intracelulares relativas ao ciclo celular, parada e morte celular programada (LIBERTI & LOCASALE, 2016; TRAN et al., 2016).

Estudos mais recentes mostraram que os principais componentes do efeito Warburg - aumento da absorção de glicose, diminuição da fosforilação oxidativa e produção associada de lactato - também são características da

A mutação de p53 altera a expressão do gene que codifica SCO2 (a síntese da proteína citocromo c oxidase), interferindo no funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial. Um segundo efetor de p53, inibe a glicólise através da diminuição dos níveis de fructose-2,6-bisfosfato (um potente estimulador da glicólise e inibidor da gliconeogênese). Além disso, a regulação do metabolismo não é exclusiva dos genes supressores de tumores. A molécula de sinalização Ras promove a glicólise, enquanto o fator de transcrição Myc regula a expressão de vários genes metabólicos. A AKT kinase, um efetor da sinalização de insulina, está retomando seu papel na captação e utilização de glicose no contexto do câncer (HSU & SABATINI, 2008). A via canônica PI3K/AKT, ativada por fatores de crescimento, funciona como um “braço” importante no metabolismo celular e pode representar uma via chave de ativação da tumorigênese, por promover o aumento da expressão de diversas proteínas envolvidas na via glicolítica (HEIDEN et al., 2009).

1.3 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA GLICOLÍTICA DAS CÉLULAS TUMORAIS

O aumento na captação de glicose pelas células neoplásicas, que ocorre para compensar o baixo rendimento de ATP via glicólise, está relacionado com a alteração na expressão de proteínas envolvidas na via glicolítica. Esta captação da glicose é regulada pelo **transportador de glicose (GLUT)**, em especial o **transportador de glicose tipo 1 (GLUT1)**. O aumento da expressão de GLUT1 nas células, depende de uma cascata de eventos bioquímicos e sinalização de proteínas. Dentre elas, destaca-se o **receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R)** que leva à fosforilação das

proteínas oncogênicas: **Ras**, **PI3K** e **AKT**, promovendo diversas atividades celulares como proliferação, diferenciação, migração, invasão, (BOHULA et al., 2003; POLLAK, 2008) e aumento da via glicolítica (WANG et al., 2001; RUDLOWSKI et al., 2003 e OLIVER et al., 2003), como ilustrado na **Figura 6**.

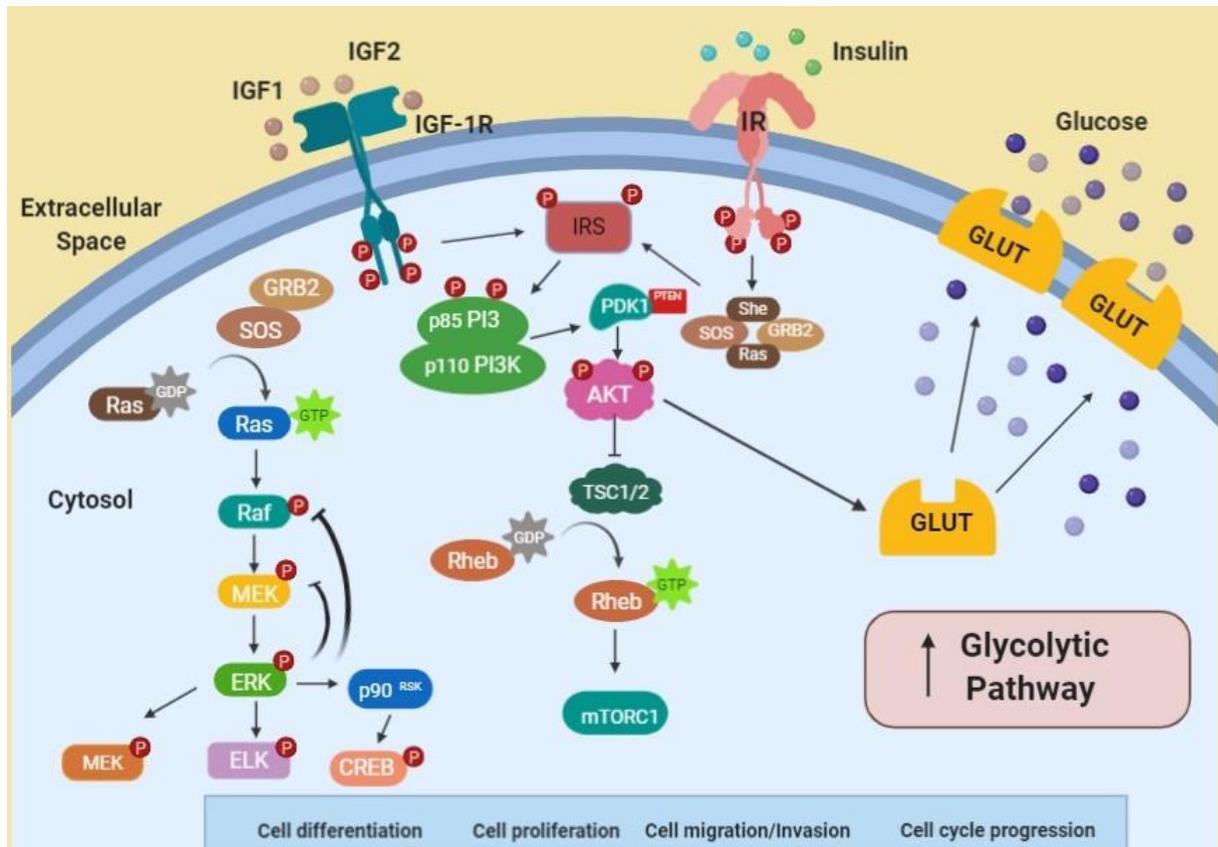


Figura 6 Transdução do sinal do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e superativação da via glicolítica. O sinal transmitido pelo IGF1R ativa a via PI3K/AKT a qual eleva a expressão dos transportadores de glicose tipo 1 (GLUT1), aumentando a captação de glicose pelas células neoplásicas. IGF-1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*, IR: *insulin receptor*, IRS: *insulin receptor substrate* PI3K: *phosphatidylinositol 3 kinase*; AKT: *serine/threonine kinase*; GLUT1: *glucose transporter 1*, GDP: *guanosine diphosphate*; GTP: *guanosine triphosphate*; MEK: *mitogen extracellular Regulated Kinase*; PDK: *phosphoinositide-dependent kinase*; ERK: *Extracellular-signal Regulated Kinase*; PI: *phosphatidylinositol*; ELK: *ETS Like protein*; PTEN: *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*; SHC: *Src homology collagen*; SHP: *Src homology phosphatase*; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; SOS 1: *son of sevenless 1*; RAF: *murine sarcoma viral oncogene homolog*; RAS: *rat sarcoma viral oncogene homolog*; p85 e p110: *subunidades 85 e 110 da phosphatidylinositol 3 kinase* MAPK: *Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase*. Fonte: Giovannetti-Menezes (2020).

1.3.1 RECEPTOR DE FATOR CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1 (IGF1R)

O **IGF-1R** é uma glicoproteína transmembrânica e tem seu principal papel na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular, enquanto o **receptor de insulina (IR)** confere preferencialmente sinalização que mantém a homeostase metabólica (NAKAE et al., 2001).

O **IGF-1R** se liga ao **IGF-1** (com maior afinidade) e ao **IGF-2** e ao hormônio **insulina** (com menor afinidade). É estruturalmente, semelhante ao **receptor de insulina (IR)** com aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos. Ambos são receptores tirosina-quinase compostos de duas subunidades α extracelulares, contendo um sítio de ligação ao ligante e duas subunidades β intracelulares com atividade tirosina-quinase intrínseca, (NAKAE et al., 2001), como ilustrado na **Figura 6**.

A principal proteína ativada pelo IGF-1R é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1, *insulin receptor substrate 1*), uma fosfoproteína hidrofílica que recruta e regula a atividade de outras proteínas intracelulares. A IRS-1 funciona como uma molécula adaptadora e ativa cascatas de sinalização associadas a receptores tirosina-quinases (JAIN et al., 1998).

Uma importante via de sinalização do IGF-1R é a via PI3Kinase que ocorre por ativação da proteína fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), responsável pelos principais efeitos metabólicos estimulados pelas IGFs, como a sinalização para a AKT (*serine/threonine kinase 1*) para que estimule o deslocamento das proteínas GLUT-1 para a membrana celular, aumentando assim, a captação da glicose pelas células (LIU et al., 2015). Outra via de sinalização do IGF-1R, de grande importância, é a via MAPKinase que ocorre por ativação da proteína quinase ativada por mitógeno

(MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), responsável principalmente pelos efeitos proliferativos das IGFs (JAIN et al. 1998).

O IGF-1R humano é codificado por um único gene (IGF1R, NM_147370) localizado na região distal do braço longo do cromossomo 15, posição 25-26 (15q25- 26) com tamanho de 307 quilobases e organizados em 21 éxons (WARD et al., 2001).

Evidências demonstraram que as células tumorais expressam tanto os IGF-1Rs quanto os IRs (POLLAK,2008). A atividade quinase destes receptores leva à fosforilação de proteínas oncogênicas como Ras, PI3K e AKT, promovendo a proliferação celular e impedindo a apoptose (BOHULA et al., 2003; POLLAK, 2008).

A expressão aberrante de IGF1R pode contribuir para a iniciação e progressão de várias neoplasias. O aumento na expressão de IGF1R em portadores de CCEO foi associada a baixo grau de diferenciação tumoral. Além disso, foi demonstrado que o IGF1R media o crosstalk entre as vias IRS2/AKT e MAPK, promovendo a proliferação celular. Além disso, a hipoexpressão de let-7, um miRNA capaz de inibir IGF1R e IRS2, também foi confirmada nas linhagens de CCEO (GAO et al., 2014).

Experimentos com transfecção de let-7 *in vitro* e *in vivo* demonstraram que este miRNA é capaz de reduzir o crescimento do CCEO através da inibição de IGF1R e de IRS (Gao et al., 2014). Demonstrou-se também que em linhagens de CCEO, a ativação de IGF1R se associa à quimiorresistência, o que faz desta molécula, um alvo importante para a terapia do CCEO (JAMESON et al., 2013).

Desta forma, as vias metabólicas ativas nas células tumorais em proliferação são diretamente controladas pelas vias de sinalização **IGF-1R e IR >PI3K->AKT** envolvendo oncogenes e genes supressores de tumores

conhecidos.

1.3.2 PROTEÍNA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE (PI3K)

As proteínas fosfatidilinositol-3-quinase (PI3Ks) são uma família de enzimas que desempenham um papel importante no câncer humano, pois estão envolvidas na ativação da cascata de sinalização intracelular da AKT, atuando na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina e IGF1R (LEE et al., 2005; YU et al., 2017).

A **PI3K** é uma enzima dimérica, constituída por uma subunidade reguladora e uma subunidade catalítica. A subunidade catalítica ocorre em quatro subunidades designadas como p110 α , p110 β , p110 γ e p110 δ . A subunidade δ é um componente chave de transdução de sinal para células B normais e malignas e também importante para a homeostase e função das células reguladoras T (*Treg*), tornando-o um alvo promissor para o tratamento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos. A subunidade catalítica p110 α , executa a ação da PI3K (LEE et al., 2005).

O **gene PIK3CA**, localizado no cromossomo 3, na posição 3q26.32, codifica subunidade catalítica p110 α . Esta subunidade sofre mutações frequentes em cânceres, incluindo carcinoma da mama, próstata, cólon e endométrio e oral. Oitenta por cento dessas mutações são representadas por uma das três substituições de aminoácidos nos domínios helicoidal ou quinase da enzima. Autores demonstraram que o mutante p110 α demonstra um ganho de função na atividade enzimática e de sinalização e mostrou ser oncogênico tanto em cultura de células como em modelos animais (ZHAO & VOGT, 2008; CHAI et al., 2019).

PIK3CA é um dos poucos oncogenes que é considerado

significativamente mutado no CCEO, onde as mutações são encontradas de 6–20% no CCEO e em 6 a 33% dos não-CCEO CCECP (CHAI et al., 2019).

Como outras quinases, o PI3K adiciona um grupo fosfato a outras proteínas através de um processo chamado fosforilação. O PI3K fosforila moléculas de sinalização, o que desencadeia uma série de reações adicionais que transmitem sinais químicos dentro das células. A sinalização de PI3K é importante para muitas atividades celulares, incluindo crescimento e divisão celular, migração de células, produção de novas proteínas, transporte de materiais dentro das células e sobrevivência celular. Estudos sugerem que a sinalização PI3K pode estar envolvida na regulação de vários hormônios e pode desempenhar um papel importante na maturação dos adipócitos (LEE et al., 2005).

Alguns autores avaliaram a via de sinalização PI3K/AKT no CCEO (YU et al., 2017; CHAI et al., 2019). Um grupo de pesquisadores utilizou células derivadas de pacientes com CCEO e uma linhagem celular resistente à radiação in vitro e in vivo com o propósito de avaliar os efeitos antitumorais e entender os mecanismos na regulação de radiosensibilização na via dupla de sinalização PI3K/mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*). Os resultados indicaram que a ativação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR possui um papel de radorresistência ao CCEO. Os autores demonstraram que um inibidor de PI3K / mTOR combinado com radiação exibe inibição sinérgica do eixo AKT / mTOR e induz a parada do ciclo celular. Além disso, os autores relataram que medicamentos direcionados à via de sinalização PI3K/AKT/mTOR devem ser a nova droga terapêutica candidata à radiosensibilização em radioterapia (YU et al., 2017).

1.3.3 PROTEÍNA QUINASE SERINA/TREONINA AKT (AKT)

A proteína quinase AKT específica de serina/treonina é encontrada em vários tipos celulares e desempenha um papel crítico em muitas vias de sinalização (CARPTEN et al., 2007). A AKT medeia a maioria das ações metabólicas da insulina através da fosforilação de vários substratos, incluindo outras quinases, sinalizando proteínas e fatores de transcrição (MIRRA et al., 2018). Sua forma ativa ajuda a regular o crescimento, a divisão, a diferenciação celular, bem como induz “um sinal de sobrevivência” para a proteção das células contra a apoptose (EMAMIAN et al., 2004).

A ligação de PI3K a proteínas com um domínio PH, como a quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK1), é responsável pela ativação da AKT. Por sua vez, a via de sinalização PI3K/AKT é responsável pela mediação dos efeitos metabólicos da insulina/ IGF-1, uma vez que é capaz de induzir a captação de glicose através da translocação do transportador de glicose 1 (GLUT1) do plasma para a membrana das células (MIRRA et al., 2018).

A proteína AKT é codificada pelo gene AKT1, localizado no cromossomo 14 na posição 14q32.33. Este gene pertence a uma classe dos oncogenes, que quando mutados, têm o potencial de fazer com que as células normais se transformem em células oncogênicas. Em um estudo que objetivou identificar oncogenes críticos para o desenvolvimento e progressão do CCEO, o AKT1 foi o único gene identificado que foi expresso em todos os tecidos de CCEO de células cultivadas, mas não em tecidos e células não-neoplásicas. Além disso, a análise imuno-histoquímica de CCEOs primários mostrou a expressão da proteína AKT em 59 de 63 (94%) dos tumores (NAKASHIRO et al., 2015).

Em um estudo de coorte, envolvendo 52 pacientes com CCEO de língua, a superexpressão de AKT foi associada a uma menor sobrevida, de forma

independente da classificação e status nodal. Em outros dois estudos de coortes, envolvendo 849 e 1918 pacientes, a superexpressão de AKT foi associada a uma sobrevida global menor (IBRAHIM et al., 2018).

1.3.4 PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE GLICOSE (GLUT)

Para que a molécula de glicose seja metabolizada através da via glicolítica, ela precisa atravessar a membrana plasmática das células, passando do meio extracelular para o meio intracelular. Devido ao seu alto peso molecular e por ser uma molécula hidrofílica, a glicose não consegue se difundir através dos poros da membrana. (BROWN, 2000; MEDINA & OWEN, 2002; SCHEEPERS et al., 2004; KUNKEL et al., 2003). Para que ocorra o processo de passagem da glicose para o meio intracelular, duas classes diferentes de proteínas transportadoras realizam diferentes mecanismos de transporte, o passivo e o ativo, como ilustrado na **Figura 7** (BROWN, 2000; SCHEEPERS et al., 2004; ZHAO & KEATING, 2007).

O **transporte ativo da glicose** através da membrana celular é realizado contra o gradiente de concentração do meio, por meio da bomba de sódio e potássio. Este transporte ativo é realizado pela família de proteínas co-transportadoras dependentes de sódio (**SGLTs**) e está presente na parte apical das células intestinais e nas células do túbulo renal proximal. Tem a função de captar a glicose da dieta para levar à corrente sanguínea e prevenir a perda urinária da glicose (MEDINA & OWEN, 2002; SCHEEPERS et al., 2004; ZHAO & KEATING, 2007). Neste transporte, o gradiente de concentração do íon sódio é mantido pela bomba de sódio potássio, com gasto de ATP e independe da influência da insulina (BROWN, 2000; SCHEEPERS et al., 2004).

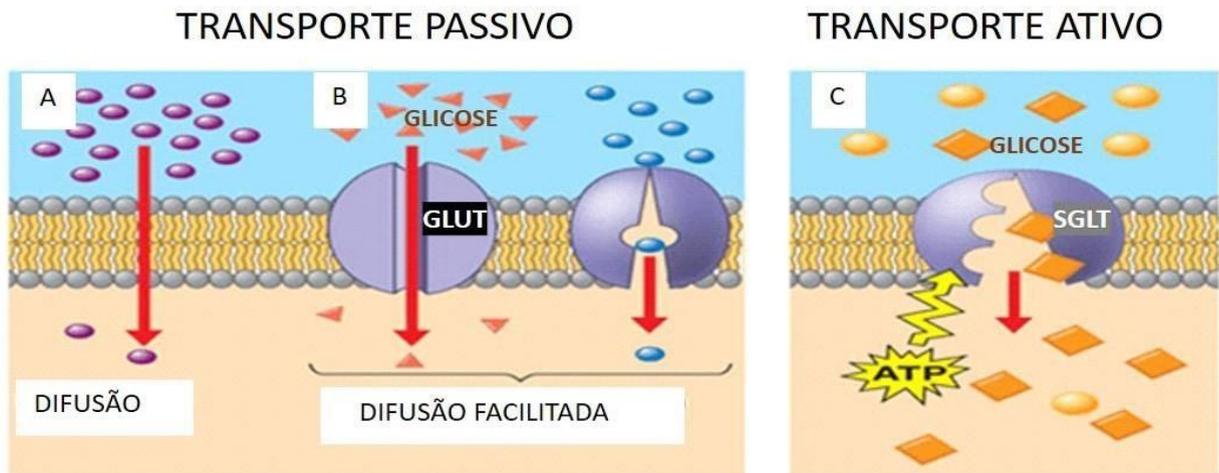


Figura 7. Mecanismos de transporte da glicose para as células: Transporte Passivo e Transporte Ativo. (A) Transporte passivo por Difusão: Moléculas de baixo peso conseguem atravessar a membrana plasmática das células, passando do meio mais concentrado para o meio menos concentrado. (B) Transporte passivo por Difusão Facilitada: O transporte da molécula de glicose é mediado pela proteína transportadora de glicose (GLUT), a favor do gradiente de concentração do meio. (C) Transporte Ativo: O transporte da molécula de glicose é realizado pela proteína co-transportadora dependente de sódio (SGLT), contra o gradiente de concentração e com gasto de ATP. (b) Fonte: Adaptado de <https://readbiology.com/difference-between-active-and-passive-cell-transport/>.

Já o **transporte passivo da glicose** é realizado a favor do gradiente de concentração, de uma área de maior concentração da glicose para uma área de menor concentração e sem gasto de energia. Esta difusão facilitada da glicose é mediada pela proteína transportadora de glicose (GLUT) (BROWN, 2000; MEDINA & OWEN, 2002; SCHEEPERS et al., 2004; KUNKEL et al., 2003). Isto somente é possível devido às propriedades especiais da ligação da proteína GLUT à membrana plasmática (MEDINA & OWEN, 2002; SCHEEPERS et al., 2004; ZHAO & KEATING, 2007).

As **GLUTs** pertencem a uma família de proteínas integrais da membrana composta por **14 membros (GLUT1-14)**. Estruturalmente todas as isoformas possuem 12 domínios hidrofóbicos transmembrânicos. Com peso molecular variando entre 50-60 kDa, apresentam um grande domínio extracelular que contém um sítio de glicosilação e permitem o transporte passivo da glicose,

através da membrana plasmática, a favor de seu gradiente de concentração. Elas diferem entre si na expressão tecidual, na função, na seletividade do substrato, nas características cinéticas e apresentam diferentes mecanismos de regulação (WATSON et al., 2004; MACHADO et al., 2006; TEIXEIRA, 2010).

Esses transportadores são classificados em três classes com base na especificidade do substrato e semelhança de sequência: Classe I, que inclui GLUT1- 4 e 14, eles têm alta seletividade para glicose; classe II, compreende GLUT5, 7, 9 e 11, que possuem seletividade para glicose e frutose; e a classe III que inclui GLUT6, 8, 10, 12 e 13 (conhecido como HMIT), com seletividade ainda não caracterizada. Os membros da classe I (GLUT1-4 e 14) são os mais bem compreendidos, pois regulam diretamente a homeostase do açúcar (MUECKLER & THORENS, 2013).

Em relação à localização, o **GLUT1** é expresso na maioria dos tipos celulares, já GLUT2 está localizado no intestino delgado, fígado e pâncreas, enquanto o GLUT3 é encontrado principalmente no cérebro. GLUT4 está localizado em vesículas que se fundem com a membrana plasmática em resposta sinalização da insulina (MUECKLER & THORENS, 2013).

Dos 14 membros de GLUT, o primeiro a ser identificado e o mais extensamente estudado foi o **GLUT1** (YAMAMOTO et al., 1990; NISHIOKA et al., 1992; BROWN et al. 1993; MELLANEN et al., 1994; NAGASE et al., 1995; BAER et al., 1997; OGAWA et al., 1997; HABER et al., 1998; W ANG et al., 2001; RUDLOWSKI et al., 2003 e OLIVER et al., 2003; KUNKEL et al., 2007; AYALA et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; YANG et al., 2019).

GLUT1 tem alta afinidade pela glicose e é responsável pela sua captação basal em quase todos os tecidos em condições normais. Nos tecidos fetais é largamente expresso, enquanto nos tecidos adultos tem sua expressão

diminuída. GLUT1 é mais encontrado em células endoteliais, nos eritrócitos e no cérebro. Níveis moderados são encontrados no tecido adiposo, muscular e hepático (WATSON et al., 2004).

Nas células tumorais o GLUT1 é superexpresso, especialmente em estágios avançados e metastáticos. Essa superexpressão foi observada em muitos tipos de cânceres incluindo: cérebro, mama, cervical, colorretal, endométrio; bexiga; pulmão; cabeça e pescoço e oral (YAMAMOTO et al., 1990; NISHIOKA et al., 1992; BROWN et al. 1993; MELLANEN et al., 1994; NAGASE et al., 1995; BAER et al., 1997; OGAWA et al., 1997; HABER et al., 1998; WANG et al., 2001; RUDLOWSKI et al., 2003 e OLIVER et al., 2003; KUNKEL et al., 2007; AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019).

Além disso, a positividade de GLUT1 em células neoplásicas, revelada por imuno-histoquímica, indica aumento da atividade proliferativa, necessidade de energia e comportamento agressivo. Por outro lado, segundo CARVALHO et al. (2011) a imuno-histoquímica mostrou que a expressão de GLUT1 está ausente em certos cânceres humanos.

No CCEO, estudos demonstraram que o aumento da atividade glicolítica estava relacionado à hiperexpressão de GLUT1 (AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019), além de estar associada a um pior prognóstico e radiorresistência (KUNKEL et al., 2007).

Em um outro estudo que avaliou o CCEO em pacientes fumantes e não-fumantes, a expressão de GLUT1 estava significativamente correlacionada com o grau histológico, com o estadiamento TNM e a dependência do tabaco (AZAD et al., 2016).

O gene SLC2A1 que codifica GLUT1 está localizado no cromossomo 1 na posição 1p35-p31.3. A expressão deste gene é supra regulada por uma

variedade de agentes e condições como: fatores de crescimento, transformação oncogênica, ionóforos de cálcio, hormônio da tireóide, estrogênio, glicocorticoides, em resposta a redução da concentração externa de glicose, hipóxia e inibição da OXPHOS (KLEPPER & VOIT, 2002).

GLUT1 pode ser regulado positivamente de forma direta pelo oncogene *Myc* e indiretamente pelo "*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*" (KRAS). Além disso, foi observado que a expressão de GLUT1 nas células, pode ser mediada pela sinalização de HIF-1a. Uma correlação entre o nível de expressão de GLUT1, HIF-1 e enzimas glicolíticas foi observada em muitas neoplasias (MOLDOGAZIEVA et al., 2020).

GLUT1 é o transportador de glicose mais frequentemente associado ao CCECP, mas segundo alguns autores, não é o único membro da família GLUT que pode contribuir para sua patogênese e / ou progressão (BAER et al., 2002). GLUT3 é outro importante transportador de glicose com alta afinidade e capacidade de transporte, que é essencial, especialmente, em tumores com alta necessidade de glicose (MOLDOGAZIEVA et al., 2020).

Em um estudo de 48 casos de CCECP da laringe, os autores descobriram que, embora todas as amostras expressassem casos positivos de GLUT-1, elas também expressavam a GLUT-3. Neste estudo, estas proteínas estavam associadas a tumores pouco diferenciados e com pior sobrevida (BAER et al., 2002).

Dados mostraram que a superexpressão de GLUT-1 e GLUT-3 no CCEO, foi associada à radiorresistência (KUNKEL et al., 2007). No CCEO de língua, a superexpressão do GLUT3 se correlacionou com o aumento da profundidade da invasão tumoral, maior tamanho do tumor, estágio patológico avançado e recorrência (ESTILO et al., 2009).

Uma avaliação da expressão de GLUT1 e GLUT3 em 143 amostras de CCEO demonstrou GLUT1 expresso em 50,3% dos casos analisados e com associação significativa com o consumo de álcool. Já GLUT3 estava presente em 21,1% destas amostras, relacionando-se com o estágio avançado das mesmas (AYALA et al., 2010).

Em linhagens de células tumorais foi encontrada a superexpressão dos transportadores de glicose de alta afinidade (GLUT1 e GLUT3). Estudos mostraram que a inibição desses transportadores impediu o crescimento de células tumorais in vitro. Em linhagem de células HeLa foi demonstrado que o transporte de glicose pode ser efetivamente a etapa de controle da taxa de glicólise e, portanto, pode ser um alvo importante para agentes antitumorais farmacológicos (DIAZ-RUIZ et al., 2011).

Estudos mais recentes, como de MOLDOGAZIEVA et al. (2020) mostrou que GLUT7 e GLUT9 possuem alta afinidade para glicose e frutose, no entanto, há no momento, poucas evidências de expressão destes transportadores em neoplasias e que a eficácia da captação de glicose pelas células cancerosas depende principalmente das atividades de GLUT1 e GLUT3 e, em menor grau, GLUT4 e GLUT10.

Até o momento, a maioria dos estudos avaliou o aumento da expressão de GLUT1 em células tumorais de CCEO (KUNKEL et al., 2007; AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019) e a sua hiperexpressão foi associada a um pior prognóstico e radiorresistência (KUNKEL et al., 2007).

A positividade de GLUT1, revelada por imuno-histoquímica foi correlacionada a um aumento da atividade proliferativa, necessidades de energia e comportamento agressivo nas células tumorais (BIRNBAUM et al., 1986; FUKUMOTO et al., 1988).

Desta forma, dentre os 14 tipos de GLUT, nosso grupo optou pela avaliação da expressão de GLUT1 neste trabalho, uma vez que a maioria dos estudos de CCEO reportou a expressão de GLUT1 sendo mais significativa (KUNKEL et al., 2007; AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019), especialmente quando comparada com a expressão de GLUT3 (AYALA et al., 2010).

1.4 A AVALIAÇÃO DO METABOLISMO TUMORAL ALTERADO ATRAVÉS DO MÉTODO DE PET-SCAN E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GLUT NAS CÉLULAS TUMORAIS

Atualmente, o metabolismo tumoral alterado na via glicolítica, o “Efeito Warburg”, não é apenas reconhecido como uma “marca registrada do câncer”, mas também serviu de base científica para o desenvolvimento do método de escaneamento “¹⁸F-FDG PET-SCAN” [tomografia por emissão de pósitrons (Pet) com 18-flúor, 2 deoxiglicose (FDG)], conhecido como FDG-PET ou PET-SCAN. Este exame tem aplicação em uma variedade de cânceres e é considerado o padrão-ouro de diagnóstico em medicina nuclear, para o monitoramento da atividade metabólica celular tumoral, podendo fornecer uma melhor visualização da extensão da doença de base do que os métodos usuais de imagem (AK et al., 2000).

Esse método é capaz de avaliar a atividade metabólica e a taxa proliferativa dos tumores e se baseia no uso de 18F-Fluorodeoxiglicose (18F-FDG), um derivado de glicose fluorado, como um marcador radioativo para imagens de sua captação em tecidos in vivo (CARVALHO et al., 2011).

O 18F-FDG é um análogo da glicose que quando fosforilado permanece no interior das células neoplásicas, em razão diretamente proporcional à atividade metabólica celular, permitindo a sua localização topográfica (conforme

ilustrado na **Figura 8 C-D**) e as quantificações absoluta e relativa da atividade glicolítica tecidual (GJEDDE, 1995).

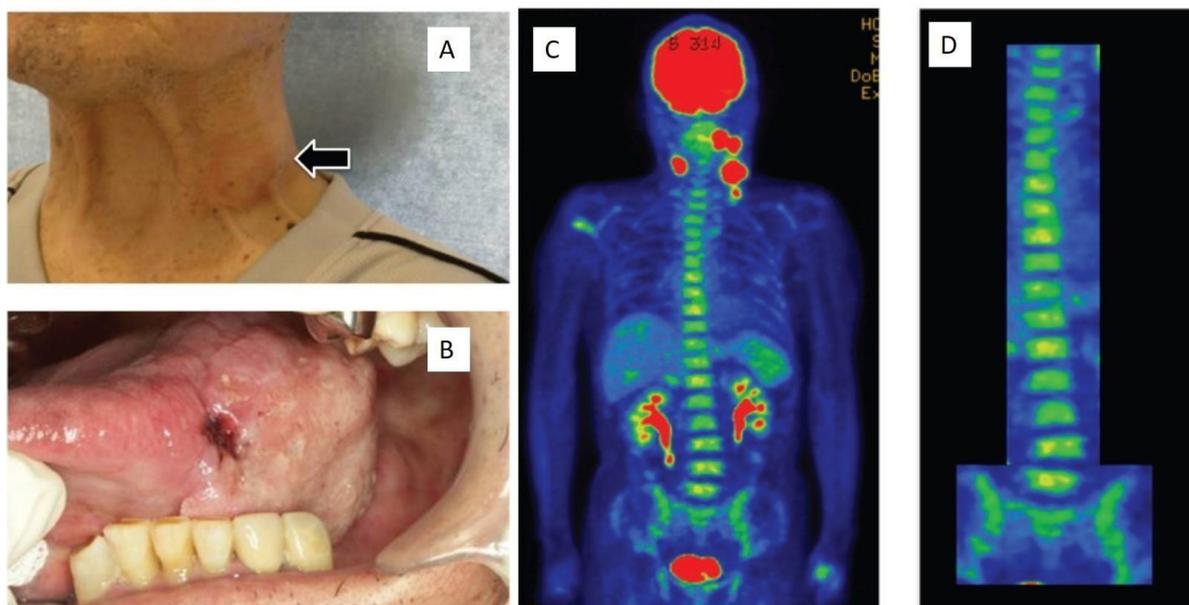


Figura 8. Achados clínicos e de FDG -PET de um paciente de 78 anos com CCEO de língua. (A) Presença de nódulo linfático inchado no lado esquerdo do pescoço. (B) Lesão tumoral na borda lateral esquerda da língua. (C) Alta captação de FDG pelo tumor do lado esquerdo da língua e lesões nodais bilaterais. (D) Captação difusa de FDG pela medula óssea da coluna vertebral. FDG-PET, tomografia por emissão de pósitrons 18F-fluorodeoxiglicose. Fonte: Adaptado de KUROSHIMA *et al.* (2018).

O aumento da captação da 18F-FDG foi associado à superexpressão de GLUT1 em alguns tipos tumorais, (ITO *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 1999; Higashi *et al.*, 2000; MAROM *et al.*, 2001; OLIVER *et al.*, 2004), dentre eles, o CCEO (CARVALHO *et al.*, 2011; KUROSHIMA *et al.*, 2018).

KUNKEL *et al.*, 2007, observaram que a superexpressão de GLUT1 pareceu estar confinada em lesões neoplásicas e em metástases loco-regionais e ausente em lesões de células escamosas benignas.

Uma análise detalhada de GLUT1 em um estudo realizado com 118 pacientes com CCEO, indicou que um baixo índice de coloração para GLUT1 foi correlacionado com sobrevida mediana mais longa em comparação com

pacientes com alto índice (138 meses vs 60 meses) (KUNKEL et al., 2003).

Aparentemente, a expressão de GLUT1 pareceu desempenhar uma função clínica significativa em várias neoplasias. Entretanto, alguns autores não encontraram essa associação (MAROM et al., 2001). Durante o estadiamento clínico, pesquisadores relataram que os resultados falso-positivos estavam associados com processos inflamatórios e hiperplasias dos nódulos linfáticos. Já os resultados falsos-negativos foram relacionados com tumores que expressaram baixos níveis de GLUT1, (MOCHIZUKI et al., 2001; KALIR et al., 2005), os quais representam um desafio para avaliações por PETSCAN (CARVALHO et al., 2011).

Adicionalmente, pouco se sabe sobre as outras isoformas de GLUT, assim como da relação das outras proteínas efetoras da via glicolítica como: IGF1R, PI3K e AKT na efetividade do PET SCAN. Alguns estudos em pacientes com neoplasia pulmonar maligna, por exemplo não encontraram associação estatística entre as expressões GLUT1 e GLUT3 com a captação de FDG no exame de PET SCAN (MAROM et al., 2001; TIAN et al., 2004). A expressão de GLUT3, em alguns trabalhos, ocorreu somente quando GLUT1 foi expresso, e sempre a expressão de GLUT3 era mais fraca. A proteína GLUT3, portanto, pareceu ser um evento tardio no processo de progressão neoplásica (MAROM et al., 2001).

Desta forma, mais estudos sobre as expressões das proteínas que modulam a via glicolítica são necessários para associar o aumento da captação da FDG/glicose pelos tumores. Embora se tenha observado que os subtipos da família de transportadores de glicose (GLUTs) sejam responsáveis pelo aumento do transporte de glicose e de FDG necessário para preencher o metabolismo anormal requerido pelas células neoplásicas (TIAN et al., 2004), até o momento,

poucos estudos têm avaliado a expressão das proteínas moduladoras da via glicolítica, IGF1R, PI3K e AKT, associado a expressão de GLUT1 em carcinoma de células escamosas oral.

Pela revisão da literatura aqui apresentada, ainda, ao nosso conhecimento, há poucos estudos na literatura relacionando a expressão de IGF1R, PI3K e AKT e GLUT1 no CCEO, como também a associação dessas proteínas com os achados clínicos dos pacientes. Em nosso meio, há poucos trabalhos utilizando casos de pacientes brasileiros para testar o efeito dessas moléculas como marcadores prognósticos no CCEO.

2. JUSTIFICATIVA

O CEO é uma neoplasia oral com alta incidência em todo o mundo e o seu diagnóstico é realizado, na maioria dos casos, nas fases mais avançadas, levando a uma diminuição na sobrevida dos pacientes. (FLESKENS & SLOOTWEG, 2009). Há evidências que as células neoplásicas apresentam uma reprogramação metabólica da via glicolítica e que os tumores parecem ser ávidos por glicose (KUNKEL et al., 2007; AYALA et al., 2010; YANG et al., 2019). A relevância clínica deste achado é que ele é empregado no exame de FDG-PET, para fins de diagnóstico e monitoramento de metástases. No entanto, em vários tumores, incluindo o CCEO, ainda não está totalmente esclarecida a relação entre a captação de glicose e a expressão de diversas proteínas envolvidas na via glicolítica, como as GLUTs. Além disso, há a necessidade de se entender por que alguns tumores parecem não serem ávidos por FDG (MAROM et al., 2001; TIAN et al., 2004). Como é sabido, as proteínas IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1 atuam, na via glicolítica, na regulação do metabolismo de carboidratos e em diversas atividades celulares como crescimento, divisão, migração e sobrevivência (BOHULA et al., 2003; POLLAK, 2008).

Neste contexto, dada a importância da sinalização destas proteínas, há a necessidade de se avaliar a sua expressão gênica na regulação do metabolismo de glicose no CCEO. Os genes responsáveis pela codificação das proteínas IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1, são respectivamente: IGF1R, PI3KCA, AKT1 e SLC2A1. Esses genes podem ser detectados pela técnica de qPCR e a análise da sua expressão correlacionada aos dados clínicos- patológicos dos pacientes de CCEO, pode representar um passo importante para ampliação do conhecimento da alteração metabólica no processo de carcinogênese oral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo principal deste estudo foi analisar o metabolismo celular alterado na oncogênese do CCEO através da avaliação do perfil de expressão gênica de **IGF1R**, **PI3K**, **AKT** e **GLUT1** relacionados com a modulação da via glicolítica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a expressão dos genes **IGF-1R**, **PK3CA (PI3K)**, **AKT1 (AKT)** e **SLC2A1 (GLUT1)** em uma linhagem celular tumoral e em amostras de pacientes portadores de CCEO comparados com uma linhagem celular normal e com pacientes portadores de mucosa oral saudável.
- Correlacionar os dados clínico-patológicos, dados sociodemográficos e hábitos (tabagismo, alcoolismo) dos pacientes com o perfil de expressão gênica encontrado no estudo.
- Avaliar a existência de associação entre a expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 com os dados clínico-patológicos, sociodemográficos e hábitos destes pacientes, com a finalidade de determinar potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico e terapias do CCEO.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Indivíduos que buscaram atendimento odontológico diagnosticados com **CCEO** ou que foram referenciados à **Clínica de Estomatologia** e indivíduos portadores de **mucosa oral saudável** que realizaram cirurgias ressectivas periodontais/periimplantares nas **Clínicas de Periodontia/ Implantodontia** da **UNIGRANRIO**, no período de setembro de 2017 à dezembro de 2019, foram convidados a participar da pesquisa.

Os pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão e exclusão e aceitaram fazer parte do estudo foram selecionados. Todos os participantes receberam informações por escrito e só foram incorporados ao estudo após a concordância dos mesmos e assinatura do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)** (**ANEXO 1**). Este estudo foi submetido ao **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIGRANRIO** e recebeu aprovação sob o número 1796.047 (**ANEXO 2**).

Para todos os indivíduos foi preenchido um **prontuário** com dados sociodemográficos, história médica pregressa, história familiar, antecedentes de doenças sexualmente transmissíveis, hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool e prática sexual), **dados das amostras de biópsias e exame clínico (ANEXO 3 e 4)**.

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Maiores de 18 anos e que concordaram assinar o TCLE
- Indivíduos que apresentaram **tumores primários de CCEO**, confirmados por diagnóstico histopatológico **Grupo Teste- (CCEO)**
- Indivíduos portadores de **mucosa oral saudável** e que necessitaram realizar cirurgias periodontais/periimplantares ressectivas, sem quadro clínico de inflamação periodontal/periimplantar na área de coleta da mucosa para o estudo **Grupo Controle (MS)**.

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Grávidas e lactantes
- Indivíduos diabéticos
- Indivíduos que apresentaram neoplasia maligna oral com diagnóstico histopatológico diferente de CCEO
- Indivíduos portadores de CCEO submetidos a tratamento prévio – quimioterápico, radioterápico ou cirúrgico
- Tumores múltiplos simultâneos
- Indivíduos que apresentaram história prévia de outras neoplasias na região de cabeça e pescoço

4.2 DESENHO DO ESTUDO

4.2.1 AMOSTRAS DE CULTURA DE CÉLULAS

Avaliamos dois tipos de linhagens celulares: uma **linhagem celular tumoral de CCEO de língua (SCC 25- *Squamous cell carcinoma of the oral tongue*)** e uma **linhagem celular de queratinócitos (HaCat- *aneuploid immortal keratinocyte cell line from adult human skin,*)** que foram obtidas a partir do **Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ)**.

Ambas as linhagens celulares, utilizadas na pesquisa, foram cultivadas em meios de cultura em um forno a 37°C e 5% CO₂ na presença de antibióticos e antimicóticos.

4.2.2 AMOSTRAS DE TECIDO DE MUCOSA ORAL DE PACIENTES

Além das amostras das linhagens celulares, foram utilizadas também amostras clínicas provenientes de tecidos de pacientes que buscaram atendimento nas **Clínicas de Estomatologia, Periodontia e Implantodontia** da **UNIGRANRIO**. Foram coletadas amostras de 25 indivíduos com lesões suspeitas de CCEO e de 32 indivíduos com mucosa clinicamente saudável.

As amostras de biópsias de tecido de mucosa oral de pacientes foram colhidas a fresco durante o ato cirúrgico e seccionadas em 2 fragmentos. O primeiro fragmento foi destinado à confirmação histopatológica e o seguinte foi armazenado em RNA Later para armazenamento a -80°C até o seu processamento ser realizado (será detalhado em seção posterior).

O primeiro fragmento de amostra de mucosa bucal foi armazenado em uma solução de formol a 10% e posteriormente foi enviado para análise histopatológica. Esta análise foi realizada na Universidade Federal Fluminense (UFF), no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LABA), sob a coordenação da Profa. Dra. Simone de Queiroz Chaves de Lourenço.

A partir desta avaliação histopatológica, as amostras que responderam aos critérios de inclusão na pesquisa foram subdivididas em dois grupos, o grupo de pacientes que obtiveram a confirmação do diagnóstico de Carcinoma de Células Escamosas Oral (Grupo CCEO $n=22$) e o grupo de pacientes com mucosa oral saudável (Grupo MS=12).

Para uma melhor compreensão da metodologia utilizada, o fluxograma (**Figura 9**) descreve um resumo das etapas clínicas e laboratoriais que foram empregadas nesta pesquisa.



Figura 9. Fluxograma representativo da metodologia empregada na pesquisa.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE LINHAGENS DE CÉLULAS

Primeiramente, a expressão dos genes eleitos para esse estudo (IGF1R, PI3K, AKT1 e GLUT1) foi avaliada em uma linhagem celular de carcinoma de células escamosas (CCE) de língua (SCC 25) comparada à uma linhagem celular de queratinócitos normais (HaCat), pela técnica de PCR quantitativa (qPCR) (**Figura 10**).

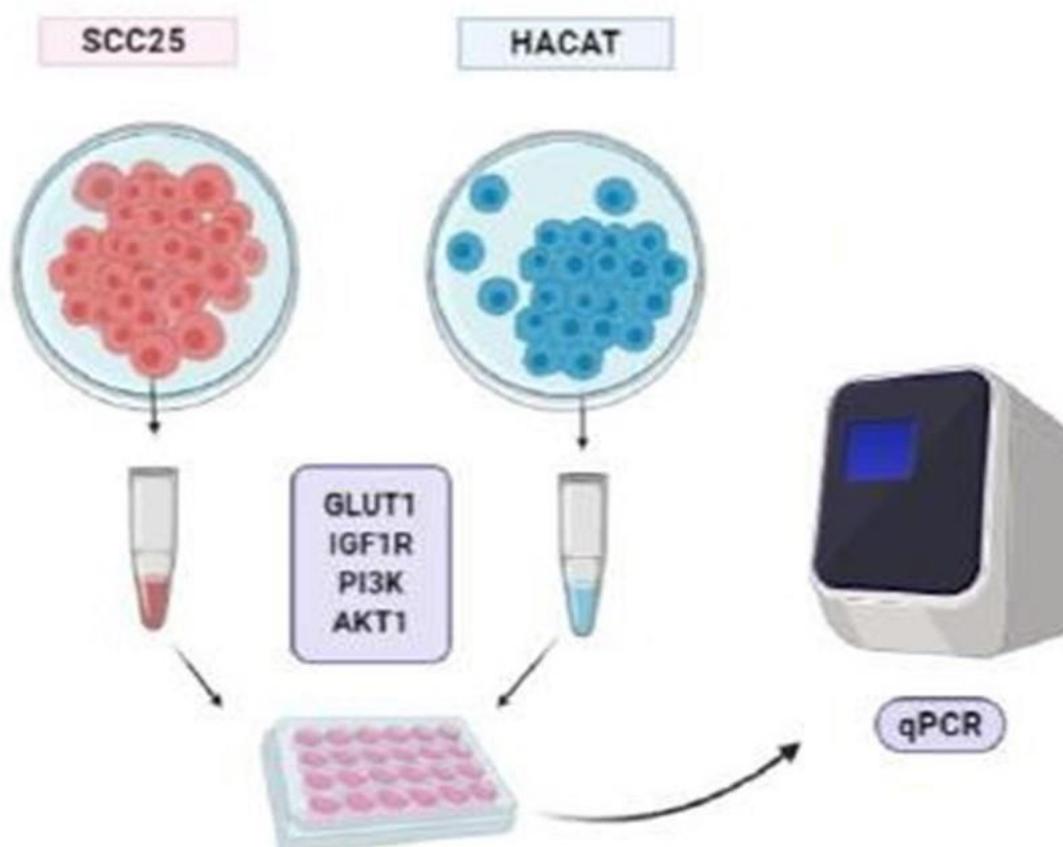


Figura 10. Esquema ilustrativo da comparação de expressão gênica de IGF1R, PI3K, AKT1 e GLUT1, entre a linhagem celular de carcinoma de células escamosas (CCE) de língua (SCC 25) e a linhagem celular de queratinócitos normais (HaCat), através da técnica de qPCR. Fonte: GIOVANNETTI-MENEZES (2020).

4.3.2 ANÁLISE MOLECULAR NAS AMOSTRAS DE TECIDO OBTIDAS DOS PACIENTES

O segundo fragmento tecidual coletado nas cirurgias, foi armazenado em um tubo de polipropileno de 1,5 mL contendo uma solução de *RNA Later*® (*Thermo Fisher Scientific*, Foster City, Califórnia, EUA) para armazenamento no freezer a -80°C Posteriormente, as amostras de CCEO e de mucosa saudável foram submetidas a uma segunda avaliação, a análise molecular. (Figura 11).

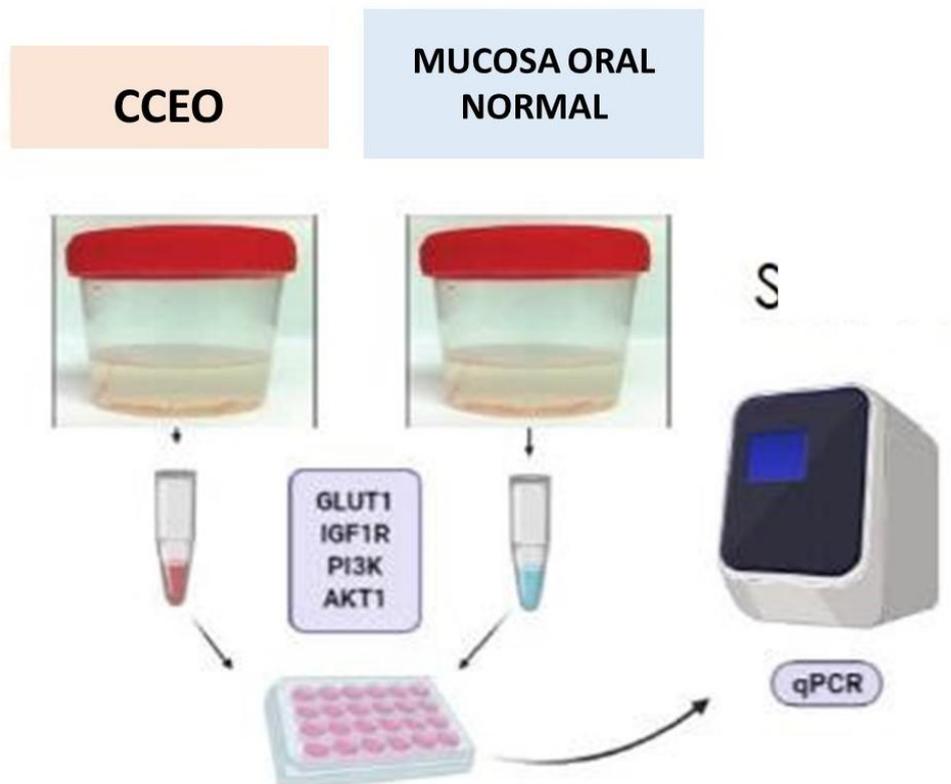


Figura11. Esquema ilustrativo da análise molecular de expressão gênica de IGF1R,PI3K, AKT1 e GLUT1, entre as amostras clínicas de biópsia de carcinoma de células escamosas oral (CCEO) e mucosa oral normal através da técnica de PCR quantitativa (qPCR). Fonte: GIOVANNETTI-MENEZES (2020).

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *IGF1R*, *PK3CA*, *AKT1* E *SLC2A1* POR qPCR

4.4.1 EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS

A extração do RNA total das amostras teciduais foi realizada pelo método do trizol e clorofórmio. Resumidamente, foram adicionados 800 µL de Trizol às amostras e 1,0 µL de glicogênio (10 µg/µL) e em seguida incubada por 5 min a temperatura ambiente. Após esta incubação foi adicionado 160 µL de clorofórmio e realizada a centrifugação por 5 min a 4°C à 12.000rpm, para a separação de fases.

A fase superior foi transferida para um novo tubo e os RNAs foram então precipitados através da adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado seguido de incubação a -20°C *overnight*. Após este período os tubos foram centrifugados por 30 min a 4°C à 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol a 70%. O *pellet* secou em temperatura ambiente por 10 min e foi ressuscitado em 25µL de H₂O *RNAse free*. Após a extração todos os RNAs obtidos foram quantificados no aparelho espectrofotômetro (*Denovix DS-11, Uniscience, Wilmintgton, EUA*). O controle da qualidade dos RNAs extraídos foi feito por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.4.2 CONFECÇÃO DE CDNA

Para a confecção das moléculas de cDNA, 1 µg de RNA total foi tratado com 1U de *DNase I* a fim de evitar contaminação de DNA genômico. O RNA foi submetido à ação da enzima *SuperScript III* utilizando o *First Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)* conforme as condições fornecidas pelo

fabricante. Para cada alvo analisado, foram utilizados primers e sondas correspondentes. A análise da expressão dos genes foi feita no aparelho de PCR em tempo real da Applied Biosystems® QuantStudio 7 Flex (Life Technologies – Carlsbad – E.U.A) no Laboratório de Genética da Unigranrio (LabGen).

As reações consistiram na aplicação de 1 µL de RNA total a 1 µL de primer Oligo dT (500 µg/mL), 1 µL Random Primer, 1 µL de dNTPs (10mM). Essa mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2µL de 10x First Strand Buffer, 4 µL de MgCl₂ (25 mM) 2 µL de DTT (0,1M), 1µL de RNase out (40U/µL) e 1 µL da enzima SuperScript III (200 U/µL) (Invitrogen) perfazendo um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada por 10 min a 25°C, por 50 min a 50°C, 5 min a 85° C.

4.4.3 REAÇÃO DE qPCR

A técnica de qPCR, também denominada de PCR por tempo real, consiste na coleta de dados à medida que a reação ocorre, de modo que a amplificação e detecção ocorrem concomitantemente, diferindo-a da PCR convencional em que é necessário um número pré-determinado de ciclos para que a detecção ocorra. O resultado desta técnica é representado na forma de gráfico de amplificações, formado durante a reação. O produto acumulado na fase logarítmica da reação de amplificação está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, e os valores utilizados na quantificação são obtidos através da determinação do *threshold*. O *Cycle threshold* (Ct) é o ciclo da PCR em que o nível de fluorescência ultrapassa o *threshold*. Este parâmetro é utilizado para calcular a quantidade de produto no início da reação.

Para a avaliação da expressão gênica dos transcritos de IGF1R, PI3K, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) foi utilizado o sistema de detecção *Taqman* (*Thermo Fisher Scientific*). Este sistema de detecção consiste na utilização de dois primers e uma sonda específica para o transcrito em análise. Foram utilizados primers para todos proteínas relacionadas, assim como para os seus normalizadores. As reações foram todas realizadas em triplicata, sempre com a presença de um controle negativo de reação, num volume total 20 μ L para cada reação.

As reações consistiram na aplicação de 2,0 μ L de cDNA diluído 1:10, 0,25 μ L de *TaqMan*® Universal PCR Master Mix II (2 \times), 0,5 μ L de *Primer Sense*, 0,5 μ L de *primer Anti-Sense*, 0,5 μ L de dNTP, 2,0 de Mg Cl₂ μ L, 2,5 de Buffer Mg Cl₂ Free (10x) e 16,75 de H₂O nuclease free. As reações foram realizadas no aparelho *QuantStudio7* (*Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA*) e as condições para a amplificação foram: *Hold* de 94 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação de 94 °C por 20 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg e anelamento e extensão 72°C por 7min.

O método da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ou método comparativo de Ct, foi utilizado para o cálculo da expressão relativa dos genes, IGF1R, PK3CA, AKT1 SLC2A1, relacionados a via glicolítica. Este método comparativo trata-se de uma equação matemática em que as mudanças na expressão gênica são calculadas através das diferenças entre a amostras calibradoras (grupo pacientes saudáveis) e as experimentais (grupo pacientes com CCEO), normalizadas por uma referência. Vale ressaltar que o valor atribuído à ΔCt equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. O cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolveu a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor de ΔCt

para as amostras calibradoras (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o software estatístico IBM SPSS Statistics versão 20 (IBM Brazil, São Paulo, SP, Brasil). Os dados clínicos e sociodemográficos obtidos foram analisados e foram calculadas a média de idade, frequência das raças e do gênero. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e sociodemográficos entre os grupos foram avaliadas pelos testes *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*, ajustando-se para covariáveis. O nível de significância foi estabelecido a 5%. Os dados categóricos foram avaliados através do teste Qui-quadrado. O perfil de expressão dos genes (IGF1R, PK3CA, AKT1e SLC2A1) nas amostras foram apresentados de forma a demonstrar quais genes estão com expressão aumentada ou diminuída. Os resultados obtidos neste estudo, bem como a caracterização das suas respectivas vias metabólicas, foram analisados por ferramentas de bioinformática fornecidas pelo fabricante (*Life Technologies*). Associações entre os parâmetros clínicos e moleculares foram estudados através do Coeficiente de Correlação de *Spearman* e de modelos de regressão linear.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PK3CA, AKT1 E SLC2A1 NA LINHAGEM CELULAR DE QUERATINÓCITOS NORMAIS (HACAT) E NA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE LÍNGUA (SCC25)

Os resultados da expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 (GLUT1) nas amostras de queratinócitos normais (HaCaT) e de CCE de língua (SCC25) estão apresentados nos gráficos da **Figura 12**.

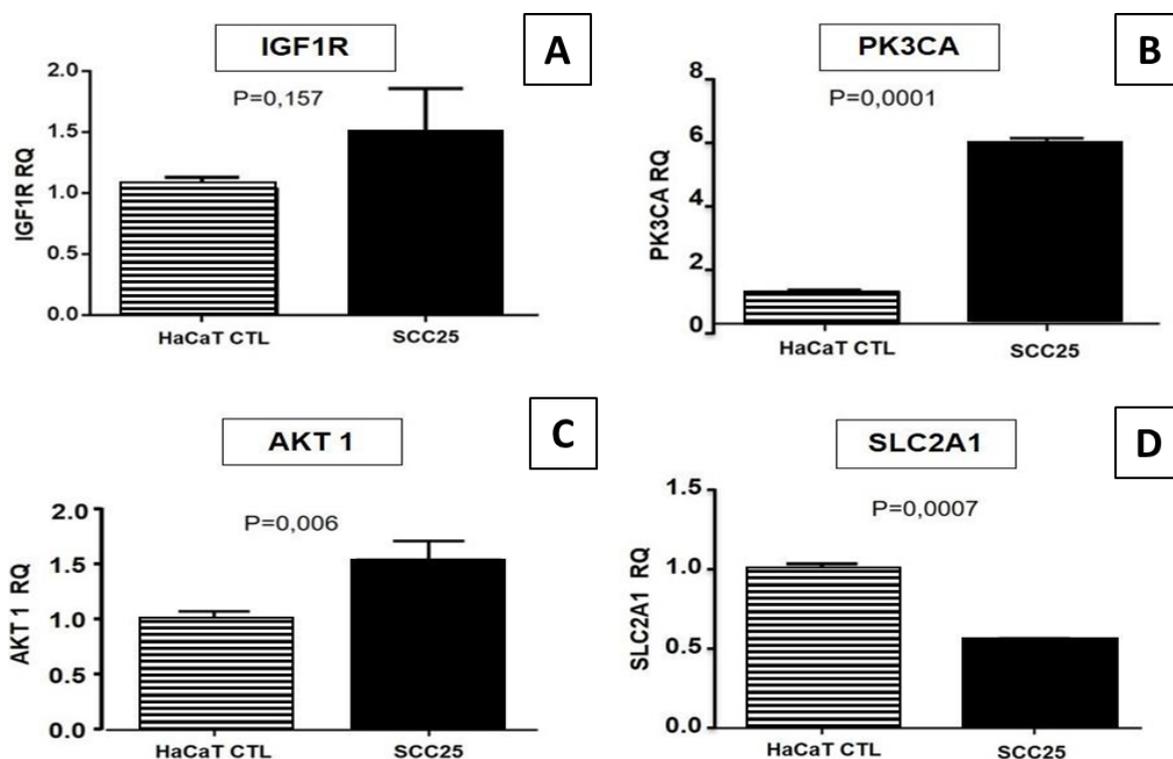


Figura 12. Expressão gênica de *IGF1R*, *PK3CA*, *AKT1* e *SLC2A1* por qPCR, nas linhagens celulares de queratinócitos normais (HaCaT) e de CCE de língua (SCC25). Análise de expressão de *IGF1R* (A), *PK3CA* (B), *AKT1* (C), *SLC2A1* (D). RQ*= Quantificação Relativa (*fold change*); Valores de *fold-change* expressos em escala log₂; p < 0,05; teste de Mann-Whitney.

Não foi encontrada diferença significativa na expressão de IGF1R entre a linhagem celular de câncer (SCC25) e a linhagem celular controle (HaCat)

($p=0,157$; teste de Mann-Whitney) (**Figura 12A**).

Entretanto, houve diferença estatisticamente significantes para os genes PK3CA, AKT1 e SLC2A1 entre as linhagens analisadas ($p < 0,05$; teste de *Mann-Whitney*) (**Figuras 12B-D**). Além disso, foi observada, na linhagem de CCEO, uma alta expressão (3x) do gene PK3CA, quando comparada à linhagem controle (HaCat); ($p=0,0001$) (**Figura 12B**). Por outro lado, diferentemente do esperado, o gene SLC2A1 apresentou uma expressão reduzida na linhagem de CCEO (0,5 x) ($p=0,0007$) (**Figura 12D**).

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PK3CA, AKT1 E SLC2A1 NA LINHAGEM CELULAR SCC25.

A expressão gênica de GAPDH (CTL), IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 na linhagem celular tumoral SSC25 está apresentada na **Figura 13**.

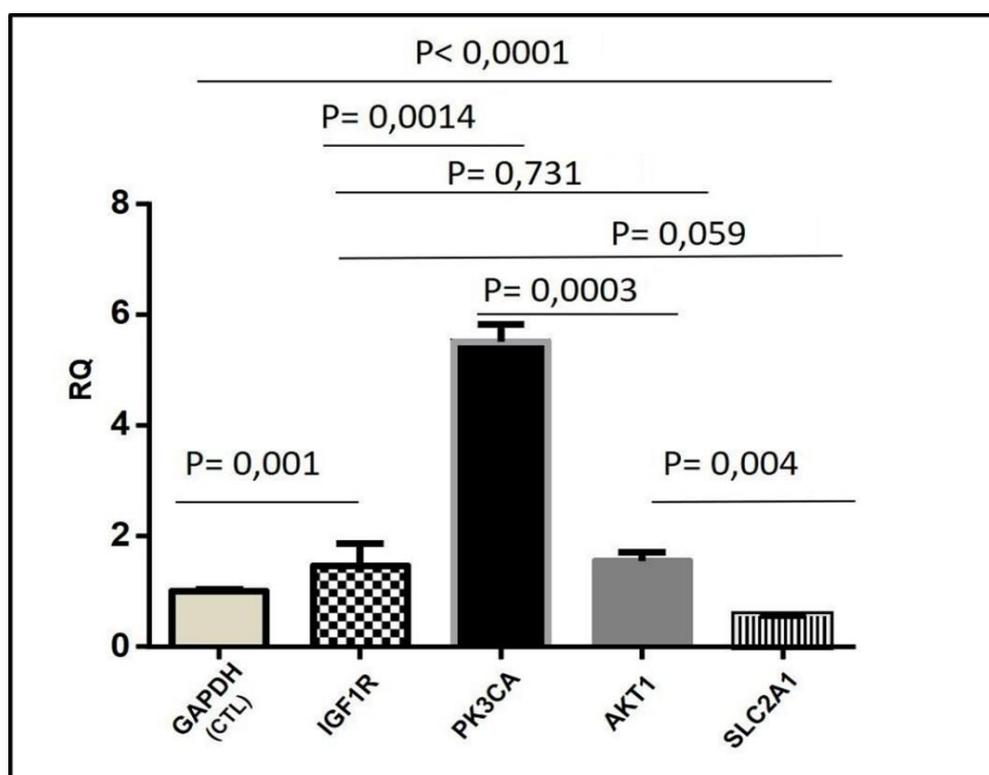


Figura 13. Expressão gênica comparativa entre *GAPDH (CTL)*, *IGF1R*, *PK3CA*, *AKT1* e *SLC2A1* por qPCR, na linhagem celular de câncer de língua (SCC25). RQ* = Quantificação Relativa (fold change); Valores de *fold-change* expressos em escala log2; ($p < 0,005$; teste de ANOVA).

Em relação ao *fold change* podemos notar que houve uma maior expressão (5,5 RQ; RQ*=quantificação relativa) do gene PK3CA em relação aos demais genes (IGF1R=1,46; AKT1=1,55; SLC2A1=0,55) RQ* da linhagem tumoral. Em uma análise comparativa entre os genes foi encontrada diferença significativa de expressão entre IGF1R/PK3CA ($p=0,0014$), entre PK3CA/AKT1 ($p=0,0003$) e entre AKT1/SLC2A1 ($p=0,004$); ($p<0,005$; teste de ANOVA), que representa o eixo ascendente da via de sinalização de IGF1R/PI3K/AKT/GLUT1. Não houve diferença significativa entre a expressão de IGF1R/AKT1 ($p=0,731$) e entre IGF1R/SLC2A1 ($p=0,059$); ($p<0,005$; teste de ANOVA).

5.3 DADOS HISTOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS DOS PACIENTES

Após as análises histopatológicas e moleculares das amostras de biópsias de mucosa oral dos pacientes, algumas amostras do grupo de mucosa saudável (Grupo Controle - MS) como do grupo de pacientes com CCEO (Grupo Teste - CCEO) inicialmente coletadas, tiveram que ser descartadas do estudo.

No Grupo MS ($n=32$), o exame histopatológico em 10 amostras mostrou presença de inflamação da mucosa oral nestes pacientes considerados clinicamente normais, e como isto pode ser considerado um fator de confundimento para as análises moleculares que fizemos, optamos por não as incluir na nossa casuística. Desta forma, após a realização do exame histopatológico, o Grupo MS passou a possuir 22 amostras ($n=22$).

Além deste fato, das 22 amostras confirmadas pelo exame histopatológico como mucosa saudável (Grupo MS), durante as análises moleculares, 15 amostras não estavam com seus RNAs viáveis ou não expressaram os genes avaliados, desta forma estas amostras também não foram utilizadas na nossa

análise estatística. Com isto, das 32 amostras coletadas inicialmente no Grupo MS, ao final, somente puderam ser incluídas 7 amostras (**Grupo MS=7**) para as análises deste estudo.

Da mesma forma, no Grupo CCEO (n=25), do total de amostras inicialmente coletadas de pacientes com suspeita de câncer, 3 amostras não puderam ser incluídas no estudo, uma vez que não foram confirmadas pelo exame histopatológico como casos de CCEO. Assim, após a realização do exame histopatológico, o número de amostras deste grupo reduziu para 22 amostras (Grupo CCEO n= 22).

Além disso, durante as análises moleculares, 12 amostras de CCEO não estavam com seus RNAs viáveis ou não expressaram os genes avaliados, desta forma estas amostras também não foram computadas na nossa análise estatística. Desta forma, das 25 amostras coletadas inicialmente no Grupo CCEO, foram incluídas 10 amostras para análise (**Grupo CCEO=10**).

5.4 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E HÁBITOS DE VIDA (TABAGISMO E ETILISMO) DOS PACIENTES

Os dados sociodemográficos e a presença dos hábitos de tabagismo e etilismo nos dois grupos clínicos estão sumarizados na **Tabela 1**. Pacientes do grupo MS eram significativamente mais jovens do que os indivíduos do grupo CCEO ($p < 0,01$ testes de *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*). A média de idade para o grupo MS ficou em 41, 71 anos; enquanto a média de idade no grupo CCEO ficou em 70,50 anos. O grupo étnico de pardos, que representa a miscigenação entre brancos e negros, foi o menos envolvido com 11,76% pacientes, seguindo-se com 29,41% de negros e 58,82% de brancos. Em relação aos hábitos de vida (tabagismo e etilismo), nenhum indivíduo do Grupo MS se declarou tabagista ou etilista, já para os pacientes do grupo CCEO, a

maioria declarou o consumo frequente de álcool, com 80% dos casos, enquanto que 40% dos indivíduos se declararam usuários de tabaco. Com o objetivo de controlar as variáveis idade, tabagismo e etilismo, foram realizadas comparações entre os grupos para estes parâmetros somente em indivíduos \geq 40 anos, não-tabagistas e não-etilistas. Mesmo assim, as diferenças entre os grupos permaneceram estatisticamente significativas para estes parâmetros ($p < 0,001$ testes de *Kruskal-Wallis*; dados não mostrados).

Tabela 1. Dados sociodemográficos e presença de hábitos da amostra dos pacientes participantes do estudo com Mucosa Oral Saudável (MS) e Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO).

Variáveis	MS (n = 7)	%	CCEO (n = 10)	%
Gênero				
Homens	3	42,85	5	50
Mulheres	4	57,14	5	50
Idade * †	41,71		70,50	
≤ 40 anos	3	42,85	0	0
41-59 anos	3	42,85	2	20
≥ 60 anos	1	14,28	8	80
Etnia Φ				
Pardos	1	14,28	1	10
Branços	4	57,14	6	60
Negros	2	28,57	3	30
Tabagismo Φ				
Não-fumantes	0	0	6	60
Fumantes	0	0	4	40
Etilismo Φ				
Não-etilistas	0	0	2	20
Etilistas	0	0	8	80

* Referente ao $p < 0,01$; testes de *Kruskal-Wallis* e † *Mann-Whitney*; Φ referente a $p < 0,01$; teste do χ^2 .

Os parâmetros clínico-patológicos da amostra de indivíduos portadores de carcinoma de células escamosas oral (CCEO) estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Parâmetros clínicos-patológicos da amostra de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas (CCEO).

Parâmetros	CCEO	%
Localização anatômica		
Língua móvel 2/3 anteriores	6	60
Assoalho de boca	2	20
Rebordo Alveolar	2	20
Mucosa Jugal	1	10
Fundo de Vestíbulo	1	10
Gengiva	1	10
Grau de diferenciação histopatológica		
CA in situ	1	10
Bem-diferenciado	2	20
Moderadamente-diferenciado	7	70
Pouco-diferenciado	0	0

Quanto à localização anatômica, a língua foi a região mais comumente afetada pelo CCEO em 60% dos casos, seguida do assoalho da boca (20 %), rebordo alveolar (20%), mucosa jugal, fundo de vestibulo e gengiva (10 % para cada região). Em relação à classificação histopatológica, o tipo mais encontrado foi o tumor moderadamente diferenciado (70% dos casos), seguido do subtipo bem diferenciado (20%). Apenas 1 paciente (10%) apresentou CCEO em estágio inicial no momento do diagnóstico e nenhum paciente apresentou o subtipo pouco diferenciado.

5.5 AMPLIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE RNA DOS PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS E COM MUCOSA ORAL SAUDÁVEL.

A **Figura 14** apresenta a avaliação da qualidade da transcrição reversa dos cDNAs das amostras de CCEO e amostras normais, realizada através da amplificação do gene da β -actina por PCR convencional, seguida de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

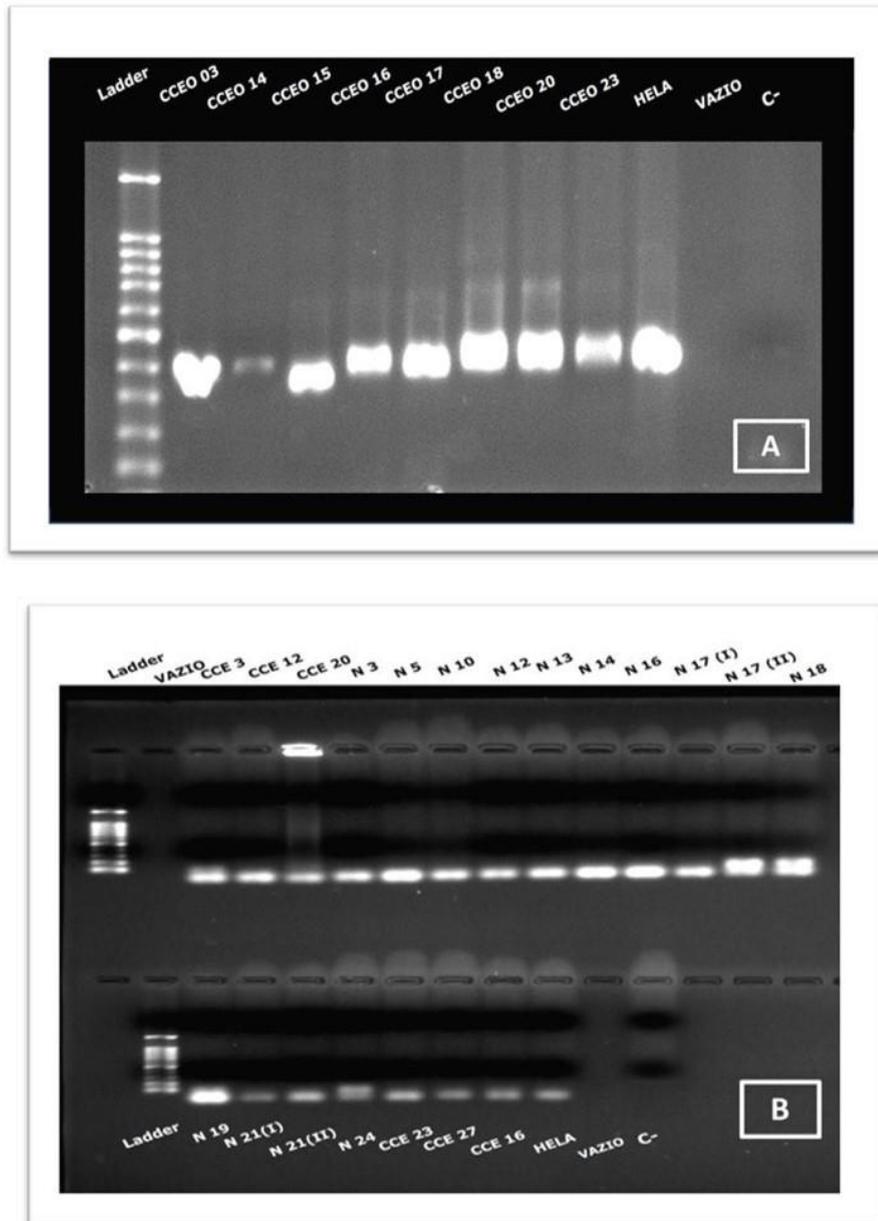


Figura 14. Imagens de gel de agarose a 1,5%, ilustrando a amplificação da β -actina (*amplicon* 353 bp), nas amostras da transcrição reversa dos cDNAs dos pacientes. **A** – Amostras de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) e **B** - Amostras de pacientes com CCEO (CCE) e mucosa oral saudável (N). (Legenda: *Ladder*: 100bp; Controles da reação: controle negativo (C⁻); controle positivo (*HeLa*)).

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PK3CA, AKT1 E SLC2A1 NOS PACIENTES DOS GRUPOS MS E CCEO.

Os resultados da expressão dos genes IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 nas amostras de indivíduos com CCEO comparados aos pacientes portadores de mucosa saudável estão apresentados na **Figura 15**.

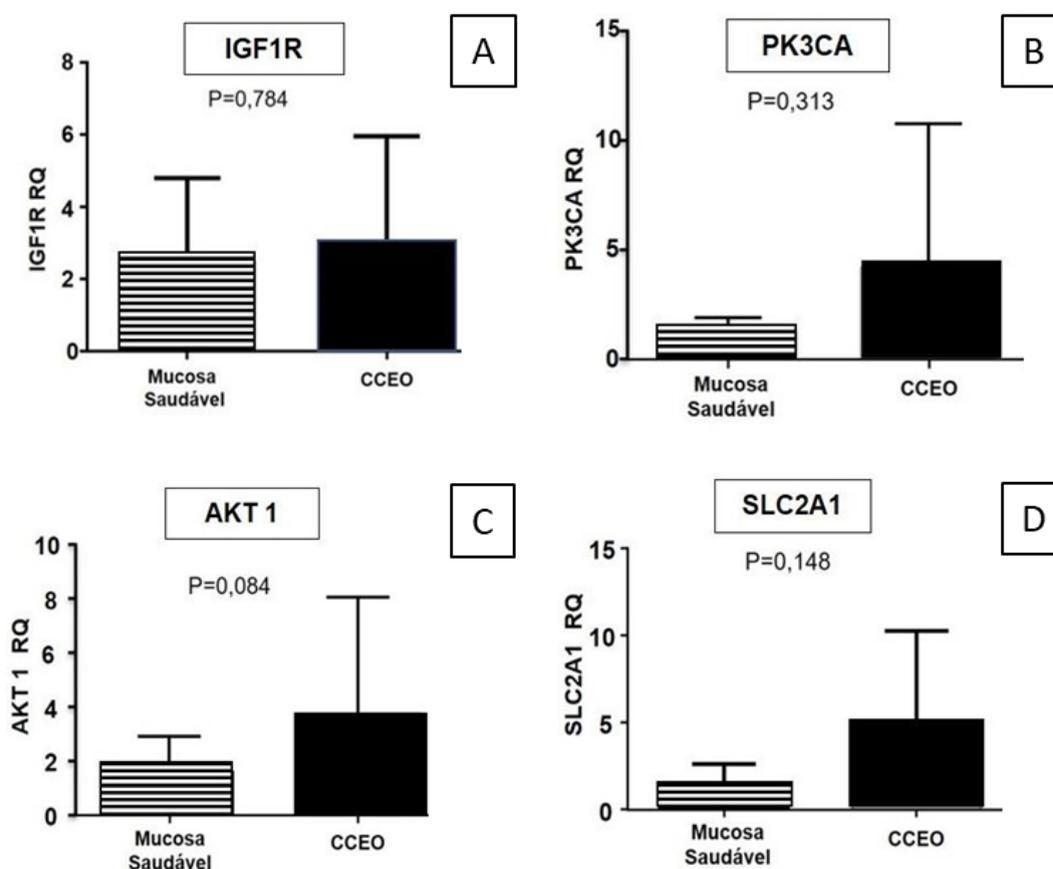


Figura 15. Expressão gênica de *IGF1R*, *PK3CA*, *AKT1* e *SLC2A1* por qPCR, em indivíduos com Mucosa Saudável e Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO). Análise de expressão (A): *IGF1R*; (B): *PK3CA*; (C): *AKT1*; (D): *SLC2A1*. RQ* = Quantificação Relativa (*fold change*); Valores de *fold-change* expressos em escala log₂; p < 0,084; teste de *Mann-Whitney*.

Não foi observada diferença de expressão para IGF1R nas amostras de CCEO em comparação ao grupo controle (p=0,784; teste de *Mann-Whitney*). (Figura 15A). Em relação ao *fold change* podemos notar que o grupo de pacientes

com CCEO apresentou um aumento na expressão em PK3CA, AKT1 e SLC2A1, quando comparado ao grupo de indivíduos com mucosa saudável. No entanto, por haver uma variação muito grande nos valores de *fold change* entre os pacientes do grupo de CCEO, também não foram observadas diferenças significativas para esses três últimos genes avaliados ($p < 0,084$; teste de Mann-Whitney) (**Figuras 15B a 15D**).

5.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS ASSOCIADOS À EXPRESSÃO GÊNICA DE IGF1R, PK3CA, AKT1 E SLC2A1 NA AMOSTRA INDIVIDUAL DOS PACIENTES.

Os parâmetros sociodemográficos e os resultados da expressão dos genes (IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1) nos pacientes do Grupo de Mucosa Oral Saudável (MS) estão sumarizados na **Tabela 3**, enquanto na **Tabela 4** estão sumarizados os dados dos pacientes do Grupo de Carcinoma de Células Escamosas (CCEO).

Tabela 3. Parâmetros sociodemográficos e de expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 nos pacientes do Grupo de Mucosa Oral Saudável (MS).

Amostra	Tabaco	Álcool	Gênero	Idade (anos)	IGF1R (RQ*)	PK3CA (RQ*)	AKT1 (RQ*)	SLC2A1 (RQ*)
MS 04	N	N	M	21	---	1,250	---	0,653
MS 13	N	N	F	55	0,556	0,287	0,345	1,133
MS 14	N	N	F	64	---	0,699	---	2,623
MS 16	N	N	F	30	2,791	0,671	1,822	1,676
MS 18	N	N	M	42	5,752	1,890	3,036	5,224
MS 20	N	N	M	45	1,641	---	0,185	0,514
MS21	N	N	F	35	0,031	---	---	---

Legenda: Os valores de RQ* indicam os diferentes níveis de expressão gênica entre as amostras de mucosa saudável dos indivíduos do grupo controle. (MS) Mucosa saudável; Consumo de tabaco/ álcool: (S) Sim, (N) Não; Gênero: (M) Masculino; (F) Feminino. RQ*= Quantificação Relativa (*fold Change*); observa-se em vermelho hiperexpressão gênica ($RQ^* \geq 2,0$) e em verde hipoexpressão gênica ($RQ^* \leq 0,5$); $p < 0,084$; teste de *Mann-Whitney*.

Em relação aos parâmetros sociodemográficos dos pacientes do Grupo de Mucosa Saudável (MS), a idade variou entre 21 e 64 anos (média de idade: 41,71anos). Em relação ao gênero, a amostra da população avaliada consistiu em 42,85 % de homens e 57,14 % de mulheres. Em relação aos hábitos, nenhum indivíduo se declarou tabagista ou etilista (**Tabela 1 e Tabela 3**).

Em relação à expressão gênica de IGF1R, foi observada uma hiperexpressão em três pacientes (42,85%). Entretanto, quando este resultado foi comparado ao grupo de pacientes com CCEO, não houve diferença de expressão significativa ($p < 0,78$; teste de Mann-Whitney) (**Figura 15-A**).

Foi observada uma hipoexpressão de PK3CA em três pacientes (42,85%) e um aumento de expressão em 2 pacientes (28,57%).

A análise de AKT1 mostrou uma hipoexpressão para duas amostras de MS e uma hiperexpressão em também outras duas (28,57%) amostras. Três amostras avaliadas deste grupo de MS não expressaram este gene.

Em relação à expressão gênica de SLC2A1, 4 (57,14%) amostras mostraram-se hiperexpressas. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas para todos os quatro genes avaliados entre os grupos de mucosa saudável e CCEO ($p < 0,084$; teste de Mann-Whitney).

Tabela 4. Parâmetros clínicos-patológicos, sociodemográficos e de expressão gênica de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1 nos pacientes do Grupo de Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO).

Caso	Tumor localização	Tabaco	Álcool	Gênero	Idade (Anos)	Diferenciação histológica	IGF1R (RQ*)	PK3CA (RQ*)	AKT1 (RQ*)	SLC2A1 (RQ*)
CCEO 1	AB, GEN	S	S	M	67	MD	5,57	14,57	3,43	1,83
CCEO 4	L-CO, MJ	N	S	F	79	BD	3,50	0,75	2,98	11,62
CCEO 12	L-CO	S	S	M	56	MD	19,87	2,45	14,56	54,28
CCEO 14	L-CO	N	N	F	84	BD	3,33	2,35	1,15	3,90
CCEO 18	AB, L-CO	N	S	M	52	MD	0,02	---	0,02	0,001
CCEO 20	L-CO	N	S	M	68	MD	12,59	---	10,62	19,06
CCEO 22	FV	N	N	F	65	MD	10,95	13,37	3,71	5,59
CCEO 23	RA	S	S	F	73	MD	0,02	0,004	---	0,01
CCEO 35	L-CO	N	S	F	71	MD	---	0,004	---	0,003
CCEO 36	RA	S	S	M	90	IS	1,47	1,09	0,61	10,82

Legenda: Os valores de RQ indicam os diferentes níveis de expressão gênica entre as amostras de pacientes do grupo de Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO). Localizações do Tumor: (AB) assoalho de boca; (GEN) gengiva; (L-CO) língua-cavidade oral; (MJ) mucosa jugal; (FV) fundo de véstíbulo; (RA) rebordo alveolar. Consumo de tabaco/ álcool: (S) Sim; (N) Não; Gênero: (M) Masculino, (F) Feminino; Diferenciação Histológica: (MD) moderadamente diferenciado; (BD) bem-diferenciado; (IS) *in situ*. RQ* = Quantificação Relativa (*fold change*); observa-se em vermelho hiperexpressão gênica ($RQ^* \geq 2,0$) e em verde hipoexpressão gênica ($RQ^* \leq 0,5$); $p < 0,084$; teste de Mann-Whitney.

Em relação à localização anatômica, três indivíduos do Grupo CCEO, apresentaram tumores em mais de uma região (AB/GEN), (L-CO/MS) e (AB/L-CO). De todas as regiões da cavidade bucal, a língua foi a região mais afetada pelo CCEO com 60% dos casos, seguida pelo assoalho bucal (20%) e rebordo alveolar (20%). Os sítios de menor acometimento foram a mucosa jugal, fundo de vestíbulo e a gengiva (10 %). Em nossa análise, dentro do grupo de pacientes CCEO, encontramos uma correlação positiva entre a localização do tumor no bordo da língua e o aumento de expressão do gene SLC2A1 que codifica a proteína GLUT1 ($p < 0,01$; teste de Mann-Whitney).

Em relação ao gênero, não foram observadas diferenças significantes nas expressões ($p < 0,01$; teste de Mann-Whitney). Em relação ao grau de diferenciação histológica dos tumores, o tumor moderadamente diferenciado (MD) associou-se a uma maior expressão dos genes IGF1R, PK3CA e AKT1 ($p < 0,0845$). Além disso, em nossa amostra, foi observada uma correlação positiva entre o aumento da expressão de GLUT1 (SLC2A1) e o consumo de álcool ($p < 0,01$; teste de Mann-Whitney).

Em relação à expressão gênica de IGF1R, foi observada uma hiperexpressão em 70% dos pacientes. O gene PK3CA mostrou-se hiperexpresso em 50% dos casos e em 2 pacientes não houve expressão. A análise de AKT1 mostrou uma hiperexpressão em 60% das amostras de CCEO e uma hipoexpressão em 20% das amostras. Por sua vez, a expressão gênica de SLC2A1, mostrou-se hiperexpressa em 70% das amostras de CCEO.

Dentro desta análise, verificou-se que a amostra do paciente CCEO-12 se mostrou bastante elevada para a expressão de IGF1R (RQ= 19,87), AKT1 (RQ= 14,56) e SLC2A1 (RQ=54,28). A fim de se determinar quais variáveis estavam interferindo nessa amostra, observamos que o consumo de álcool e tabaco

foram positivos para este paciente.

Importante mencionar que dos 10 pacientes avaliados nesta etapa, pelo menos 6 do grupo CCEO, apresentaram aumento de expressão, de pelo menos três, dos quatro genes avaliados da via glicotlítica. Em dois pacientes, foi possível verificar o aumento de expressão de todos os componentes da via analisada nesse estudo.

Apesar disso, na análise comparativa entre os níveis de expressão gênica entre as amostras de pacientes do grupo CCEO e do grupo controle MS, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,084$; teste de Mann-Whitney) para os quatro genes avaliados, possivelmente, em função de ter havido uma variação muito grande nos valores de *fold change* entre os pacientes do grupo de CCEO) e, também ao nosso reduzido número amostral.

6. DISCUSSÃO

As células neoplásicas apresentam uma característica particular que é conhecida como “Efeito Warburg”. Este efeito é definido como um aumento na capacidade de captação de glicose, em decorrência de uma reprogramação do metabolismo energético celular. Esta reprogramação envolve uma série de alterações na expressão de proteínas envolvidas nas vias metabólicas, principalmente, a via glicolítica (KUNKEL et al., 2003; KUNKEL et al., 2007).

A superativação da expressão de proteínas envolvidas na via glicolítica, pode afetar a regulação do metabolismo de carboidratos, assim como numerosas atividades celulares como crescimento, divisão, migração e sobrevivência das células (BOHULA et al., 2003; POLLAK, 2008) e podem estar relacionadas ao alto grau de agressividade e invasão dos tumores. Em relação ao processo de carcinogênese oral, ainda não está totalmente estabelecido as alterações na expressão das proteínas que regulam a via glicolítica (GHANAVAT et al., 2021).

No presente estudo, nós investigamos a modulação da via glicolítica no CCEO, através da expressão de quatro proteínas, IGF1R, PI3K, AKT e GLUT1, que participam da sinalização de absorção de glicose pelas células. A primeira delas é a proteína receptora do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R) que recebe o sinal e ativa a via canônica PI3K-AKT, e que na sequência aumenta a expressão da proteína transportadora de glicose tipo 1 (GLUT1) que se expressa na membrana celular, a fim de promover, de forma mais rápida e com menor gasto energético, a difusão facilitada da glicose para o interior das células.

Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas são, respectivamente, IGF1R, PI3KCA, AKT1 e SLC2A1. Esses genes foram detectados pela técnica de PCR em tempo real e as análises das suas expressões foram avaliadas tanto nas linhagens celulares: SCC25(tumoral) e HaCaT (controle), como

nas amostras clínicas obtidas por biópsia dos pacientes, dos grupos de mucosa saudável-controle (MS) e do grupo de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Em seguida esses resultados foram correlacionados com os dados clínico-patológicos dos pacientes.

Nossos achados mostraram que houve diferenças estatisticamente significantes na expressão dos genes PK3CA, AKT1 e SLC2A1 entre as linhagens SCC25 e HaCaT ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney). Os genes PK3CA e AKT1, que representam a via canônica PI3K/AKT se mostraram hiperexpressos na linhagem SCC25 comparados à linhagem HaCaT.

Com relação ao gene IGF1R, não foi encontrada diferença significativa entre as linhagens HaCaT e SCC25 ($p = 0,157$; teste de Mann-Whitney). Entretanto, para nossa surpresa, nas células da linhagem tumoral SCC25, a expressão de GLUT1 caracterizada pela expressão gênica de SLC2A1, mostrou-se hipoexpressa (0,5x, $p = 0,0007$; teste de Mann-Whitney) quando comparada à linhagem HaCaT (**Figura 13D**).

Na literatura, segundo os pesquisadores, a expressão de GLUT1 parece desempenhar uma função clínica significativa em vários tipos de neoplasias (ITO et al., 1998; Brown et al., 1999; Higashi et al., 2000; Oliver et al., 2004). Entretanto, MAROM et al., (2001), também não encontraram essa associação nos achados clínicos dos pacientes de câncer de pulmão avaliando as proteínas GLUT1 e GLUT3. Durante o estadiamento clínico, nas avaliações realizadas pela técnica PET SCAN, pesquisadores relataram que os resultados falso-positivos estavam associados com processos inflamatórios e hiperplasias dos nódulos linfáticos. Já os resultados falsos-negativos foram relacionados com tumores que expressaram baixos níveis de GLUT1 (MOCHIZUKI et al., 2001; KALIR et al., 2005). Esse achado interessante ressalta que nestes casos de resultados falsos-negativos, eles representam um desafio para avaliações por PET SCAN, através da avaliação somente por GLUT1 e GLUT3, uma vez que acarreta uma maior dificuldade para a realização do diagnóstico e estadiamento dos tumores (CARVALHO et al., 2011).

Na expressão gênica comparativa entre GAPDH (controle), IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1, na linhagem celular de câncer de língua (SCC25) (**Fig. 15**), não encontramos diferença significativa entre a expressão de IGF1R/AKT1 ($p=0,731$) e entre IGF1R/SLC2A1 ($p=0,059$); ($p < 0,005$; teste de ANOVA). Entretanto, os nossos achados mostraram que o gene PK3CA, foi, notadamente, o mais hiperexpresso ($RQ=5,5$; $p= 0,0001$), comparado aos demais genes avaliados (IGF1R, AKT1, SLC2A). Foi encontrada diferença significativa de expressão entre IGF1R/PK3CA ($p= 0,0014$), entre PK3CA/AKT1 ($p=0,0003$) e entre AKT1/SLC2A1 ($p=0,004$); ($p < 0,005$; teste de ANOVA). Assim, a nossa análise está de acordo com o resultado de outros autores, que relatam que a via PI3K pode indicar a existência de conversas cruzadas com outras moléculas de sinalização (não avaliadas no nosso estudo, como por exemplo, Ras / Raf / Mek / Erk, p53), as quais podem também contribuir para a proliferação e sobrevivência de células tumorais ((KUNKEL *et al.*, 2003; KUNKEL *et al.*, 2007; IBRAHIM *et al.*, 2018).

Após a primeira etapa do trabalho, de avaliação das linhagens celulares, passamos para a segunda etapa que foi a análise das amostras clínicas dos pacientes. Estas amostras foram obtidas através de biópsia de mucosa oral dos pacientes do grupo mucosa saudável (MS) e de Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO). Com base nos nossos resultados das linhagens, fizemos uma correlação com os dados das amostras clínicas obtidas dos pacientes. Após a exclusão de 40/ 57 amostras de pacientes que não se enquadraram dentro dos critérios estabelecidos (ver na seção: “Dados Histopatológicos e Moleculares das Amostras de biópsias dos pacientes”) para o nosso estudo, [25 (MS)+15 (CCEO)=40 excluídos]; somente entraram para nossas análises genéticas 7 amostras do grupo controle (MS) e 10 para o grupo de câncer (CCEO).

Em relação aos parâmetros sociodemográficos, o perfil total da nossa amostra foi composto por 8 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino, com idades variando entre 21 e 90 anos; com relação aos hábitos no grupo CCEO, foram incluídos 4 tabagistas e 8 etilistas e nenhum indivíduo participante do grupo MS se declarou tabagista e/ou etilista.

Nossa amostra da população de CCEO apresentou uma distribuição similar para o gênero (M=5, F=5), contrastando com a literatura, que relata uma maior prevalência de CCEO nos homens (MS/INCA, 2020). Essa diferença nos

achados pode ter sido devido ao nosso pequeno tamanho amostral. Em relação à idade, o grupo CCEO foi muito mais idoso (média 70,5 anos) quando comparado ao grupo controle (média 41,71 anos). As idades do grupo CCEO variaram de 52 a 90 anos, enquanto o grupo MS variou de 21 a 64 anos. Sabemos que esse viés na distribuição da faixa etária entre os grupos, nos estudos genéticos pode contribuir para as diferenças encontradas na expressão dos transcritos. No entanto, torna-se bastante difícil obter grupos, controle e teste, homogêneos para todos os parâmetros sociodemográficos, uma vez que o nosso número final amostral seria ainda mais reduzido. Um dos motivos de nosso tamanho amostral ter sido pequeno foi, em grande parte, devido a utilizarmos critérios bem definidos para se tentar minimizar o viés de alteração de expressão gênica, devido ao próprio processo inflamatório da amostra, principalmente, em relação ao grupo controle (MS), uma vez que descartamos as amostras de biópsia de mucosa que apresentaram inflamação nos exames histopatológicos. Na literatura, o que encontramos em reação as amostras do grupo controle, é que basicamente cada investigador utiliza um sistema de critérios único e em muitas das vezes a questão da inflamação nas amostras, não são completamente analisadas ou até mesmo citadas, podendo levar a interpretações errôneas nos resultados (MAROM et al., (2001).

Em relação à localização anatômica tumoral, a língua foi a região mais afetada pelo CCEO com 60% dos casos, seguida pelo assoalho bucal (20%). Com relação à classificação histopatológica, o tipo mais encontrado foi o tumor moderadamente diferenciado (70% dos casos), seguido do subtipo bem diferenciado (20%) e apenas 1 paciente (10%) apresentou CCEO em estágio inicial no momento do diagnóstico. Esses achados foram semelhantes aos relatados na literatura, onde os critérios já são bem mais definidos e conseqüentemente mais fáceis de serem comparados (HABER et al. 1998; KUNKEL et al. 2003; OLIVER et al. 2004; FILLIES et al.2005).

Um fato importante dentro dos achados na classificação histopatológica é que apesar dos avanços verificados nas pesquisas, O CCEO ainda apresenta um diagnóstico tardio. Dado similar de outros autores (CHAI et al., 2019) e ressalta a importância do nosso estudo na tentativa de se identificar, de forma precoce, novos biomarcadores no processo de carcinogênese oral.

Adicionalmente, a prevalência dos hábitos (consumo de álcool e tabaco) de

nossa casuística foram semelhantes aos achados da literatura (KUNKEL et al., 2003; OLIVER et al., 2004; ECKERT et al., 2005).

Em seguida, para identificar a expressão de IGF1R, PK3CA, AKT1 e SLC2A1, fizemos a avaliação molecular e verificamos que não foi encontrada significância estatística para IGF1R entre o grupo de mucosa saudável e o grupo de CCEO ($p < 0,084$; teste de Mann-Whitney). Confrontando nossos dados com a literatura, nossos dados estão de acordo com os autores GAO et al. (2014), uma vez que nossa casuística de pacientes não apresentou nenhum caso de CCEO classificado, pelo grau de diferenciação histopatológica, como tumor pouco diferenciado (PD), estando a maioria dos nossos pacientes classificados como tumor moderadamente diferenciados (MD), pois estes autores mostraram que o aumento na expressão da proteína receptora IGF1R em portadores de CCEO está associada ao baixo grau de diferenciação tumoral.

Os genes PK3CA e AKT1 no grupo dos pacientes com CCEO, mostraram-se hiperexpressos quando comparados ao grupo de indivíduos com mucosa saudável. Entretanto, não foi encontrada significância estatística para estes genes entre o grupo de mucosa saudável e o grupo de CCEO ($p < 0,084$; teste de Mann-Whitney).

Em seguida, fizemos a avaliação da expressão de SLC2A1 (GLUT 1) e verificamos que apesar de termos encontrado hiperexpressão em 70% dos pacientes do grupo CCEO, não houve significância estatística para este achado.

Para entendermos esse resultado, podemos pensar em duas hipóteses, a primeira seria que não encontramos significância estatística em função do nosso reduzido número amostral e por ter havido uma variação muito grande nos valores de *fold change* entre os pacientes do grupo de CCEO (**Figuras 15B a 15D**), a segunda hipótese em relação ao GLUT1, seria que haveriam outras possíveis proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) que estariam desempenhando esse papel de transportar a glicose para o interior das células tumorais no CCEO. Para isso, fomos buscar na literatura uma possível explicação para os nossos achados. GHANAVAT et al. (2018) relataram a possível participação de outras GLUTs na fisiopatologia dos tumores e relataram que a GLUT1 e a GLUT3 não são suficientes para o transporte de glicose nos cânceres, e que possivelmente outros GLUTs intracelulares como o GLUT12, parecem desempenhar um papel

essencial no metabolismo dos tumores. Esse achado é de extrema relevância clínica para os casos de CCEO, pois poderia explicar o seu diagnóstico tardio por PETSCAN, assim como a dificuldade de radiosensibilização dos tumores por 5-sisplatina e por fim a sua baixa sobrevida ao tratamento.

Neste contexto, a maioria dos estudos, parece seguir a linha de raciocínio de que a GLUT1 é largamente encontrada nos tecidos fetais em crescimento, e nos tecidos adultos tem sua expressão diminuída, sendo responsável apenas pelo nível basal de glicose celular (WATSON et al., 2004). No entanto, curiosamente, em um estudo mais recente, pesquisadores (SHAHROUZIAN et al., 2020), avaliaram outra proteína da família das GLUTs. Observaram que expressão de GLUT12 foi detectada em vilosidades de células do músculo liso vascular e células do estroma viloso, sugerindo que há um padrão específico para a expressão de GLUT12 na placenta humana no primeiro trimestre (devido ao alto crescimento e proliferação celular no primeiro trimestre gestacional). Seguindo esta nova importante descoberta, sobre as células em crescimento e proliferação, podemos pensar que as células tumorais também possam utilizar outras proteínas transportadoras de glicose e que ainda não foram devidamente estudadas.

Adicionalmente, pouco se sabe sobre as outras isoformas de GLUT na efetividade do PET SCAN., assim como da relação das outras proteínas efetoras da via glicolítica como: IGF1R, PI3K e AKT. Alguns estudos em pacientes com neoplasia pulmonar maligna, por exemplo não encontraram associação estatística entre as expressões GLUT1 e GLUT3 com a captação de FDG no exame de PET SCAN (MAROM et al., 2001; TIAN et al., 2004). A expressão de GLUT3, em alguns trabalhos, ocorreu somente quando GLUT1 foi expresso, e sempre a expressão de GLUT3 era mais fraca. A proteína GLUT3, segundo MAROM et al. (2001), pareceu ser um evento tardio no processo de progressão neoplásica

Desta forma, são necessários mais estudos sobre as expressões das proteínas que modulam a via glicolítica para associar o aumento da captação da FDG/glicose pelos tumores. Embora se tenha observado que os subtipos da família de transportadores de glicose (GLUTs) sejam responsáveis pelo aumento do transporte de glicose e de FDG necessário para preencher o metabolismo anormal requerido pelas células neoplásicas (TIAN et al., 2004), até o momento, poucos estudos têm avaliado a expressão das outras proteínas sinalizadoras

como IGF1R, PI3K e AKT em carcinoma de células escamosas oral.

Embora o número de casos nesse presente trabalho tenha sido pequeno, a série de dados clínico-patológicos representa bem o que a literatura retrata como característica de carcinomas de células escamosas orais e em relação à localização tumoral (KUNKEL et al., 2003; OLIVER *et al.*, 2004; ECKERT et al., 2005). Adicionalmente, os dados sociodemográficos obtidos também foram semelhantes aos relatados na literatura, em relação à idade (HABER et al. 1998; KUNKEL et al. 2003; OLIVER et al. 2004; FILLIES et al. 2005) e aos hábitos (consumo de álcool e tabaco).

Em nosso estudo, é importante mencionar, que no grupo de pacientes CCEO, conseguimos detectar o aumento de expressão de pelo menos 3 dos 4 genes associados à ativação da via glicolítica, em 6 pacientes num total de 10 avaliados (6/10), o que sugere que eles compartilham vias carcinogênicas semelhantes e provavelmente apresentam a via glicolítica ativada. Entretanto, outros métodos de análises, como por exemplo o *western blot*, seriam fundamentais para a comprovação dessa hipótese.

Por outro lado, nossos resultados também mostraram pacientes hipoexpressos tanto no grupo MS, como no grupo CCEO, provavelmente por inibição da via IGF1R/PI3K/AKT/GLUT1 por algum miRNA supressor de IGF1R. Esse achado foi relatado na literatura por autores que avaliaram essa via glicolítica em amostras de pacientes e linhagens celulares de carcinoma hepatocelular. (HU et al., 2019).

Além disso, outro achado relevante foi que em uma amostra de mucosa oral considerada como clínica e histologicamente normal, foi observado um aumento de expressão em três genes. Esta alteração molecular observada, acende um alerta para que este paciente seja considerado um potencial candidato para avaliações clínicas periódicas de sua cavidade oral, assim como passar por uma avaliação clínica médica. A hipótese seria que tais alterações moleculares relacionadas à via glicolítica, poderiam antecipar uma possível desordem metabólica sistêmica, ou até mesmo o aparecimento clínico de desordens orais potencialmente malignas (leucoplasia e/ou eritroplasia, por exemplo). Esta conduta poderia impedir a evolução dessas células para um fenótipo inflamatório,

ou até mesmo maligno.

Dentro das limitações metodológicas do presente estudo, e de acordo com outros dados da literatura, não foi observado um aumento de expressão de GLUT1 significante nesta amostra particular de pacientes portadores de CCEO.

7. CONCLUSÕES

- Uma expressão similar de IGF1R foi encontrada nas linhagens celulares e nas amostras dos pacientes.
- A via canônica PI3K/AKT mostrou-se hiperexpressa na linhagem tumoral (SCC25), comparada à linhagem controle (HaCaT); sendo que o gene PK3CA foi o mais hiperexpresso (RQ=5,5) em relação aos demais genes na linhagem tumoral (SSC25). Não foi observada correlação significativa para PI3K/AKT nas amostras dos pacientes portadores de CCEO.
- A expressão de GLUT1 mostrou-se diminuída na linhagem SCC25 comparada à linhagem controle (HaCaT). Não foi observada correlação significativa para a expressão de GLUT1 nas amostras dos pacientes portadores de CCEO.
- A hiperexpressão de pelo menos 3 dos 4 genes avaliados foi observada em 6 dentre os 10 pacientes do grupo CCEO, sugerindo, em nossa amostra, uma possível ativação da via glicolítica e na sua participação no processo de carcinogênese oral. Desta forma, torna-se importante realizar o acompanhamento destes pacientes com o propósito de detecção de possíveis recidivas e metástases à distância.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Airley, R.; Loncaster, J.; Davidson, S.; Bromley, M.; Roberts, S.; Patterson, A.; Hunter, R.; Stratford, I.; West, C. Glucose transporter GLUT 1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7, 928–934.

Akanuma D,Uzawa N, Oshida MA,Negishi A,Amagasa T,Ikeuchi T.Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncology.* 1999;35(5):476-83.

Albers AE, Strauss L,Liao T, Hoffmann TK,Kaufmann AM.Tcell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer.*Clinical & Developmental Immunology.* 2010; 2010:236378.

Amorin, MO; Vieira, MM; Gonçalves, IV; Rhana, Paula; Prates, AL Câncer de mama:Reprogramação do metabolismo tumoral. *Rev Med Minas Gerais* 2018; 28.

Ayala FR,Rocha RM,Carvalho KC,Carvalho AL,da Cunha IW, Lourenço SV, *et al.* GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules.* 2010;15(4):2374-87.

Azad N, Kumari Maurya M, Kar M, Goel MM, Singh AK, Sagar M, Mehrotra D,Kumar, V. Expression of GLUT-1 in oral squamous cell carcinoma in tobacco and non-tobacco users. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(1):24-30

Baer SC, Casaubon L, Younes M. Expression of the human erythrocyte glucose transporter GLUT-1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 37:575-7, doi: 10.1016/S0190-9622(97)70174-9.

Baer, S.; Casaubon, L.; Schwartz, M.R.; Macrogliese, A.; Younes,M. GLUT 3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope* 2002, 112, 393–396. *Molecules* 2010, 15 2386.

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc Natl Acad Sci USA.*

1986;83: 5784-8, doi: 10.1073/pnas.83.16.5784.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.

Baylin, S. DNA methylation and epigenetic mechanisms of carcinogenesis. *Dev Biol (Basel)*.2001; v106, p.85-7.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 7a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

Burstein, D.E.; Nagi, C.; Kohtz, D.S.; Lumerman, H.; Wang, B.Y. Immunohistochemical detection of GLUT1, p63 and phosphorylated histone H1 in head and neck squamous intraepithelial neoplasia: evidence for aberrations in hypoxia-related, cell cycle-and stem – cellregulatory pathways. *Histopathology* 2006, 48, 708–716.

Bohula EA, Playford MP, Macaulay VM. Targeting the type 1 insulin-like growth factorreceptor as anti-cancer treatment. *Anti-Cancer Drugs*. 2003;14(9):669-82.

Brown RS, Wahl RL. Overexpression of GLUT-1 glucose transporter in human breast cancer: an immunohistochemical study. *Cancer*. 1993; 72:2979-85, doi: 10.1002/1097- 0142(19931115)72:10<2979: AID-CNCR2820721020>3.0.CO;2-X.

Cairns RA Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature ReviewsCancer*. 2011;11(2):85-95.

Chaudhary M, Bajaj S, Bohra S, Swastika N, Hande A. The domino effect: Role of hypoxia in malignant transformation of oral submucous fibrosis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2015; 19:122-7.

Chamorro, AC; Ambrosio, EP; Rosa, AD. Micro-RNAs e câncer: abordagens e perspectivas *Rev Pesq Saúde*,2015 16(2): 119-124.

Chen *et al*. Determination of Pyruvate Metabolic Fates Modulates Head and Neck Tumorigenesis. *Neoplasia*, 2019;21(7): 641–652.

Cruz, ACS; Franzolin,SOB Pereira; ACP; Beijo, LA; Hanneman, JAC; Cruz, JRS Carcinoma de Células Escamosas da Boca: Concordância Diagnóstica em Exames Realizados no Laboratório de Anatomia *Revista Brasileira de Cancerologia* 2012; 58(4): 655-661.

Chai,AWY; Lim, KP; Cheong, SC *Seminars in Cancer Biology*,
<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.09.011> Article in Press

Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2002;8(11):RA258-67.

Daniel, FI; Granato R; Grando, LJ;Lückmann, SM Fabro Carcinoma de células escamosas em rebordo alveolar inferior: diagnóstico e tratamento odontológico de suporte. *J Bras Patol Med Lab* ,2006;42 :4 279-283

Deberardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; 7(1):11

Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 2003; 17(4): 438-442.

Estilo CL, Oc P, Talbot S, *et al*. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*. 2009; 9:11.

Eckert, A. W., Kappler, M., Große, I., Wickenhauser, C., & Seliger, B. Current Understanding of the HIF-1-Dependent Metabolism in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2020;21(17),6083. <https://doi.org/10.3390/ijms21176083>

Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head & Neck Oncology*. 2009; 1:5.

Fei X, Qi M,Wu B, Song Y,Wang Y,Li T. MicroRNA-195-5p suppresses glucose uptake and proliferation of human bladder cancer T24 cells by regulating GLUT3 expression. *FEBS Letters*. 2012;586(4):392-7.

Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head and Neck Oncol* 2009; 1:11.

Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*; 2004; (4) 891–899.

Gjedde A. Glucose metabolism. In: Wagner H, editor. Principles and practice of nuclear medicine. 2th ed. Philadelphia: W B Saunders; 1995; p.56-62.

Ghanavat, M., Shahrouzian, M., Deris Zayeri, Z., Banihashemi, S., Kazemi, S. M., & Saki, N. Digging deeper through glucose metabolism and its regulators in cancer and metastasis. *Life Sciences*. 2021; 264, 118603. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118603.

Gao L, Wang X, Wang X, Zhang L, Qiang C, Chang S, et al. IGF-1R, a target of let-7b, mediates crosstalk between IRS-2/Akt and MAPK pathways to promote proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(9):2562-74.

Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006;16(1):4-9.

Hatziapostolou M, Polytarchou C, Iliopoulos D. miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2013;24(7):361-73.

Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008; 134(5):703-7.

Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930):1029-33.

Hu Y; Yang Z, Bao D, Ni JS, Lou J. *Pathol Res Pract*. 2019;215(12):152674. doi:10.1016/j.prp.2019.152674.

Ito K, Shimoji K, Miyata Y, Kamiya K, Minamimoto R, Kubota K, Okasaki M, Morooka M, Yokoyama J. Prognostic value of post-treatment 18F-FDG PET/CT for advanced head and neck cancer after combined intra-arterial chemotherapy and radiotherapy. *Chin J Cancer Res* 2014;26(1):30-37. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2014.01.06

Jadhav KB, Gupta N. Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise. *North American Journal of Medical Sciences*. 2013;5(12):671-9.

Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME. Insulin-like growth factor- I resistance. *Endocrine Rev*. 1998;19(5):625-46.

Kaikkonen, MU; Lam, MT; Glass, CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res.*2011; v.90, n.3, p.430-40.

Klepper J, Voit, T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain – a review. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 95–304

Kondaveeti Y, Reed IKG, White BA. Epithelial–mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer Letters* 2015; 364:44–58.

Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med* 1992; 33:1972-80.

Kunkel, M.; Reichert, T.E.; Benz, P.; Lehr, H.A.; Jeong, J.H.; Wieand, S.; Bartenstein, P.; Wagner, W.; Whiteside, T.L. Over expression of GLUT 1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 15, 1015–1024.

Kunkel M, Moergel M, Stockinger M, Jeong JH, Fritz G, Lehr HA, et al. Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncology.* 2007;43(8):796-803.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435 (7043):834-8.

Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 2009; 4: 199-227.

Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform.* 2012; 15(1): 1-19.

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005; 24:1477–80.

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How does it Benefit Cancer Cells? *Trends BiochemSci* 2016; 41(3): 211-218.

Lourenço, S. Q. C, et al. Classificação Histopatológica para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de sistemas propostos. Rev. brasileira de Cancerologia, 2007; 53: (3): 325-333.

Liu P, Kong F, Wang J, Lu Q, Xu H, Qi T, et al. Involvement of IGF-1 and MEOX2 in PI3K/Akt1/2 and ERK1/2 pathways mediated proliferation and differentiation of perivascular adipocytes. Experimental Cell Research. 2015;331(1):82-96.

Lund E; Gutinger S; Calado A, Dahlberg JE; Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science,2004.303(5654):95-8.

Machado, UF Arq Bras Endocrinol Met 1998,42(6):413-421.

Markwell, S.M.; Weed, S.A. Tumor and Stromal-Based Contributions to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Invasion. Cancers 2015, 7, 382-406. <https://doi.org/10.3390/cancers7010382>

Ministério da Saúde. Estatísticas de Câncer 2020. <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>

Medina PP, Slack FJ. microRNAs and cancer. Cell Cycle,2008; 7(16): 2485-2492.

MEDINA, R.A., OWEN, G. Glucose e transporters: expression, regulation and cancer. Biol.Res. 2002.;35 1.

Mellanen, P.; Minn, H.; Grenman, R.; Harkonen, P. Expression of glucose transporters in headand-neck tumors. Int. J. Cancer 1994, 56, 622–629.

Moller, HG; Rasmussen, AP; Andersen, HH; Johnsen, KB; Henriksen, M; Duroux, MA systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. Mol Neurobiol. 2013;47(1):131-44.

Mochizuki, T.; Tsukamoto, E.; Kuge, Y.; Kanegae, K.; Zhao, S.; Hikosaka, K.; Hosokawa, M.; Kohanawa, M.; Tamaki, N. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. J. Nucl. Med. 2001, 42, 1551–1555.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. FEBS J. 2007; 274(6):1393-418.

Mueckler, M.; Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 2013, 34, 121–138.

Nallanthighal, S., Heiserman, J. P., & Cheon, D. J. (2019). The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 86. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00086>

Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine Rev.* 2001;22(6):818-35.

Nakashiro K, Tanaka H, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hara S, Onodera J, Fujimoto I, Hino S, Hamakawa H. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015;47(4):1273-81.

Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, et al. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res.* 1992;52:3972-9.

Pałasz, P, Adamski, Magdalena, L; Chrząstek, G; Starzyńska, A; Studniarek, M Contemporary Diagnostic Imaging of Oral Squamous Cell Carcinoma – A Review of Literature *Pol J Radiol.* 2017; 82: 193–202.

Peltanova, B; Raudenska, M; Masarik, M Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review *Molecular Cancer.* 2019,18:63.

Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005; 24: 7435-7442.

Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer.* 2008;8(12):915-28.

Poulsen RC, Knowles HJ, Carr AJ, Hulley PA. Cell differentiation versus cell death: extracellular glucose is a key determinant of cell fate following oxidative stress exposure. *Cell Death & Disease.* 2014; 5:1074.

Haber, R.S.; Rathan, A.; Weiser, K.R.; Pritsker, A.; Itzkowitz, S.H.; Bodian, C.; Slater, G.; Weiss, A.; Burstein, D.E. GLUT 1 Glucose transporter Expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 1998, 17, 34–40.

Kato, H.; Takita, J.; Miyazaki, T.; Nakajima, M.; Fukai, Y.; Masuda, N.; Fukuchi,

M.; Manda, R.; Ojima, H.; Tsukada, K.; Kuwano, H. GLUT 1 glucose transport expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 2002, 22, 2635–2639.

Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett.* 2014;8(1):7-11. doi:10.3892/ol.2014.2103

Sandulache, VC; Myers, JN, Altered metabolism in head and neck squamous cell carcinoma: an opportunity for identification of novel biomarkers and drug targets *Head Neck.* 2012; 34(2).

Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004;28(5):364-71.

Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 1995;45(6):352-68.

Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(12):3930-42.

Tran, Q., Lee, H., Park, J., Kim, S. H., & Park, J. (2016). Targeting Cancer Metabolism- Revisiting the Warburg Effects. *Toxicological research*, 32(3), 177–193. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.3.177>

Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako T, Yamada Y, Tatarano S, et al. Tumor-suppressive microRNA-1291 directly regulates glucose transporter 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Science.* 2013;104(11):1411-9.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20(5):515-24.

Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5:4-9.

Vincent K, Pichler M, Lee GW, Ling H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int J Mol Sci*, 2014;15(8): 14475-14491.

Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, et al. Over-

expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170:223-30, doi: 10.1016/0006-291X(90)91263-R.

Ward CW, Garrett TP, McKern NM, Lou M, Cosgrove LJ, Sparrow LG, et al. The three-dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. *Mol Pathol.* 2001;54(3):125-32.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology.* 1927;8(6):519-530.

Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology.* 2007;13(20):283.

Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* 2007; 8(2):113–28.

Zhao, L; Peter K. Vogt, PK Class I PI3K in oncogenic cellular transformation *Oncogene.* 2008;18; 27(41): 5486–5496

9. ANEXOS

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa

O PAPEL DOS miRNAs NAMODULAÇÃO DAS VIAS GLICOLÍTICAS ENVOLVIDAS NA ONCOGÊNESE ORAL.

Você foi selecionado por ordem de atendimento e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição Unigranrio.

O objetivo principal deste estudo é analisar o perfil de expressão de moléculas (miRNAs) reguladores de proteínas envolvidas no desenvolvimento de câncer oral em amostras de biópsias da mucosa oral e sangue periférico em indivíduos portadores de carcinoma de células escamosas oral comparados a uma população controle (saudável).

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder amostras de sua biópsia, que é o material que será retirado para diagnóstico patológico, assim como uma amostra de sangue.

Os riscos relacionados com sua participação são pequenos, porque todos os procedimentos realizados são rotineiros e seguem rigorosamente os protocolos de biossegurança. Ou seja, utilizamos materiais descartáveis e instrumentais esterilizados.

Os benefícios relacionados com a sua participação são contribuição para estudos que ajudem a compreender o desenvolvimento do câncer oral e de seu diagnóstico precoce.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Todas as amostras coletadas serão codificadas e os pesquisadores manterão sigilo sobre seus dados pessoais.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Carina Maciel da Silva Boghossian (e-mail: carinabogho@yahoo.com.br; telefone: 21-972009913) e Cláudia Maria Pereira (e-mail: claudemarie_br@yahoo.com.br; telefone: 21-999113269).

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na R. Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733, ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br.

Sujeito da pesquisa

Rio de Janeiro, de de 20

Pai / Mãe ou Responsável Legal

ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

5

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DOS miRNAs NA MODULAÇÃO DAS VIAS GLICOLÍTICAS ENVOLVIDAS NA ONCOGÊNESE ORAL

Pesquisador: Carina Maciel Silva Boghossian

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60778916.3.0000.5283

Instituição Proponente: ASSOCIACAO FLUMINENSE DE EDUCACAO

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.796.047

Apresentação do Projeto:

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificantes capazes de regular a expressão gênica. Em tumores malignos, estas moléculas apresentam expressão alterada, desempenhando funções oncogênicas ou supressoras de tumor. Vários fatores, como tabagismo, consumo de álcool e infecção por papiloma vírus humano (HPV) podem influenciar o perfil de expressão destas moléculas. Um dos fatores que podem alterar este perfil de expressão de miRNAs no câncer é a infecção pelo HPV. O objetivo principal deste estudo é analisar o perfil de expressão dos miRNAs reguladores de proteínas envolvidas na oncogênese por meio das vias glicolíticas em amostras de biópsias da mucosa oral e sangue periférico, por PCR array, de indivíduos portadores de carcinoma de células escamosas oral - CCEO comparados a uma população controle, constituída por indivíduos saudáveis. Será determinada a presença do HPV, a expressão de proteínas oncogênicas/supressoras relacionadas ao metabolismo em linhagens de CCEO após transfeção com mímicos/inibidores de miRNAs, e a identificação de assinaturas de miRNAs teciduais e circulantes, que estejam envolvidos com a via glicolítica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo principal deste estudo será analisar o perfil de expressão dos miRNAs reguladores de

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

Continuação do Parecer: 1.796.047

proteínas envolvidas na oncogênese por meio das vias glicolíticas em amostras de biópsias da mucosa oral e sangue periférico, por PCR array, de indivíduos portadores de CCEO comparados a uma população controle, constituída por indivíduos saudáveis.

Objetivo Secundário:

Deteção da presença do HPV nas biópsias de CCEO por PCR convencional; Identificação de assinaturas de miRNAs teciduais e circulantes, que estejam envolvidos com a via glicolítica, com a finalidade de determinar candidatos potenciais para a obtenção de uma plataforma de diagnóstico precoce do CCEO; Analisar funcionalmente os miRNAs que se apresentarem mais alterados através de ensaios de transfecção in vitro com linhagens de CCEO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, pois todos os procedimentos seguirão rigoroso critérios de biossegurança tanto clínicos quanto laboratoriais.

Os procedimentos cirúrgicos empregados na obtenção das amostras são protocolares nos casos das biópsias de CCEO e no caso da remoção de tecido gengival saudável por necessidade reabilitadora/periodontal.

Benefícios:

Com os resultados deste trabalho um maior conhecimento será obtido sobre o comportamento epigenético sobre o metabolismo das células de CCEO.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é um tumor maligno responsável por uma alta morbidade e mortalidade na população mundial. Além de mudanças no estilo de vida, seu prognóstico se relaciona a outros aspectos, como a presença de comorbidades, estadiamento tumoral e alterações nas vias moleculares. Modificações em vias metabólicas, como, por exemplo, a via glicolítica e seus mediadores, têm sido descritas no CCEO, relacionados ao grau de agressividade e invasão do mesmo. A influência dos microRNAs (miRNAs) na regulação destas moléculas na carcinogênese oral ainda é pouco conhecida. Com isto, será construída uma plataforma que possibilitará o diagnóstico precoce do CCEO, o que contribuirá enormemente para o atendimento da população da Baixada Fluminense, atendida na Unigranrio.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.796.047

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados como determina a Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Recomendações:

Recomendo que os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, sejam divulgados em eventos científicos e publicações na forma de artigos e textos em revista indexadas pelo Qualis

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa apresenta relevância científica e atende aos requisitos da Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 27 de outubro de 2016. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,
CEP/Unigranrio.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_795099.pdf	29/09/2016 14:49:01		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Sediadas2015_assinada.pdf	21/09/2016 20:32:33	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	21/09/2016 20:30:10	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_para_CEP_Edital_Sediadas2015.docx	20/09/2016 15:19:37	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
 Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
 UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
 Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.796.047

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Sediadas_2015.doc	20/09/2016 15:13:10	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito
Orçamento	Orcamento_de_Projeto_Sediadas2015C EP.pdf	20/09/2016 15:12:06	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito
Cronograma	cronograma_Sediadas2015.docx	20/09/2016 15:11:06	Carina Maciel Silva Boghossian	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 27 de Outubro de 2016

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

ANEXO 3 – PRONTUÁRIO-FICHA CLÍNICA PARA PROJETO DE PESQUISA I

FICHA CLÍNICA PARA PROJETO DE PESQUISA



UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO

Número de estudo: _____ Data do exame: _____
Nome do paciente: _____
Idade: _____ Data de nascimento: _____ Gênero: () M () F
Profissão: _____ Escolaridade () Fundamental () Médio () Superior
Naturalidade: _____ Estado civil: () solteiro () casado () divorciado () viúvo
Raça: () Branca () Parda () Negra () Outra _____
Endereço: _____ Bairro: _____
Cidade: _____ UF _____ Tel.: _____ Celular: _____
Email: _____
Residência anterior a atual (cidade/ UF) _____

HISTÓRIA CLÍNICA

Queixa principal: _____
História da doença atual: _____

História familiar de câncer () Não () Sim () Desconhece

Grau de parentesco: () Pai () Mãe () Irmão () Outro _____

Sofre ou já sofreu de alguma das seguintes desordens? () Não () Sim

<input type="checkbox"/>	D. cardíacas congênitas	<input type="checkbox"/>	Diabetes	<input type="checkbox"/>	Hepatite ()A ()B ()C () () medicamentosa
<input type="checkbox"/>	Doenças cardíacas	<input type="checkbox"/>	Artrite	<input type="checkbox"/>	Doença renal
<input type="checkbox"/>	Hipertensão arterial	<input type="checkbox"/>	Portador de HIV	<input type="checkbox"/>	Alergia
<input type="checkbox"/>	Endocardite bacteriana	<input type="checkbox"/>	DST	<input type="checkbox"/>	Doenças respiratórias
<input type="checkbox"/>	Febre reumática	<input type="checkbox"/>	Alterações sanguíneas	<input type="checkbox"/>	Desordem auto-imune
<input type="checkbox"/>	Desordens neurológicas	<input type="checkbox"/>	Desordens gástricas	<input type="checkbox"/>	Outros

Já sofreu transfusão sanguínea? () Não () Sim

Quando e por quê? _____

Uso de medicamentos: _____

Tabagismo () Não () Sim () Ex-tabagista – tempo sem fumar _____

Tipo: _____ Tempo: _____ Quantidade (dia): _____ Marca: _____

Etilismo () Não () Sim () Ex-etilista- há quanto tempo? _____

Tipo: _____ Tempo: _____ Frequência _____

Prática de sexo oral: () Sempre () Nunca () Às vezes

Uso de preservativo: () Sempre () Nunca () Às vezes

Uso de drogas: () Não () Sim. Qual? _____

Já passou pela menopausa? _____

EXAME CLÍNICO

Aspectos clínicos: () pápula () nódulo () vesícula () bolha () erosão () ulceração

() mancha () fístula () Intraóssea () tumefação () outros _____

Tamanho: _____ Cor: _____ Base: _____ Consistência: _____

Limites: _____ Bordas: _____ Dor: _____ Superfície: _____

Tempo de evolução: _____

Localização:

Língua: () ponta () corpo () ponta e corpo () borda lateral () sulco peve-lingual

() assoalho de boca () palato duro () palato mole () tuberosidade

() gengiva (região _____) () rebordo alveolar (região _____)

() trigono retromolar () direito () esquerdo

() fundo de vestibulo () superior () inferior () direito () esquerdo

() mucosa labial () superior () inferior

() mucosa jugal () direita () esquerda

Outras: _____

Linfonodos palpáveis () Sim () Não

CIRURGIA

Data: _____ Tipo _____

Hipótese diagnóstica: _____

Crêterios de exclusão - CCEO	Crêterios de exclusão – Mucosa normal
<ul style="list-style-type: none">- Tratamento prêvio para CCEO- Radiação ou quimioterapia prêvias- História de outras neoplasias na região de cabeça e pescoço- Tumores múltiplos simultâneos- Lesão diferente do CCEO- Diabetes	<ul style="list-style-type: none">- Menor que 18 anos- Infamação

LAUDO HISTOPATOLOGICO: _____

Responsável pela coleta: _____

ANEXO 4 – PRONTUÁRIO-FICHA CLÍNICA PARA PROJETO DE PESQUISA II



PROJETO DE PESQUISA - CURSO DE ODONTOLOGIA

FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Telefone: _____ Estado civil: _____ Profissão: _____

Sua cor ou raça é: () 1 - Branca () 2 - Preta () 3 - Amarela () 4 - Parda () 5 - Indígena

Sua renda familiar é: () 1. Menor de 1 salário mínimo () 2. de 1 salário mínimo

() 3. de 1 a 2 salários mínimos () 4. de 2 a 3 salários mínimos () 5. mais de 3 salários mínimos

Nível de escolaridade: Sabe ler e escrever? () Sim () Não

Qual é o curso mais elevado que cursou, no qual concluiu pelo menos uma série? _____

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____

2. Data do último exame médico: _____

3. Você já foi hospitalizado(a)? () Sim () Não () Não sei

4. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5. Você está sob cuidados médicos? () Sim () Não () Não sei

6. Em caso de resposta positiva, qual o motivo?

7. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:

8. Doenças congênitas do coração? () Sim () Não () Não sei

9. Doenças cardíacas (ex.: enfarte, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)? () Sim () Não () Não sei

10. Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? () Sim () Não () Não sei

11. Inchaço nos pés ou nos tornozelos? () Sim () Não () Não sei

12. Dor, pressão ou mal-estar no peito? () Sim () Não () Não sei

13. Febre reumática? () Sim () Não () Não sei

14. Endocardite bacteriana? () Sim () Não () Não sei

15. Sopro no coração? () Sim () Não () Não sei

16. Desmaios convulsões ou epilepsia? () Sim () Não () Não sei

17. Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? Sim Não Não sei
18. Tratamento nervoso? Sim Não Não sei
19. Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? Sim Não Não sei
20. Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? Sim Não Não sei
21. Artrite ou dores articulares? Sim Não Não sei
22. Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? Sim Não Não sei
23. Diabetes? Sim Não Não sei
24. Demora na cicatrização dos ferimentos? Sim Não Não sei
25. Você urina mais de seis vezes por dia? Sim Não Não sei
26. Você sente sede a maior parte do tempo? Sim Não Não sei
27. Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemesa, hemotúria, epistaxes)? Sim Não Não sei
28. Úlceras ou outros problemas estomacais? Sim Não Não sei
29. Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? Sim Não Não sei
30. Você já sofreu transfusão sangüínea? Sim Não Não sei
31. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? Sim Não Não sei
32. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? Sim Não Não sei
33. Você teve uma variação recente no apetite? Sim Não Não sei
34. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? Sim Não Não sei

Somente para mulheres

35. Você já passou pela menopausa? Sim Não Não sei
36. Você está tomando algum hormônio? Sim Não Não sei

Questionário Odontológico

1. Nome do seu dentista: _____ Telefone: _____

2. Freqüência de visitas ao dentista: _____

3. Data da última visita ao dentista: _____

História das extrações:

4. Causa provável das extrações: _____

5. Data da última extração: _____

6. Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária? Sim Não Não sei
7. Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? Sim Não Não sei
8. Suas gengivas sangram? Sim Não Não sei
9. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUNA? Sim Não Não sei
10. Você já fez algum tratamento periodontal? Sim Não Não sei
11. Em caso de resposta positiva, qual, quando? _____
12. Você já teve algum tratamento ortodôntico? Sim Não Não sei
13. Em caso de resposta positiva, listar data do tratamento, condição tratada, e tempo de duração do tratamento:

14. Você já fez algum tratamento de canal? Sim Não Não sei
15. Em caso de resposta positiva, data do tratamento de canal: _____
16. Você usa ou já usou alguma prótese dentária? Sim Não Não sei
17. Em caso de resposta positiva, citar idade da prótese em uso: _____
18. História dentária familiar:
- a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? Sim Não Não sei
- b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? Sim Não Não sei
- c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: _____
19. Você costuma respirar pela boca? Sim Não Não sei
20. Você range os dentes? Sim Não Não sei
21. Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
22. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? Sim Não Não sei
23. Você usa fio dental? Sim Não Não sei
24. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários? Sim Não Não sei
25. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso:

26. Você fuma? Sim Não
27. Em caso de resposta positiva, quantos cigarros por dia, há quanto tempo? _____
28. Caso você seja ex-fumante, há quanto tempo parou, por quanto tempo fumou, e quantos cigarros costumava fumar? _____

Assinatura

____/____/____

Data