

# **BIOTRANS**

Programa de Pós-Graduação em  
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



## **ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO PERFIL METABÓLICO DE PACIENTES COM CARCINOMA ORAL ATRAVÉS DA METABOLÔMICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

**Lívia Monteiro de Avellar**

**Duque de Caxias**

**2021**

**Lívia Monteiro de Avellar**

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO PERFIL METABÓLICO DE PACIENTES  
COM CARCINOMA ORAL ATRAVÉS DA METABOLÔMICA POR  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Júnior

**Duque de Caxias**

**2021**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO

**A949e** Avellar, Livia Monteiro de.  
Estudo de alterações no perfil metabólico de pacientes com carcinoma oral  
através da metabolômica por ressonância magnética nuclear / Livia Monteiro de  
Avellar. – Duque de Caxias, 2021.

60 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do  
Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde,  
2021.

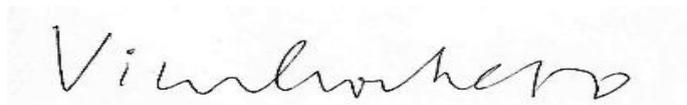
“Orientadores: Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Júnior”.

Referências: f. 52-60.

**LÍVIA MONTEIRO DE AVELLAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação (PPG-BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.



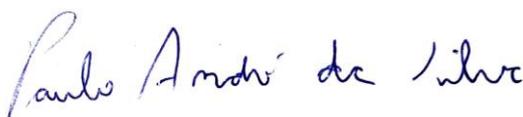
---

**Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto** (Orientador)  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



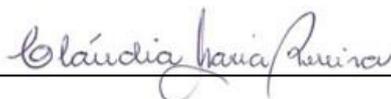
---

**Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Junior** (Orientador)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ



---

**Prof. Dr. Paulo André da Silva**  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Maria Pereira**

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dedico este trabalho às pessoas que se fizeram presente durante esta longa jornada, me apoiando e contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. Dentre todos destaco o meu pai Ubiracy L. Avellar meu maior incentivador.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e homem que  
adquire conhecimento”.

(Provérbios 3:13)

## **AGRADECIMENTOS**

Em meio a uma pandemia tão violenta e devastadora conseguir alcançar o fim do mestrado é uma grande vitória, por isso a gratidão deve ser uma das coisas mais relevantes nesse momento.

Primeiramente agradeço a Deus, pois sempre me abençoou colocando pessoas maravilhosas no meu caminho, e nEle também encontrei força, paciência, saúde, fé e esperança para dar seguimento a minha vida acadêmica. Ele merece todo mérito de minhas conquistas e vitórias.

Agradeço as primeiras e melhores referências da minha vida, os meus pais Ubiracy e Cláudia que sempre investiram em mim, preocupados em formar um ser humano bom, de caráter e honesto. E nesta etapa mesmo sabendo que não seria fácil, acreditaram que valeria a pena se sacrificar para a realização do meu sonho. Agradeço também a minha irmã e grande amiga Aline que nunca me deixou desistir, sabendo que eu conseguiria, ao meu cunhado que considero meu irmão Paulo César também me ajudou muito. Eu sei que sem vocês isso não seria possível, amo vocês!

Ao meu marido Mailon, sempre me apoiou nas minhas escolhas e me incentivou a continuar. No momento de desespero sempre está presente com o intuito de me acalmar com palavras de carinho e com muito amor, é meu ombro amigo, cúmplice, companheiro de vida. Obrigada meu amor por estar disposto a cuidar da gente e também me mostrar que um relacionamento é uma parceira contínua e que a reciprocidade tem que ser existente em todos os momentos. Te amo!

Aos meus orientadores Dr. Vivaldo Moura Neto e Dr. Gilson Costa os Santos Junior, eu sou privilegiada em ter sido orientada por eles, devo parte da minha formação e o desenvolvimento deste trabalho a eles. São excelentes profissionais, muito pacientes, generosos, competentes, e solícitos. Eu nunca esquecerei o que fizeram por mim. No momento que mais precisei me deram apoio e compreensão. Só posso agradecer por todo ensinamento e todos os conselhos. Muito obrigada por me permitir fazer parte da equipe, por confiar a realização deste trabalho a mim.

Meus mais sinceros agradecimentos aos professores e doutores que tive a honra de conhecer: Cláudia Maria Pereira, Luiz Carlos Moreira, Vânia do Carmo Rodrigues, Marlene Benchimol, Sergian Viana, Manuela Heringer, pessoas que merecem esse título, pois sabem de fato compartilhar o conhecimento adquirido, mostrando que existe um mundo inteiro de descobertas e que nunca devemos parar de estudar, pois o conhecimento é capaz de mudar vidas e abrir caminhos antes inimagináveis.

À minha amiga e companheira de projeto Monique de Jesus e Silva e Santos meus agradecimentos pelo dia-a-dia, juntas enfrentamos muitos desafios, alcançamos algumas vitórias e até derrotas, porém faz parte da vida. Sempre acreditando e se preocupando uma com a outra, não deixando desistir.

Agradeço aos colegas do Laboratório do Instituto Estadual do Cérebro por me acolherem e por toda ajuda disponibilizada, aos colegas da CENABIO da UFRJ e aos colegas da UNIGRANRIO.

E por fim agradeço ao pagador de impostos, que financiaram meus estudos e formação acadêmica através do repasse do nosso dinheiro por meio das agências de fomento estadual e federal para apoiar à ciência e tecnologia.

## RESUMO

O câncer oral é uma patologia de grande incidência em todo o mundo, estando os cânceres de cabeça e pescoço ocupando a sexta posição no ranking mundial. O consumo de tabaco e álcool além da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) são fatores importantes para o desenvolvimento do câncer oral. Na cavidade oral podem se desenvolver diversos tipos de cânceres, mas o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) é o câncer mais encontrado na cavidade bucal, representando 90% dos tumores. Para o diagnóstico de câncer oral é realizada a biópsia de tecido considerada, atualmente, o padrão ouro, mas apesar de ser eficaz é uma técnica invasiva, de alto custo e por vezes realizada já num estágio avançado do câncer oral. Com relação ao tratamento geralmente é realizado a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia com agentes antineoplásicos. Uma série de técnicas pós-genômicas têm emergido para auxiliar na compreensão das bases moleculares e metabólicas das doenças. Neste sentido, a metabolômica por RMN têm a vantagem de identificar uma grande quantidade de intermediários metabólicos, no sangue, no tecido ou em células contribuindo para um mapeamento do completo do tumor. O objetivo do nosso trabalho é avaliar as alterações metabólicas em amostras de sangue de pacientes LCOs e CCEO, através da metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram analisadas 13 amostras provenientes de 13 plasmas de pacientes sendo 4 portadores de LCOs e 9 de CCEO, todos recrutados da UNIGRANRIO e do CEO. Cerca de 53,84% dos pacientes eram do sexo masculino, fumantes e com idade entre 60 a 80 anos apresentando CCEO moderadamente e bem diferenciados. Foi observada uma diferença no perfil metabólico entre as amostras de LCOs e CCEO, com destaque para os metabólitos glicerol, glicose e fosfoetanolamina aumentando nas amostras de CCEO e lactato e lipoproteína n (CH<sub>2</sub>) aumentando em amostras de LCOs. Diante disso podemos sugerir que o câncer oral apresenta uma lipólise e glicólise alterada.

**Palavras-chave:** carcinoma oral, metabolômica, ressonância magnética nuclear, leucoplasia, metabolismo.

## ABSTRACT

Oral cancer is a disease of great incidence all over the world, with head and neck cancer occupying the sixth position in the world ranking. Tobacco and alcohol consumption, in addition to the Human Papilloma Virus (HPV) infection, are important factors for the development of oral cancer. Several types of cancer may develop in the oral cavity, but Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most common cancer found in the oral cavity, representing 90% of tumors. For the diagnosis of oral cancer, tissue biopsy is performed, which is currently considered the gold standard, but despite being effective, it is an invasive technique, of high cost and sometimes performed at an advanced stage of oral cancer. With regard to treatment, surgery, radiotherapy or chemotherapy with antineoplastic agents is usually performed. A number of post-genomic techniques have emerged to help understand the molecular and metabolic basis of disease. In this sense, metabolomics analyzes by NMR have the advantage of identifying a large amount of metabolic intermediates, in blood, tissue or cells, contributing to a complete mapping of the tumor. The objective of our work is to evaluate metabolic alterations in blood samples from LOCs and OSCC patients, using the methodology of metabolomics by NMR. Thirteen samples from 13 plasmas of patients were analyzed, 4 of them with LOCs and 9 with OSCC, all recruited from UNIGRANRIO and the CEO. About 53.84% of the patients were male, smokers and aged between 60 and 80 years, with moderately and well-differentiated OSCC. A difference in the metabolic profile was observed between LOCs and OSCC samples, with emphasis on the metabolites glycerol, glucose and phosphoethanolamine increasing in OSCC and lactate samples and lipoprotein n (CH<sub>2</sub>) increasing in LOCs samples. Therefore, we may suggest that oral cancer has presents altered lipolysis and glycolysis.

**Keywords:** oral carcinoma, metabolomics, nuclear magnetic resonance, leukoplakia, metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	incidência de casos de câncer oral reportados mundialmente	19
<b>Figura 2</b>	Incidência de casos de câncer oral reportados na América do Sul	20
<b>Figura 3</b>	Úlceras ocasionadas pelo carcinoma oral	21
<b>Figura 4</b>	Representação do efeito Wasburg em uma célula cancerígena	24
<b>Figura 5</b>	Representação da alteração do metabolismo da célula cancerosa	25
<b>Figura 6</b>	Fluxograma	32
<b>Figura 7</b>	Classificação dos grupos a partir do diagnóstico histopatológico da lesão	39
<b>Figura 8</b>	Representação do momento da aquisição dos espectros de pacientes com LCOs e CCEO por RMN	40
<b>Figura 9</b>	Representação do comportamento do perfil metabolômico das amostras de pacientes com LCOs e CCEO em 2D.	43
<b>Figura 10</b>	Representação do comportamento do perfil metabolômico das amostras de pacientes com LCOs e CCEO 3D.	44
<b>Figura 11</b>	Representação dos metabólitos mais evidentes nas amostras de pacientes portadores de LCOs e CCEO	44
<b>Figura 12</b>	Análise dos metabólitos D- Glucose-2, Lactato e Glicerol entre as amostras de pacientes dos grupos A,B e C	45
<b>Figura 13</b>	Análise dos metabólitos Fosfoetanolamina e Lipoproteínas n (CH <sub>2</sub> ) entre as amostras de pacientes dos grupos A, B e C.	46

## TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos pacientes conforme idade, sexo, hábitos deletérios e comorbidades	36
<b>Tabela 2</b>	Dados clinicopatológico dos pacientes avaliados neste estudo.	37
<b>Tabela 3</b>	Classificação dos pacientes conforme o tipo de câncer, o local da lesão	38
<b>Tabela 4</b>	Compostos adquiridos no assinalamento bidimensional	42
<b>Tabela 5</b>	Análise estatística dos metabólitos que se destacaram nas amostras dos grupos A, B e C a partir do Múltiplo teste t Mann-Whitney e Método de Benjamini-Krieger et Yekut	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATP-</b>	Trifosfato de Adenosina
<b><sup>13</sup>C-</b>	Carbono 13
<b>CENABIO-</b>	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
<b>CCE -</b>	Carcinoma de Células Escamosas.
<b>CCEO -</b>	Carcinoma de Células Escamosas Oral.
<b>CtDNA-</b>	DNA tumoral circulante
<b>DSS -</b>	4,4-dimethyl-4-silopentane-e-sulfanic acid.
<b>DNA-</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>D2O-</b>	Água deuterada
<b>EDTA-</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b><sup>1</sup>H-</b>	Proton de Hidrogênio
<b>HIF -</b>	Fator indutível de hipóxia, do inglês <i>Hypoxia-inducible factor</i> .
<b>HPV -</b>	Papiloma Vírus Humano.
<b>INCA -</b>	Instituto Nacional do Câncer.
<b>LCO -</b>	Lesões na cavidade oral.
<b>LOPM -</b>	Lesões orais pré-malignas.
<b>RMN -</b>	Ressonância Magnética Nuclear.
<b>RMN 2D -</b>	Ressonância Magnética Nuclear Dupla Dimensão.
<b>RNA-</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RTPCR-</b>	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da

polimerase

**PCA-** Análise do Componente Principal

**P53-** Fosfoproteína 53

**PRB-** Proteína do Retinoblastoma

**TCLE-** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de Literatura</b>	<b>19</b>
2.1	Câncer Oral	19
2.1.1	Perfil epidemiológico	19
2.1.2	Manifestações clínicas	20
2.1.3	Fatores de riscos envolvidos na patogênese do câncer oral	21
2.1.4	Metabolismo em Câncer Oral	23
2.1.5	Metabolômica por RMN	27
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1	Objetivo Geral	31
4.2	Objetivos Específicos	31
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
5.1	Desenho do Estudo	32
5.2	Seleção de pacientes	32
5.2.1	Riscos	33
5.2.2	Benefícios	34
5.3	Coleta de amostras de CCEO e plasma	34
5.4	Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear	35
5.5	Análise de dados	35
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
6.1	Análise dos casos de paciente portadores de LCOs e CCEO quanto aos dados clinicopatológicos.	36
6.2	Diagnóstico histopatológico da lesão para classificação em CCEO e LCOs e local da lesão.	37

6.3	Análise de Metabolômica por RMN de pacientes com câncer oral	39
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>

## **ANEXO**

<b>ANEXO I:</b> Cronograma de Execução	57
<b>ANEXO II:</b> Termo de consentimento livre e esclarecido	58
<b>ANEXO III:</b> Questionário utilizado para anamnese	59
<b>ANEXO IV:</b> Infraestrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto	60

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo dado ao grupo de mais de 100 tipos de doenças com diferentes fatores de risco e epidemiologia, e são originadas pelo crescimento exacerbado de células anormais que penetram tecidos e órgãos, equando se propagam para outras regiões acontece à metástase (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018, INCA-2018). Sabe-se que a principal característica da proliferação das células cancerígenas são as mutações que acontecem nos genes, estes genes mutados envolvidos na progressão da doença são chamados de 'oncogenes' e já foram encontrados mais de 350 (GREENMAN et al., 2007).

Esta enfermidade é considerada a segunda principal causa de morte no mundo, em 2018 foi relatado 9,6 milhões de mortes ocasionadas pelo câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Segundo dados mais recentes, mostram que em 2018 no mundo, ocorreram 18 milhões de novos casos de câncer (INCA,2020). Com relação a sua incidência no Brasil, calcula-se que no decorrer dos anos de 2020 e 2022 ocorrerão 625 mil novos casos de câncer (INCA, 2020). Através de estudos epidemiológicos sobre o câncer, dentre os dados encontrados, foi observado que o câncer oral tem sido predominante ao redor do mundo, e caracterizado como um grave problema de saúde pública, sendo um principal motivo de mortalidade em determinadas regiões (GUPTA, et al. 2017). Com relação ao câncer oral, no ano de 2019, no Brasil, foram registradas 6.605 mortes por câncer oral, sendo 5.120 destes óbitos ocorridas em homens e 1.485 em mulheres (INCA, 2020). Com o passar dos anos a incidência de novos casos de câncer oral tem crescido, estima-se que nos anos de 2020 a 2022 ocorram cerca de 11.200 novos casos em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2020). O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais incidente na cavidade oral (BARASCH et al., 1998) e sua natureza altamente invasiva tem um impacto bastante significativo na sobrevivência dos pacientes. A taxa de sobrevivência de 5 anos para o CCE oral (CCEO) localizado, a sobrevivência é de 81%, quando esta doença acomete os linfonodos regionais, a sobrevivência é de 42%, e quando existem metástases à distância, a sobrevivência é de 17% (FEDELE, 2009).

O uso combinado do tabaco e do álcool foi associada à 90% dos casos de CCE de cabeça e pescoço (AKANUMA et al., 1999; SHAH et al., 1995; KOWALSKI et al., 2005). No Brasil, o risco desta neoplasia devido ao tabagismo é considerado bastante aumentado comparado a estudos similares em outros países (FRANCO et al. 1989; AKANUMA et al., 1999). Esses fatores associados ao câncer podem alterar o perfil metabólico dos pacientes levando uma piora da sobre vida dos mesmos. Ainda assim, sabe se que as células cancerosas possuem alteração no seu metabolismo energético dando preferência via da glicólise aeróbica umas das principais características metabólicas do câncer, mas sua relevância ainda parece obscura, sendo necessários mais estudos voltados para a compreensão do metabolismo do câncer e sua importância na progressão, diagnóstico e tratamento (SCHAFER, M. et al., 2008)

A biópsia é uma das principais técnicas aplicadas para diagnosticar o câncer, e tem sido utilizada por clínicos para identificar diversas doenças há mais de 1000 anos. Este tipo de técnica quando empregada em pacientes com neoplasia proporciona um estudo histológico sobre a doença e, atualmente, esta técnica também permitiu identificar um perfil genético do tumor, colaborando assim para observar o desenvolvimento da doença e até mesmo a resposta ao tratamento (CROWLEY et al., 2013).

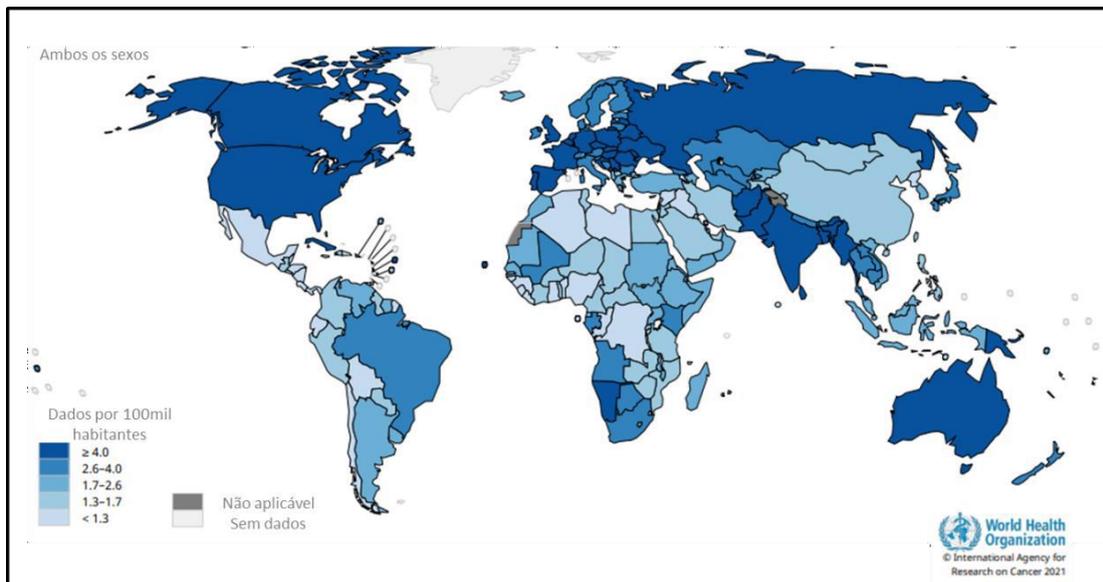
## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER ORAL

#### 2.1.1 Perfil epidemiológico

O câncer oral é um tipo de doença que tem uma incidência relevante em países em desenvolvimento, porém tem crescido em todo mundo se tornando um problema de grande importância clínica e epidemiológica (GUPTA, et al 2017). Segundo os dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde, foi possível identificar que o câncer oral tem sido observado em diversos países demonstrando uma maior variabilidade em sua distribuição geográfica. Países do sul da Ásia como a Índia, Sri Lanka, Paquistão e Bangladesh são os mais envolvidos com essa neoplasia maligna, dos 390.000 novos casos de câncer orais e orofaríngeos no mundo, cerca de 228.000 (58%) ocorrem no Sul e Sudeste Asiático, sendo na Índia o mais comum (FIGURA 1) (GLOBOCAN, 2020 e WHO, 2020). Países que tem um pequeno rendimento socioeconômico, e que sofrem com a falta de informação sobre os fatores de riscos mais influentes como os danos que o consumo de álcool e tabaco pode acarretar, são os mais suscetíveis para o desenvolvimento da doença (GUPTA, et al., 2017).

**Figura 1: Incidência de casos de câncer oral reportados mundialmente:**

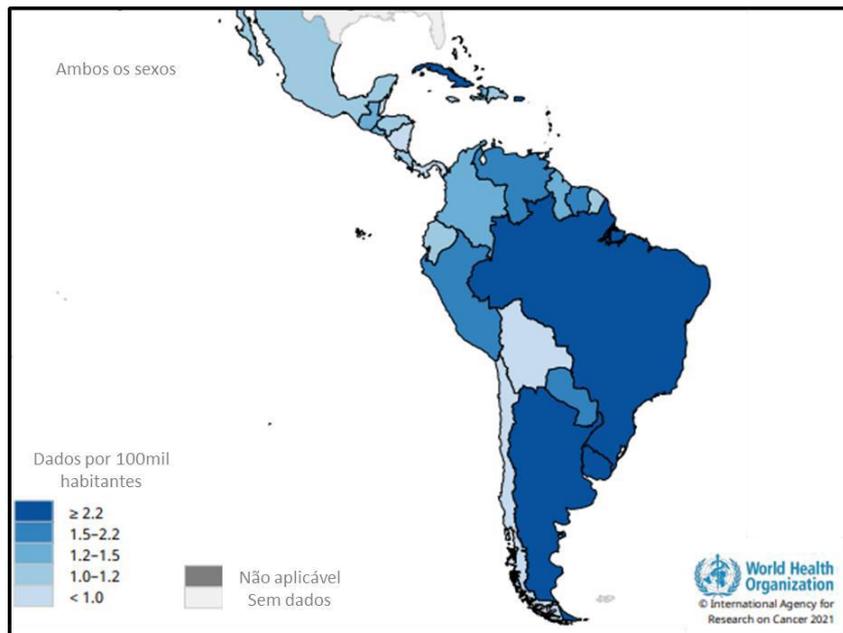


**Fonte:** IARC-GLOBOCAN, 2020

**Legenda:** Mapa representando os países onde ocorre casos de câncer oral no Mundo. Os países estão representados em intensidade de tons da cor azul conforme a incidência de casos clínicos (Adaptado de GLOBOCAN, 2020).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil, ocupa a terceira posição dentre os países com maior incidência de câncer oral (FIGURA 2) (GLOBOCAN, 2020). Sabe-se também que, no Brasil, o câncer oral em pacientes do sexo masculino, é o quinto mais constatado dentre os tumores malignos e no sexo feminino ele ocupa a décima terceira posição (INCA,2020).

**Figura 2: Incidência de casos de câncer oral reportados na América do Sul:**



**Fonte:** IARC-GLOBOCAN, 2020

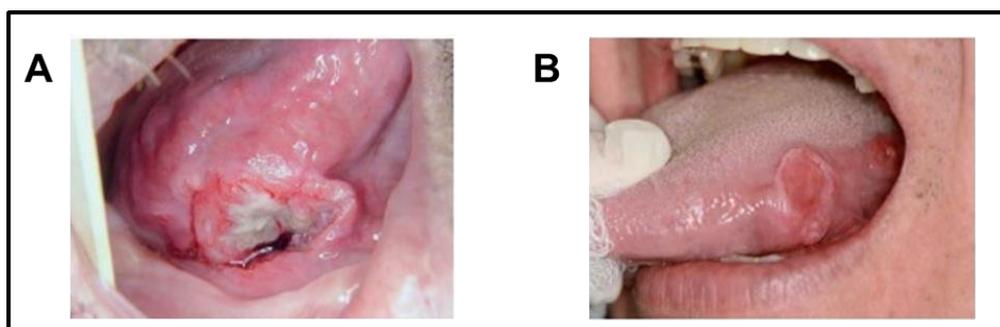
**Legenda:** Mapa representando os países onde ocorre casos de câncer oral na América do Sul. Os países estão representados em intensidade de tons da cor azul conforme a incidência de casos clínicos (Adaptado de GLOBOCAN, 2020).

### 2.1.2 Manifestações clínicas

O carcinoma oral em seu estágio inicial não apresenta sinais de dor, no entanto, nos estágios evoluídos da doença, em 40% dos pacientes são perceptíveis os sintomas dolorosos, ainda assim, quando o tumor ganha um tamanho notável a dor se torna evidente em todos os pacientes. A dor pode ser mais leve causando somente um desconforto, ou mais intensa nos casos mais graves, sendo mais presente na língua e assoalho oral (*National Cancer Institute*, 2017). Os sinais e sintomas que são observados no câncer oral compreendem o sangramento, impossibilidade de abertura da boca, dor de ouvido, e mobilidade dos dentes, dificuldade para respirar, falar e engolir, parestesia e diversos pacientes apresentam linfadenopatia cervical. Nos

estágios mais avançados o paciente pode apresentar fístulas cutâneas, enfraquecimento e anemia intensa (JUNIOR et al., 2013). A lesão mais frequente e desenvolvida no câncer oral tem características específicas, ela aparece como uma úlcera com necrose central, bordas irregulares, endurecidas e elevadas, quando são palpadas percebe-se fixação aos tecidos subjacentes (FIGURA 3) (JÚNIOR et al., 2013)

**Figura 3: Úlceras ocasionadas pelo carcinoma oral:**



**Fonte:** JUNIOR et. al., 2013

**Legenda:** A- Úlcera no assoalho da boca com contornos elevados, endurecidos e centro com necrose. B- Úlcera na porção média da região lateral da língua de forma irregular e bordas elevadas (Adaptado, JUNIOR et. al., 2013).

### 2.1.3 Fatores de riscos envolvidos na patogênese do câncer oral

Existem vários tipos de neoplasias malignas que podem acometer a cavidade oral, dentre elas estão o carcinoma verrucoso, o carcinoma de glândulas salivares e o mais comum e detectado, correspondendo a 90% de todos os tumores malignos é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO). O CCEO progride através da proliferação das células epiteliais, inicialmente de forma superficial, evoluindo para forma invasiva com uma sobrevida de aproximadamente 5 anos (GIRARDI et al, 2017; INCA, 2016). O CCEO pode ser resultado de evolução de lesões orais pré malignas (LOPMs) tais como leucoplasia, eritroplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, ceratose sublingual e leucoplasia por candidose (ULAGANATHAN et al., 2017).

A língua é a região mais acometida pelo câncer oral, seguida por localizações no assoalho da boca. A face ventral da língua por ser uma mucosa desprovida de queratina, os agentes cancerígenos dissolvidos na saliva teriam

um maior tempo de contato o que proporcionaria o encontro dos agentes cancerígenos com as células escamosas epiteliais (IRANI, 2016).

Tem sido observado um aumento do câncer oral no gênero feminino devido às mudanças de hábitos impulsionados pela vida moderna. Uma pesquisa realizada por Bross e Coombs comprovou que mulheres que faziam uso de álcool e tabaco desenvolveram câncer oral, aproximadamente 15 anos antes que as mulheres nunca expostas a esses fatores de risco para o câncer CCEO (BROSS; COOMBS, 1976).

Diversos estudos indicam que as alterações hormonais, deficiências nutricionais, de vitaminas e minerais que as mulheres apresentam ao longo da vida possam ter relevância para o desenvolvimento do CCEO (GUPTA, et al., 2017; MUSCAT et al., 1996). Nesses estudos se levantou a hipótese que a ocorrência de deficiência de ferro, vitaminas A, B<sub>2</sub> e β-caroteno podem ter participação para o desenvolvimento de câncer oral e nestes casos o consumo de álcool associado, potencializaria esta carência devido a sua ação inibitória de absorção de nutrientes e vitaminas. Moynihan e et al, relatam a realização de dosagens de ferro, selênio, vitaminas E e β-caroteno, em pacientes com câncer oral, com resultados contraditórios, porém a vitamina C é apontada como fundamental na proteção da mucosa, participando, portanto, na prevenção desta patologia (MOYNIHAN, 2005).

Outro fator importante para o desenvolvimento do câncer oral é a infecção por alguns tipos do papiloma vírus humano (HPV). A infecção pelo HPV está diretamente relacionada ao desenvolvimento dos cânceres de orofaringe, amígdala e base da língua. O HPV promove uma mudança cromossômica no braço 3p14 e 9p21 favorecendo a transformação das LOPMs em tumores. Em 50% dos casos de leucoplasia ocorre a perda nos cromossomos do braço 3p ou 9p. Nos cânceres de orofaringe o DNA do vírus HPV pode ser encontrado em até 70% dos casos, sendo mais frequente na população adulta jovem devido a mudanças nos hábitos de práticas sexuais. A sua ação principal são as oncoproteínas virais E6 e E7 que alteram o ciclo celular se ligando às proteínas supressoras de tumor p53 e pRB. (INCA, 2016; IRANI, 2016).

Mutações somáticas acontecem no genoma de todas as células em divisão, tanto normais quanto neoplásicas. Elas podem ocorrer como resultado

de uma má incorporação durante a replicação do DNA ou através da exposição a agentes mutagênicos endógenos ou exógenos. Genomas de células cancerosas carregam duas classes biológicas de mutações somáticas oriundas desses processos. As mutações chamadas “*driver mutations*” são selecionadas positivamente no microambiente do tecido onde o câncer está surgindo. Estão diretamente implicadas na oncogênese, portanto, por definição se encontram nos oncogenes. Por outro lado, as mutações “*passenger mutations*” não estão sujeitas à seleção, não conferem vantagens de crescimento clonal e, desta forma, não contribuem para o desenvolvimento do câncer (DOMÍNGUEZ- VIGIL et al., 2018; GREENMAN et al., 2007; STRATON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

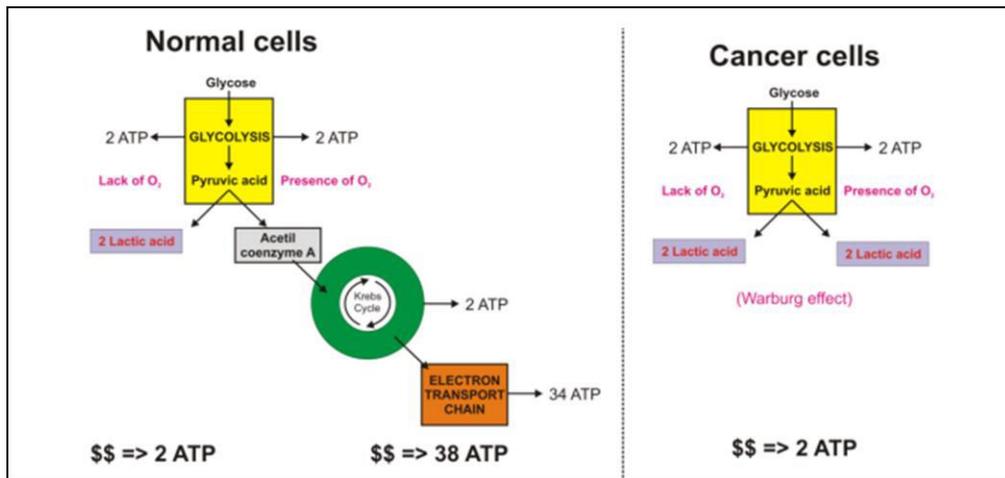
Além das alterações causadas pelas mutações, outros tipos de alterações podem ocorrer no genoma, como rearranjos estruturais do cromossomo e alterações em sítios relevantes para a transcrição, *splicing*, maturação do RNA ou eficiência de tradução (DOMÍNGUEZ- VIGIL et al., 2018).

A proliferação celular também é uma parte importante do desenvolvimento e progressão do câncer e é manifestada pela expressão e/ou atividade alterada das proteínas relacionadas ao ciclo celular. A ativação constitutiva de diversos sinais de transdução também estimula o crescimento celular. As etapas iniciais de desenvolvimento do tumor estão associadas com uma resposta fibrogênica e o desenvolvimento de um ambiente hipóxico que favorece a sobrevivência e proliferação de células tronco cancerosas. Após o aparecimento do tumor, o crescimento e a metástase podem ser mantidos pela maior produção de hormônios apropriados (em cânceres dependentes de hormônios), promoção de angiogênese, pela transição epitelial mesenquimal e por autofagia (FEITELSON et al., 2015).

#### 2.1.4. Metabolismo em Câncer Oral

É sabido que câncer é um tipo de doença que tem um perfil metabólico alterado e desregulado que se utiliza muito de glicólise, realizando o chamado efeito de Warburg onde as células tumorais convertem glicose em ácido láctico mesmo na presença de oxigênio, sendo diferente das células normais que utilizam o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (FIGURA 4).

**Figura 4: Representação do efeito Warburg em uma célula cancerígena**



**Fonte:** DEVIC, S., 2016

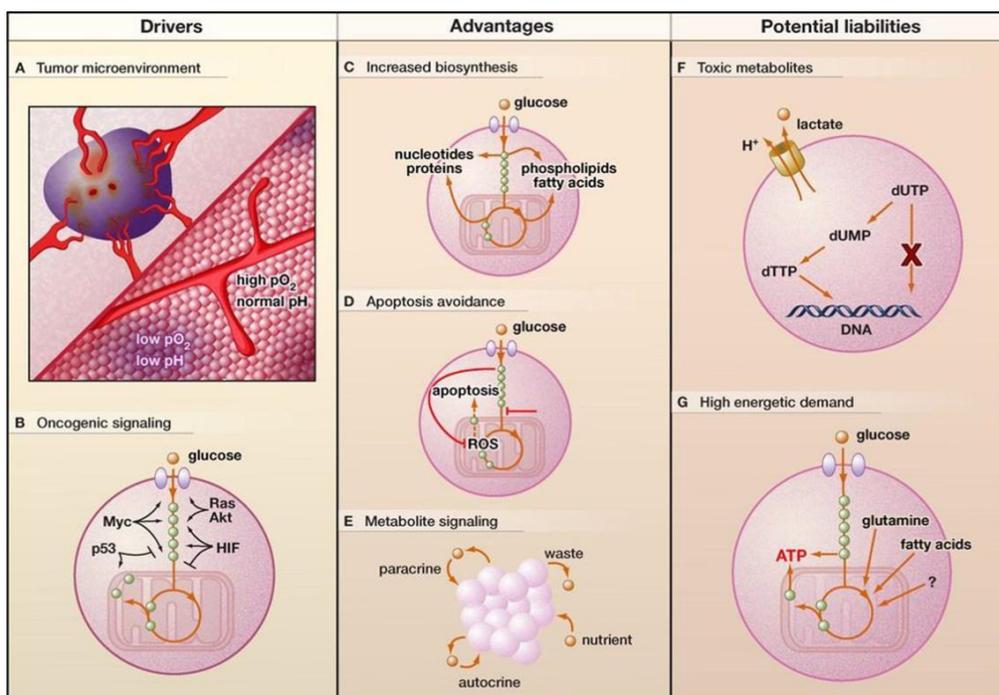
**Legenda:** Ilustração de metabolismo de uma célula normal e uma célula cancerígena. Lado esquerdo representação do metabolismo de uma célula normal realizando glicólise, do lado direito representação de uma célula cancerígena realizando glicólise (DEVIC, S., 2016)

Diversos estudos demonstraram que as mitocôndrias de células tumorais apresentaram alterações na sua estrutura e função. Foi observado que essas células preferem utilizar o metabolismo glicolítico mesmo na presença de oxigênio (SCHAFER, M. et al., 2008). Ainda assim, já foi observado que as células cancerosas também realizam um metabolismo reprogramado provenientes da necessidade de energia estabelecido pela sinalização do fator de crescimento (HSU e SABATINI, 2008; WARD e THOMPSON, 2012). Ressaltando que as células metastáticas, se beneficiam da energia adquirida dos tecidos para o qual migram e colonizam, a partir da captação de nutrientes, anabolizantes e catabólicos, lembrando que o microambiente tumoral é espacialmente e temporariamente heterogêneo, contendo regiões de baixo teor de oxigênio e baixo pH (FIGURA 5) (HSU e SABATINI, 2008).

Mesmo que tenha glicose, oxigênio e glutamina acessível no meio extracelular da massa tumoral, internamente as células têm um ambiente diferente onde se encontra pouco nutriente e hipóxia. Por conta dessas limitações pode ocorrer um ajuste metabólico, fazendo com que as células se adaptem a diversos ambientes encontrados nos tumores. Essa adaptação pode ser ocasionada pela ativação de enzimas chaves que influenciam o fluxo

metabólico e nas vias proliferativas, também em genes envolvidos na resistência a partir da supressão da apoptose (MORENO- SANCHEZ,et al.,2007; PAVLOVA e THOMPSON, 2016). Os genes alvo ativados por fator indutível de hipóxia (HIF) diminuem a dependência de oxigênio da célula, enquanto Ras, Myc e Akt também podem regular o consumo de glicose e a glicólise. A alteração do metabolismo das células cancerosas metabolizam a glicose mesmo com pouco oxigênio, para evitar a apoptose e para envolver-se na sinalização autócrina, parácrina e local com base no metabólito. No entanto, esta alteração do metabolismo também pode conferir várias vulnerabilidades às células cancerosas. Por exemplo, o metabolismo com regulação positiva pode levar ao acúmulo de metabólitos tóxicos, incluindo lactato. Além disso, as células cancerosas também podem ter uma alta demanda de energia, para o qual devem aumentar o fluxo através de processos de geração de ATP (FIGURA 5) (HSU e SABATINI, 2008).

**Figura 5: Representação da alteração do metabolismo da célula cancerosa**



**Fonte:** HSU e SABATINI, 2008.

**Legenda:** A: Mostra o microambiente do tumor contendo regiões de baixo teor de oxigênio e baixo pH (violeta). B: As vias de sinalização associadas ao câncer onde os genes alvo ativados por fator indutível de hipoxia (HIF) diminuem a dependência de oxigênio da célula, enquanto Ras, Myc e Akt regulam o consumo de glicose e a glicólise. C, D e E: A biossíntese de macromolécula, evita a apoptose e envolvendo-se na sinalização autócrina, parácrina e local

com base no metabolito. F: O metabolismo com regulação positiva leva o acúmulo de metabólitos tóxicos, incluindo nucleatos de lactato. G: As células cancerosas tem uma alta demanda de energia, para aumentar o fluxo através de processos de geração de ATP (HSU e SABATINI, 2008).

Com relação ao câncer oral, estudos recentes a partir da metabolômica, analisando o perfil metabólico de linhagens de células de carcinoma oral, demonstrou que as células metastáticas dependem de uma maior demanda de metabolismo de lipídeos, podendo estar relacionado ao aumento da invasividade dessas células podendo promover a metástase, pois foi observadas mesmas um acúmulo de malonato, lactato, e ácidos graxos insaturados (SANT'ANNA-SILVA et al., 2018). Ainda assim, em outro trabalho também a partir de estudos com metabolômica usando amostras de soro de pacientes portadores de câncer oral, demonstrou alterações no metabolismo, apresentando um acúmulo de corpos cetônicos, um ciclo de Krebs distorcido e catabolismo de aminoácidos (TIZIANI et al., 2009).

É sabido que os metabólitos podem estimular a ação de macromoléculas e controlar fenótipos. Já tem sido observado que as metodologias de escala ômicas oferecem melhor comparação do que as metodologias isoladas, mostrando que o “dogma central” é uma grande integração de informações. Diante disso, essa definição pode ser uma modificação do paradigma no sentido que reformula o pensamento convencional do “dogma central” molecular, dando assim a posição central a metabolômica, podendo oferecer uma investigação mais simples as outras técnicas ômicas e agir como regulador principal de todo sistema (SANTOS, G. C.JR., et al 2021).

Neste sentido, análises metabolômicas têm demonstrado um enorme potencial na montagem de um quadro completo de mudanças integradas que ocorrem no organismo, através da identificação de uma grande quantidade de metabólicos. Esta identificação possibilita o estudo detalhado das alterações no perfil metabólico associadas ao estado patológico. Dentre as técnicas utilizadas para realização da metabolômica estão a ressonância magnética nuclear (RMN) e a cromatografia líquida ou gasosa associada à espectrometria de massa (ZAMBONI; SAGHATELIAN; PATTI, 2015). Porém, a RMN tem a vantagem de ser não-destrutiva para a amostra e de possuir maior

reprodutibilidade, como visto por Choi e colaboradores que no câncer de mama através da RMN foi possível identificar a agressividade do tumor antes mesmo da cirurgia e também detectar marcadores confiáveis para caracterização do mesmo (CHOI, J. S., et al,2012).

#### 2.1.5 Metabolômica por RMN

A RMN é uma técnica de pesquisa que explora as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos para determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas nos quais eles estão contidos, baseia-se no fenômeno da ressonância magnética já conhecida, porém é um tipo de espectroscopia de alta resolução (MACHADO,2014).

Uma das técnicas mais utilizadas é a não direcionada, também chamada de exploratória, onde não existe um composto alvo específico, nem ocorre marcação isotópica. Cada metabólito tem um espectro específico e as únicas variáveis são o solvente utilizado e a intensidade do campo magnético aplicado, que podem ser facilmente padronizáveis. A alta reprodutibilidade torna a RMN, dentre os outros métodos, o mais adequado para a formação de um banco de dados de metabolômica de domínio público, que poderá ser usado por muitos anos. Apesar de o método apresentar baixa sensibilidade se comparado à espectrometria de massa, a eficiência do RMN pode ser melhorada usando as técnicas em dupla dimensão (RMN 2D), que resolvem ou amenizam o problema da superposição dos sinais (MACHADO, 2014). A sensibilidade, também, pode ser melhorada pelo aperfeiçoamento dos equipamentos e aparatos utilizados na obtenção dos espectros (Kim *et al.*, 2010). Dentre eles, destacam-se a utilização de sondas criogênicas (CryoProbe, Bruker, ou ColdProbe, Agilent), o aumento do campo e a redução do volume do solvente com o uso de microsondas inversas multinucleares, o que permite a análise de poucos microlitros de solução (MicroProbe ou NanoProbe).

Os métodos de metabolômica por RMN são ferramentas de análise global do metabolismo. Existem diversos trabalhos que obtiveram sucesso com a aplicação da RMN nos estudos da metabolômica. Em 2010, foi possível identificar alguns marcadores para pré validação de um modelo de predição

para detecção precoce do câncer de mama a partir dos perfis metabólicos através da RMN (ASIAGO, et al., 2010). Outro trabalho também utilizando RMN foi possível prever a agressividade do tumor e detectar marcadores confiáveis para o câncer de mama (CHOI, et al., 2012). Ainda utilizando a metabolômica por RMN, Rocha e colaboradores conseguiram revelar assinaturas metabólicas distintas do adenocarcinoma de carcinoma de células escamosas do pulmão (ROCHA, et al., 2015). No Brasil, pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, divulgaram muitos trabalhos com uso desta técnica. Em um deles, conseguiram compreender o mecanismo de ação do fármaco 3-bromopiruvato, utilizando medidas de fluxo de glicose através RMN (PEREIRA DA SILVA et al., 2009). Ainda assim, com utilização da RMN, também conseguiram correlacionar o perfil metabólico de saliva com presença e propensão à cárie (FIDALGO et al., 2013, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Neste contexto, podemos perceber que o uso da RMN no estudo metabolômica pode colaborar para diversas pesquisas. Diante disso, é interessante utilizar esta abordagem para aprofundar o estudo relacionado ao perfil metabólico de células neoplásicas da cavidade oral com o intuito de contribuir para o diagnóstico e progressão do câncer.

#### 2.1.6 Diagnósticos

A biópsia incisional de tecido para análise histopatológica é considerada o padrão ouro para diagnosticar o câncer oral, entretanto ainda existem alguns aspectos que podem influenciar no êxito desta técnica, como o local onde se estabeleceu a lesão e o número de amostras coletados para o estudo. Contudo, vale destacar que as biópsias são procedimentos invasivos, podendo ocasionar um desconforto ao paciente ou até uma consequência clínica, sendo muitas vezes de custo elevado. Outro fator limitante são os perfis genéticos diferentes que o tumor pode apresentar por conta da sua heterogeneidade (DIAZ; BARDELLI, 2014; MOYNIHAN, 2005). Um melhor entendimento da patogênese do câncer, a partir do estudo das alterações moleculares que acontecem nas células cancerosas, acarretará no avanço no diagnóstico clínico (HEITZER; ULZ; GEIGL, 2015). A prática personalizada da medicina é um aprimoramento no diagnóstico dos tumores malignos, em que o tratamento

acontece através da descoberta de moléculas, realizando modificações genômicas nas células neoplásicas dos pacientes com metástase (HOFMAN; POPPER, 2016).

Ainda assim, se faz necessário um investimento em novos procedimentos que sejam menos invasivos, e aptos a revelar a heterogeneidade do tumor e as alterações moleculares nas células cancerosas. Uma série de técnicas pós-genômicas têm emergido para auxiliar na compreensão das bases moleculares e metabólicas das doenças uma delas citada acima por RMN.

### 3 JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO

É importante compreender que para a prevenção e a possibilidade da cura para pacientes com câncer, cada vez mais, se faz necessário um tipo de diagnóstico e tratamento mais precoce e preciso, utilizando procedimentos menos invasivos. O tratamento convencional do CCE de cabeça e pescoço consiste na realização de cirurgia ou radioterapia para os estágios iniciais da doença e para os casos de doença avançada, em radioterapia ou cirurgia seguida de quimioterapia.

Mesmo diante da complexidade do perfil genético e metabólico que as neoplasias malignas apresentam, ainda assim, o diagnóstico mais utilizado são as análises histopatológicas e exames de imagenologia. Sabendo da heterogeneidade intratumoral que tumores possuem, é importante aplicar ferramentas mais avançadas de análise tumoral e uma monitoração através da avaliação do espaço e tempo do desenvolvimento do tumor. Biomarcadores circulantes, tais como o ctDNA, e onco-metabólitos, prometem fornecer informações dinâmicas não somente relacionadas ao aparecimento do tumor, quanto monitoramentoda progressão da doença e resposta ao tratamento. O emprego do procedimento de metabolômica no sangue de pacientes portadores de CCEO contribuirá para desenhar um quadro mais preciso quanto a malignidade dos tumores e certamente abrirá uma nova janela para proposição de novos tratamentos mais adequados, atingindo os alvos revelados a partir da análise indicada acima. Em diversos tipos de câncer, incluindo gliomas, a biópsia líquida, e o perfil metabólico do sangue, demonstraram sua utilidade clínica como uma metodologia minimamente invasiva para diagnóstico, prognóstico e predição. Além disso, o perfil metabólico, pode ser utilizado no laboratório no aprofundamento da análise de mecanismos de aquisição de resistência a drogas, invasão do tumor e disseminação.

Neste contexto, este trabalho, tem o objetivo de analisar as amostras de sangue de pacientes com carcinoma oral através da análise do perfil metabólico, a partir da metabolômica por RMN para auxiliar no diagnóstico e progressão do câncer.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar as alterações metabólicas em sangue de pacientes com câncer oral e/ou com lesões na cavidade oral a partir da metabolômica por RMN.

### **4.2 Objetivos específicos**

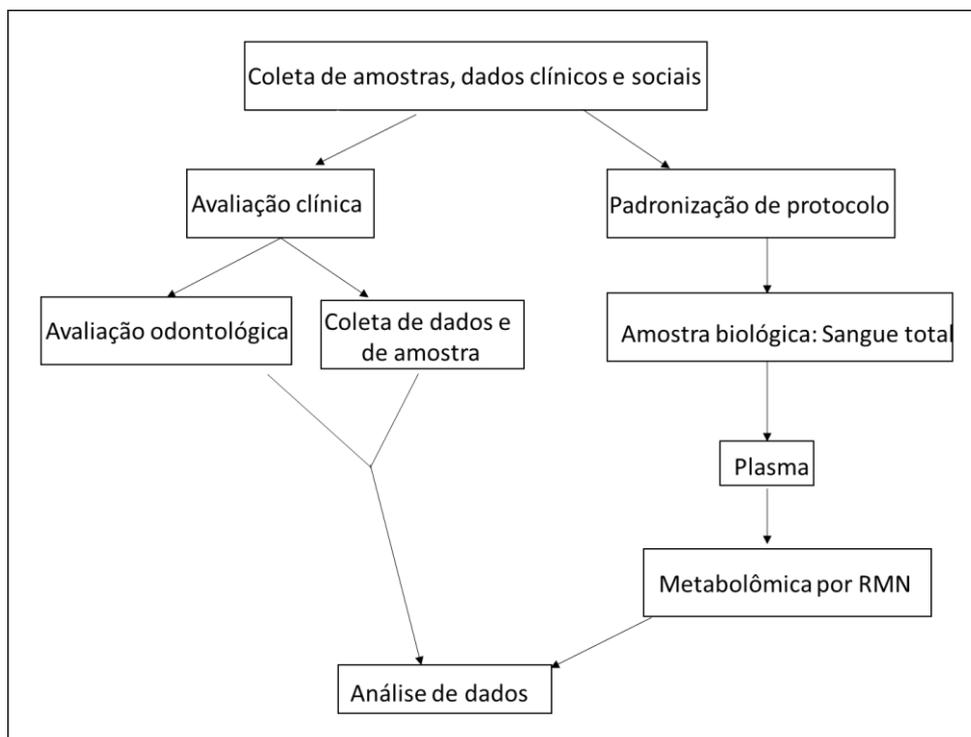
- ✓ Coletar amostras dados clinicopatológicos de pacientes portadores de CCEO e/ou com lesões na cavidade oral (LCOs);
- ✓ Analisar as alterações metabólicas em amostras de plasma de pacientes com CCEO e/ou LCOs por metabolômica por RMN;
- ✓ Correlacionar a expressão destes metabólitos com a presença de hábitos (tabagismo e etilismo), com aspectos clínicos (comorbidade) e aspectos histopatológicos (tipos de lesão e grau de diferenciação tumoral).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho do estudo

Para entendimento da metodologia aplicada ao estudo, abaixo ofluxograma (FIGURA 6) esclarece as fases clínicas e moleculares utilizadas no estudo.

**Figura 6: Fluxograma**



**Legenda:** Neste estudo foram executadas avaliações clínicas, odontológicas, avaliações histopatológicas e análises de metabolômica.

### 5.2 Seleção de pacientes

Os pacientes foram selecionados a partir da Clínica de Estomatologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) da cidade de Duque de Caxias, e no CEO- Centro de Especialidades Odontológicas do Centro de Saúde Anibal Viriato de Azevedo – São João de Meriti. Foram incluídos um total de 13 pacientes com lesões na cavidade oral, todos voluntários que foram realizar atendimento médico, sendo 4 portadores de LCOs não carcinoma, e 9 portadores de CCEO, que foram submetidos à biópsia diagnóstica pela Estomatologista Dra. Vânia do Carmo Rodrigues. Todos os voluntários tiveram explicação sobre a participação no estudo e suas dúvidas esclarecidas, sendo disponível o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

Para avaliação de metabólômica os pacientes foram divididos em 3 grupos sendo classificados da seguinte forma: grupo A- pacientes portadores de LCOs, grupo B- pacientes portadores de carcinoma verrucoso, carcinoma moderadamente ou bem diferenciados e grupo C- pacientes portadores de CCEO invasivo. Para selecionar os voluntários neste estudo, foi considerado alguns critérios de inclusão e exclusão:

5.2.5 Critérios de inclusão: paciente com diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas oral e/ou lesões da cavidade oral

5.2.6 Critérios de exclusão: paciente que se recuse assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e/ou Termo de Assentimento (ANEXO II); paciente em tratamento quimioterápico atual ou prévio e paciente que no exame histopatológico não confirme o diagnóstico de CCEO ou LCOs.

Os participantes responderam à questionários anamnésicos contendo questionário clínico, social e demográfico (ANEXO III), submetidos à exames clínicos e à coleta de material durante os procedimentos cirúrgicos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio com o número do parecer 1.753.632

#### 5.2.1 Riscos

Em relação aos riscos aos pacientes, este estudo apresenta um baixo risco aos participantes, uma vez que envolve unicamente os procedimentos de rotina para punção venosa sem necessidade de procedimentos adicionais aos da rotina de acompanhamento clínico. A confidencialidade dos dados obtidos será preservada e as informações dos participantes serão cifradas com códigos do próprio estudo de forma que não possam ser identificadas e sejam manejadas sigilosamente nos formulários e bancos de dados do estudo.

### 5.2.2 Benefícios

Os voluntários desta pesquisa não terão benefícios diretos, mas irão ajudar no desenvolvimento do projeto pela análise do índice de sucesso dos tratamentos ou pelo desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento das neoplasias a serem estudadas no projeto. Validar os testes de genotipagem dos tumores que poderão ser disponibilizados nos laboratórios públicos que lidam com acompanhamento laboratorial dos indivíduos com câncer de oral.

### 5.3. Coleta de amostras de CCEO e plasma

Foram realizadas biópsias incisionais nos portadores de CCEO, que não receberam qualquer tratamento prévio. As amostras foram coletadas a fresco e seccionada e adicionadas em formol tamponado a 10% para as análises histopatológicas. Só foram incluídos neste estudo pacientes com comprovação histológica de LCOs e CCEO. Foram excluídos os pacientes que já sofreram tratamento prévio (cirurgia, radio ou quimioterapia), os pacientes que tiveram anteriormente outros tipos de neoplasias malignas, incluindo CCE de cabeça e pescoço, pacientes com tumores múltiplos simultâneos.

As amostras foram obtidas a partir da coleta de 4 ml de sangue total de indivíduos de ambos os gêneros, com qualquer idade (>18 anos) e com diagnóstico confirmado por exame histopatológico de carcinoma oral. Os participantes da pesquisa foram recrutados na Clínica de Estomatologia da UNIGRANRIO e do Centro de Especialidades Odontológicas do Centro de Saúde Anibal Viriato de Azevedo.

Essas amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da marca *Vacuplast Collect Line*. Essas amostras de sangue total foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e posteriormente foi retirado 1mL do sobrenadante- o plasma.

#### 5.4 Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear

Para a metabolômica, o plasma coletado foi diluído em tampão fosfato pH 7.4, com 10% de D<sub>2</sub>O, e 10mM de DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid). Este material foi transferido para tubos específicos de RMN de 5mm, onde foram analisados, no CENABIO I -UFRJ.

O perfil metabólico das amostras foi estudado por uma abordagem metabolômica exploratória, através de RMN. Para o mapeamento dos metabolitos, usa-se grandes magnetos que são imersos por hélio e nitrogênio líquido. Uma vez que essa amostra está inserida no magneto, é emitido pulso de radiofrequência, e os sinais são detectados, a partir disso é formado um espectro. Para tal, serão adquiridos espectros uni-dimensionais de <sup>1</sup>H. Adicionalmente, foram obtidos espectros bi-dimensionais de <sup>1</sup>H -<sup>13</sup>C, e <sup>1</sup>H -<sup>1</sup>H. Os espectros foram obtidos no equipamento Bruker DRX 400 MHz e processados e analisados através do software Topspin 4.1. A análise e o assinalamento dos intermediários metabólicos foram obtidos a partir da comparação dos espectros com os disponíveis no banco de dados do metaboloma humano (WISHART et al., 2020).

#### 5.5. Análise de dados

Para avaliar a associação entre as variáveis moleculares com as variáveis demográficas, clínicas e patológicas foram realizadas análises multivariadas, PCA, e análises uni-variadas, múltiplo teste t, one-way ANOVA não paramétrico, com pós-teste de Benjamini, Krieger and Yekutieli. Os gráficos foram gerados por GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software).

Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância para valores de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

6.1 Análise dos casos de paciente portadores de LCOs e CCEO quanto aos dados clinicopatológicos.

Levando em consideração a epidemiologia, idade, gênero e os fatores de risco acometido pelo LCOs e CCEO, avaliamos todos esses dados (TABELA 1 e 2).

No total dos 13 pacientes que foram analisados foi possível observar que a média de idade é de 64,6, sendo a menor idade 41 anos e a maior idade 86 anos, e que a maioria dos pacientes são do sexo masculino (53,84%). Com relação ao tabagismo cerca de 7 dos 13 pacientes (53,84%) alegaram que fumam ou já fumaram por muitos anos, e cerca de 5 de 13 pacientes (38,46%) são etilistas (TABELA 1 e 2). Podemos observar também 8 de 13 pacientes (61,54%) possuem algum tipo de comorbidade (TABELA 1 e 2).

**Tabela 1: Classificação dos pacientes conforme idade, sexo, hábitos deletérios e comorbidades.**

Amostra	Paciente	Idade	Sexo	Tabagismo	Etilismo	Comorbidades
1	19/19	65	F	Sim	Não	Diabetes
2	20/24	66	M	Sim	Sim	HIV
3	20/22	66	F	Não	Não	-----
4	19/20	65	M	Sim	Não	Hipertensão arterial
5	20/23	64	F	Sim	Sim	-----
6	20/27	79	F	Não	Não	Não tem 1 rim e hipertensão
7	20/26	66	M	Atualmente não, porem fumou por 25 anos	Sim	Hipertensão
8	20/28	60	M	Não	Não	Trombose
9	19/18	53	M	Sim	Sim	-----
10	19/13	66	F	Não	Não	-----
11	19/16	86	F	Não	Não	Diabetes
12	19/21	63	M	Sim	Sim	Poliomelite
13	19/14	41	M	Não	Não	-----

**Tabela 2: Dados clinicopatológico dos pacientes avaliados neste estudo-constando a variável, o valor absoluto dos pacientes e a frequência relativa (F.R.).**

Variável	N=13	F.R
<b>Gênero</b>		
Masculino	7	53,84%
Feminino	6	46,16%
<b>Faixa etária</b>		
>60 anos	2	15,39%
60 a 80 anos	10	76,92%
<80 anos	1	7,69%
<b>Tabagismo</b>		
Nunca	6	46,16%
Sim	7	53,84%
<b>Etilismo</b>		
Nunca	8	61,54%
Sim	5	38,46%
<b>Comorbidade</b>		
Não	5	38,46%
Sim	8	61,54%

6.2 Diagnóstico histopatológico da lesão para classificação em CCEO e LCOs e local da lesão.

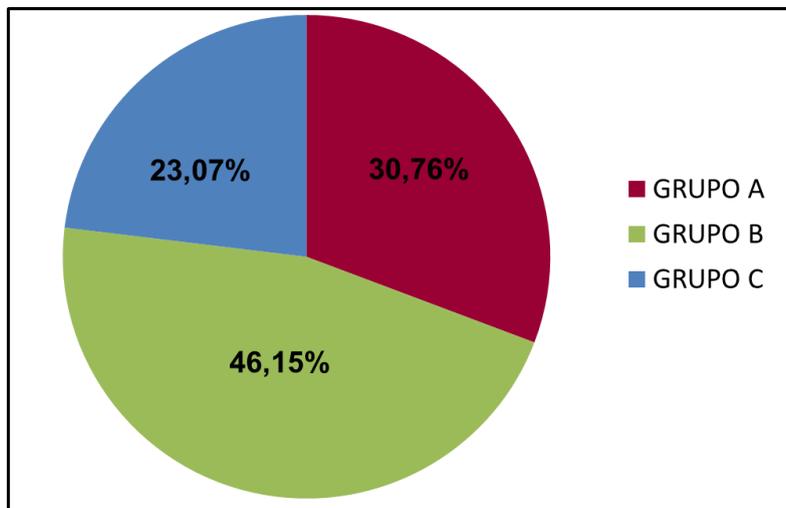
Do total dos 13 pacientes analisados neste estudo, observamos que as regiões anatômicas mais acometidas pelas lesões são: a gengiva, o assoalho lingual, rebordo alveolar, palato, lábios, mucosa jugal e a língua, cada região

representa 15,39% dos casos (TABELA 3). Deste total, 4 eram portadores de LCOs (30,76%) e 9 portadores de CCEO (69,23%) (TABELA 3 e FIGURA 7). Para executar a metabolômica, foi realizado a separação dos grupos conforme o diagnóstico histopatológico da lesão. Dos 13 pacientes 4 (30,76%) são os acometidos por líquen ou leucoplasia representando o grupo A, o grupo B é composto por pacientes acometidos por carcinoma verrucoso, carcinoma de células escamosas moderadamente ou bem diferenciado que são 6 dos 13 pacientes (46,15%) e o grupo C são 3 de 13 pacientes (23,07%) portadores de carcinoma de células escamosa oral invasivo (TABELA 3 e FIGURA 7).

**Tabela 3: Classificação dos pacientes conforme o tipo de câncer e o local da lesão**

Amostra	Paciente	Laudo Histopatológico	Local da lesão
1	19/19	Carcinoma verrucoso	Gengiva
2	20/24	Carcinoma de células escamosas oral invasivo	Região amigdaliana. Palato mole
3	20/22	Liquen plano	Mucosa jugal
4	19/20	Carcinoma de células escamosas oral invasivo	Borda lateral da língua
5	20/23	Liquen plano de mucosa	Rebordo alveolar maxilar esquerdo
6	20/27	Carcinoma de células escamosas oral invasivo	Lesão no assoalho bucal
7	20/26	Leucoplasia com displasia moderada	Palato
8	20/28	Leucoplasia com displasia moderada	Lateral da língua
9	19/18	Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado	Rebordo alveolar anterior da mandíbula
10	19/13	Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado	Labios
11	19/16	Carcinoma de células escamosas bem diferenciado	Lesão no assoalho bucal
12	19/21	Carcinoma de células escamosas bem diferenciado	Labio superior (mucosa oral)
13	19/14	Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado	Mucosa Jugal

**Figura 7: Classificação dos grupos a partir do diagnóstico histopatológico da lesão**

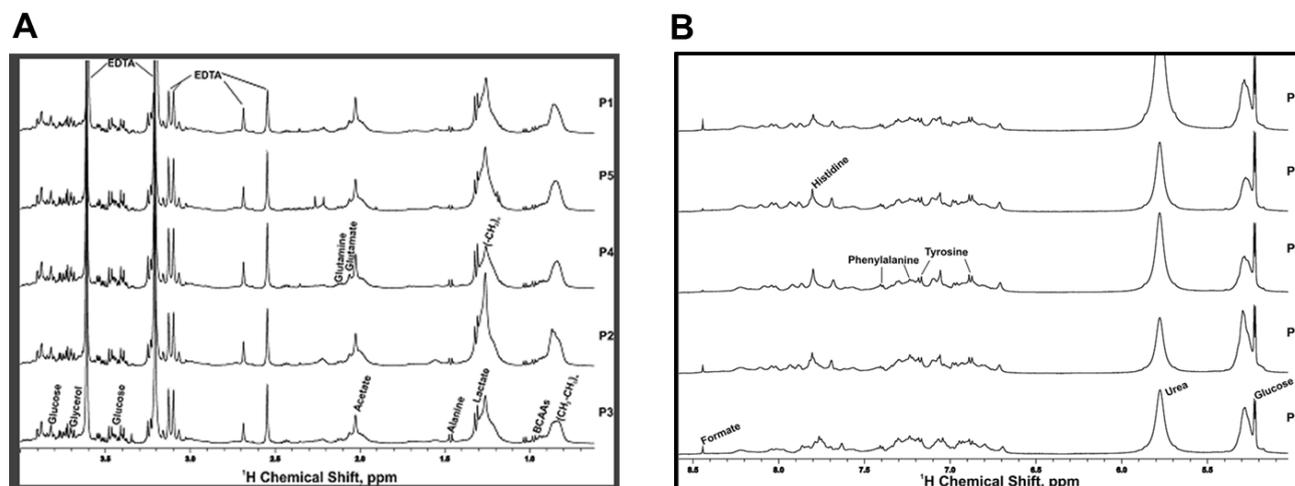


**Legenda:** Gráfico representando a classificação dos grupos conforme o laudo histopatológico da lesão. Grupo A (30,76%) é composto pelos pacientes acometidos por líquén e leucoplasia, o grupo B (46,15%) é composto pelos pacientes acometidas por carcinoma verrucoso, carcinoma de células escamosas moderadamente ou bem diferenciado e o grupo C (23,07%) os pacientes acometidos por carcinoma de células escamosa oral invasivo.

### 6.3 Metabolômica por RMN de pacientes com câncer oral

Para a metabolômica por RMN, foram adquiridos espectros de  $^1\text{H}$ , conforme mostra a figura 8, provenientes do plasma de pacientes com LCOs e CCEO. Foi realizado o assinalamento biodimensional automático adquirindo inicialmente um total de 24 compostos, no entanto existem outros compostos que não foram confirmados via 1D (unidimensional) (TABELA 4).

**Figura 8: Representação do momento da aquisição dos espectros de pacientes com LCOs e CCEO por RMN**



**Legenda:** Figura representativa do momento que os espectros foram adquiridos na RMN. No eixo y P1 (amostra CCEO invasivo), P5 (amostra CCEO bem diferenciado), P4 (amostra CCEO moderadamente diferenciado), P2 (amostra CCEO moderadamente diferenciado) e P3 (amostra de LCO), e no eixo x estão os picos espectrais relacionados a cada componente químico identificado que foram comparados conforme o deslocamento químico e com os dados já estabelecido pelo banco de dados de metaboloma humano.

A análise do componente principal (PCA) nos possibilita uma análise multivariada, e foi utilizada para avaliar o comportamento das amostras em virtude do perfil metabólico, identificando a partir da intensidade e concentração de diferentes compostos existentes na amostra biológica. Podemos observar que PC1 apresentou 39,6% das variáveis e PC2 apresentou 22,3%. Sendo assim, vimos que algumas amostras biológicas de grupos diferentes se sobrepõem, mostrando que tem o perfil metabólico mais próximo, porém vale destacar as 5 amostras de grupos distintos que estão dispersas, mostrando claramente a discriminação entre as mesmas. A amostra 6 (20/27) (FIGURA 9) do grupo C tem uma discrepância com relação a amostra 12 (19/21) do grupo B, já as amostras 13 (19/14) e 9 (19/18) do grupo B que possuem um perfil metabólico mais próximos são discrepante com relação a amostra 5(20/23) do grupo A (FIGURA 9). Podemos ressaltar também a discrepância de 2 amostras do grupo B, vimos a dispersão da amostra 11 (19/16) com relação também a amostra 12 (19/21) (FIGURA 9). Quando confrontamos os dados clinicopatológico, e o tipo CCEO, vimos que a amostra 6 é de um paciente que possui CCEO invasivo e tem hipertensão e a amostra 12 é de um paciente de possui CCEO bem diferenciado, é etilista, tabagista e ainda tem comorbidade

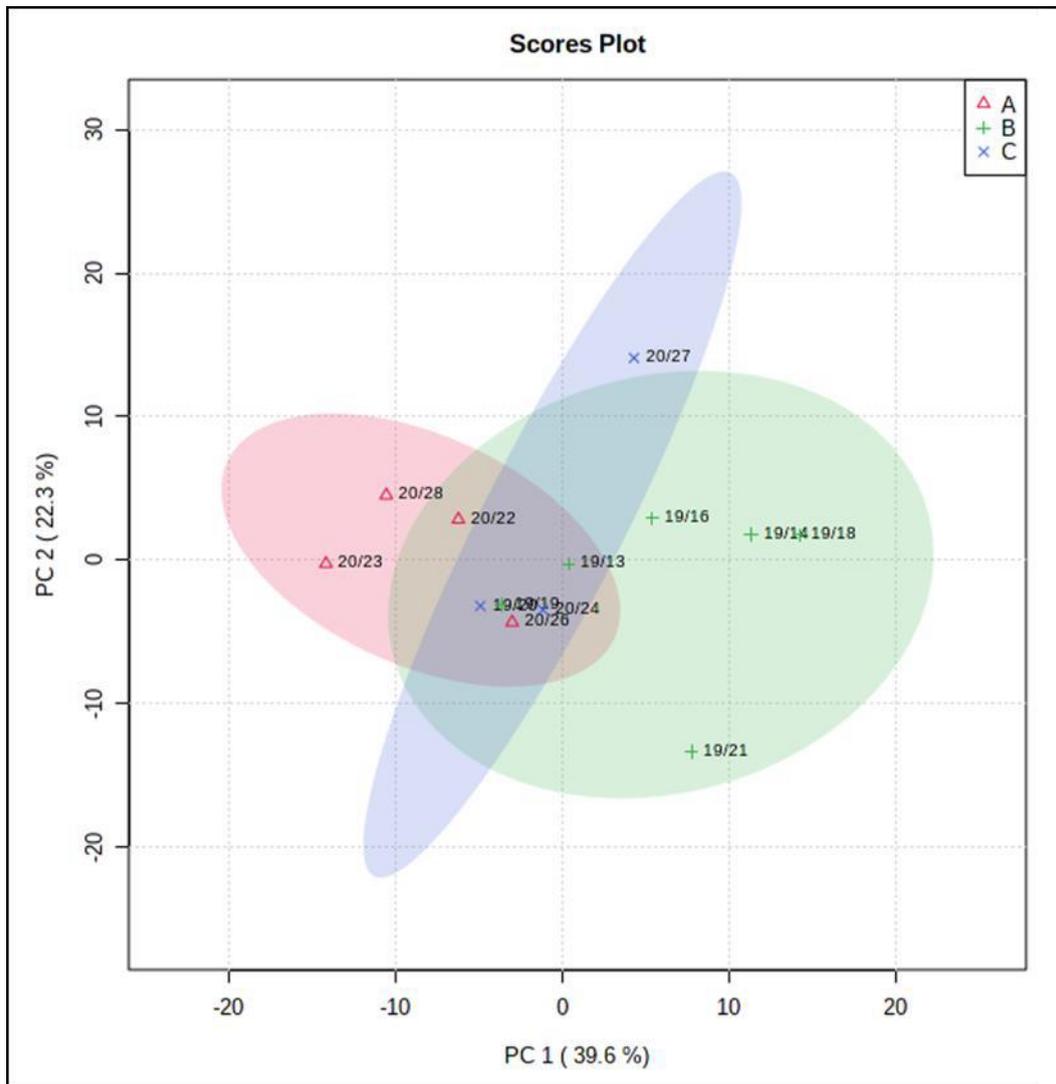
(TABELA 1 e 3) e (FIGURA 9). Dando continuidade a comparação, a amostra 5 que apresenta discrepância das amostras 13 e 9, é de um paciente que apresenta LCOs e é etilista e tabagista, já as amostras 13 e 9 são de pacientes com CCEO moderadamente diferenciado e consome bebidas alcólicas e fumam (TABELA 1 e 3) (FIGURA 9). E por fim quando relacionamos os dados das 2 amostras pertencente ao grupo B, vimos que as 2 são de pacientes que possuem CCEO bem diferenciado, porém o paciente da amostra 11 é diabético e o paciente da amostra 12 é etilista, tabagista e tem comorbidade (TABELA 1 e 3) (FIGURA 9). Ainda utilizando PCA (FIGURA 10) obtivemos uma análise de 79,7% das variáveis, adquirindo também uma classificação confiável. Nesta avaliação observamos com mais clareza a discrepância no perfil metabólico entre a amostra 6 do grupo C com a amostra 12 do grupo B, quando lembramos que a amostra 6 é de paciente com CCEO invasivo e a amostra 12 é de paciente com CCEO bem diferenciado, podemos propor que essa diferença esteja relacionada com o tipo de CCEO que cada paciente possui (TABELA 3) e (FIGURA 10).

Para identificar os metabólitos alterados mais significativamente relevantes para análise multivariada realizamos os loading plot, que nos possibilita através do fator de carga mostrar os compostos com seu respectivo deslocamento químico (ppm) que se destacaram e que causaram a separação das amostras considerando a diferença no perfil metabólico. Observamos que os compostos mais evidentes são as lipoproteínas n (CH<sub>3</sub>)(0,85), lipoproteínas n-(CH<sub>2</sub>) (1,27), malonato de metila (1,21), lactato (1,31), fosfoetanolamina (3,17), valina (3,57), treonina (3,59), glicose (3,39) e alguns outros que são classificados como compostos desconhecidos. (FIGURA 11) e (TABELA 4 e 5).

**Tabela 4: Compostos adquiridos no assinalamento bidimensional-** todos os compostos foram assinalados conforme seu deslocamento químico (ppm), existem mais compostos que não foram confirmados via 1D.

Metabólito	Chemical Shift (ppm)
Leucina	0,94
Alanina	1,48
Colina	3,50
Glicose	3,33- 3,72
Fosfoetano-lamina	3,17/3,96
Glicerol	3,76
Lactato	1,31
Lipoptn n (CH2)	1,28
Malonato de metila	1,21
Treonina	3,59
Valina	3,57
Acido Dimetilmalonico	1,22
Lisina	1,68
Acido amino - fosfonopropionico	2,06
Acetona	2,19
Acido levulinico	2,26
Acido aminobutirico	2,30
Acido fosfonoacético	2,68
Tetrametilamonium	3,18
Metanol	3,34
Xilose	3,52
Glicina	3,54
Acido Glutamico	3,74
Trimetil fosfatase	3,80

**Figura 9: Representação do comportamento do perfil metabólico das amostras de pacientes com LCOs e CCEO em 2D.**

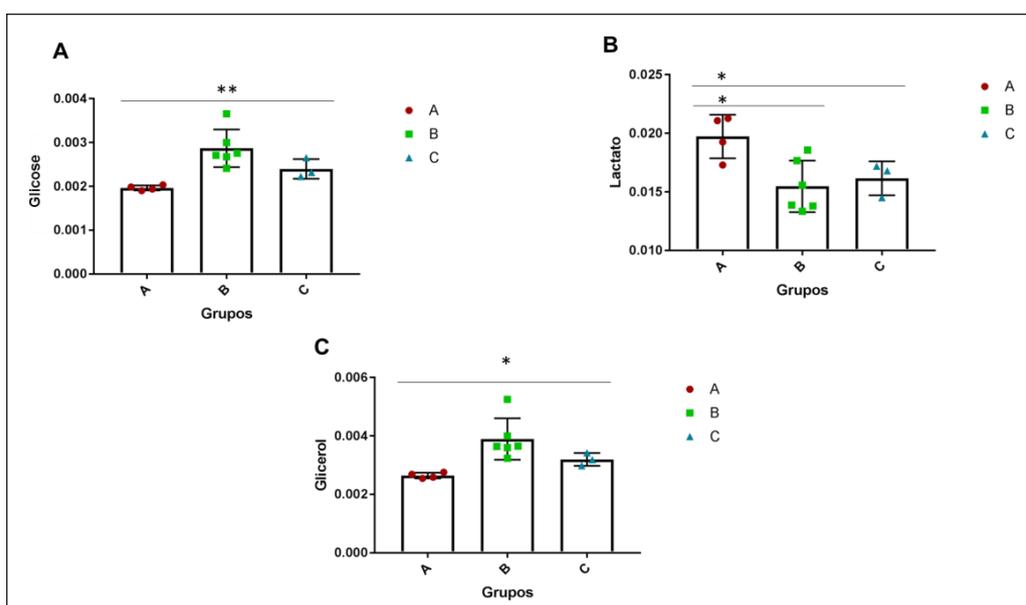


**Legenda:** Gráfico de PCA, de pontuação 2D da análise discriminante parcial do componente 1 e 2 da análise multivariada comparando as amostras de todos os grupos. Eixo X representa o PC 1 e eixo Y que é perpendicular representa PC2. O grupo A destacado na forma de triângulo na cor vermelha são amostras de pacientes com LCOs, o grupo B destacado com sinal de + e em verde são amostras de pacientes com CCEO bem e moderadamente diferenciado e o grupo C destacado em forma de X e azul são amostras de pacientes com CCEO invasivo.



Com intuito de verificar os metabólitos mais evidentes e alterados nos grupos estudados isoladamente e validar as análises multivariadas realizamos o múltiplo teste t. Observamos que os metabólitos mais alterados entre os grupos foram: glicerol, lactato, glicose, lipoproteína n (CH<sub>2</sub>), fosfoetanolamina, alanina, treonina, malonato de metila, valina e colina (FIGURAS 12 e 13) e (TABELA 4). Dentre esses compostos, destacamos os de importância significativa, diante disso podemos observar que a glicose foi mais presente nas amostras do grupo B em relação as amostras do grupo C e A, dando continuidade a comparação vimos que nas amostras do grupo C esse metabólito foi mais presente com relação as amostras do grupo A (FIGURA 12 A) e (TABELA 4). Vimos também que o lactato está mais concentrado nas amostras do grupo A em comparação as amostras do grupo B e C (FIGURA 12B) e (TABELA 4). Com relação ao glicerol observamos que foi mais presente nas amostras do B em comparação aos outros grupos, contanto quando comparamos as amostras do grupo C com as do grupo A, vimos que esse metabólito foi mais presente nas amostras do grupo C com relação as amostras do grupo A (FIGURA 12 C) e (TABELA4).

**Figura 12: Análise dos metabólitos Glicose, Lactato e Glicerol entre as amostras de pacientes dos grupos A, B e C.**

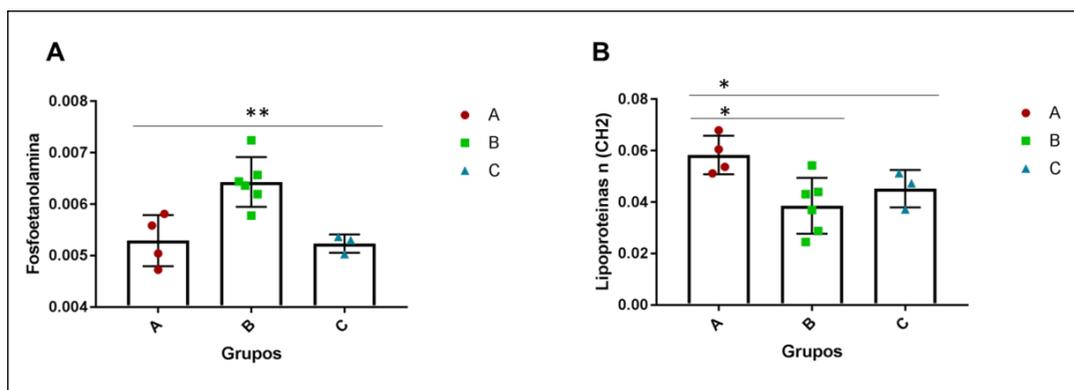


**Legenda: Glicose, lactato e glicerol se apresentaram como importantes marcadores entre as amostras de pacientes dos grupos A, B e C: A- análise de Glicose, B- análise de Lactato e C- análise de glicerol. No eixo y representa a intensidade do sinal dos metabólitos relativa e normalizada pelo somatório das intensidades e no eixo x representa as amostras de**

pacientes dos grupos A, B e C. Grupo A são amostras de pacientes acometidos por líquén e leucopasia representado por bolas vermelhas, o grupo B são amostras de pacientes acometido por carcinoma verrucoso, carcinoma de células escamosas moderadamente ou bemdiferenciado representado por quadrados verdes e o grupo C são amostras de pacientes acometidos por carcinoma de células escamosa oral invasivo representados por triângulo azul. Os dados apresentados foram analisados estatisticamente por teste t e anova Way e diferenças significativas entre as amostras estão indicadas por asteriscos ( $p < 0,05$ ).

Com relação a análise da fosfoetanolamina, observamos que as amostras do grupo B teve mais intensidade de sinal em comparação as amostras dos grupos A e C, porém as amostras do grupo A tiveram um discreto aumento desse metabólito com relação as amostras do grupo C (FIGURA 13A) e (TABELA 4). Vimos também que nas amostras do grupo A, as lipoproteínas n (CH2) foi mais presente em comparação as amostras dos grupos B e C (FIGURA 13 B) e (TABELA 4).

**Figura 13: Análise dos metabólitos Fosfoetanolamina e Lipoproteínas n (CH2) entre as amostras de pacientes dos grupos A, B e C.**



**Legenda: Fosfoetanolamina e Lipoproteínas n (CH2) se apresentam como importantes marcadores entre as amostras de pacientes dos grupos A, B e C:** A-análise de fosfoetanolamina, B- análise de lipoproteínas n (CH2). No eixo y representa a intensidade do sinal dos metabólitos e no eixo x representa as amostras de pacientes dos grupos A, B e C. Grupo A são amostras de pacientes acometidos por líquén e leucopasia representado por bolas vermelhas, o grupo B são amostras de pacientes acometido por carcinoma verrucoso, carcinoma de células escamosas moderadamente ou bem diferenciado representado por quadrados verdes e o grupo C são amostras de pacientes acometidos por carcinoma de células escamosa oral invasivo representados por triângulo azul. Os dados apresentados foram analisados estatisticamente por teste t e anova Way e diferenças significativas entre as amostras estão indicadas por asteriscos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5: Análise estatística dos metabólitos que se destacaram nas amostras dos grupos A, B e C a partir do Múltiplo teste t Mann-Whitney e Método de Benjamini-Krieger et Yekut.**

Metabólito	Chemical Shift (ppm)	Grupo A x Grupo B					Grupo A x Grupo C					Grupo B x Grupo C				
		Valor de p	Média A	Média B	Δ	Valor de q	Valor de p	Média A	Média C	Δ	Valor de q	Valor de p	Média B	Média C	Δ	Valor de q
Alanina	1,48	0,038	8,0	3,83	4,16	0,197	0,628	4,50	3,33	1,16	0,965	0,714	4,66	5,66	-1,00	>0,999
Colina	3,50	0,009	2,50	7,50	-5,00	0,121	0,057	2,50	6,00	-3,50	0,660	0,904	5,16	4,66	0,500	>0,999
Glicose	3,33- 3,72	0,009	2,50	7,50	-5,00	0,121	0,057	2,50	6,00	-3,50	0,660	0,095	6,16	2,66	3,500	>0,999
Fosfoetano-lamina	3,17/3,96	0,028	2,87	7,25	-4,37	0,185	0,114	2,75	5,66	-2,91	0,965	0,547	5,50	4,00	1,500	>0,999
Glicérol	3,76	0,009	2,50	7,50	-5,00	0,121	0,057	2,50	6,00	-3,50	0,660	0,047	6,33	2,33	4,000	>0,999
Lactato	1,31	0,019	8,25	3,66	4,58	0,151	0,057	5,50	2,00	3,50	0,660	0,547	4,50	6,00	-1,500	>0,999
Lipoptn n (CH2)	1,28	0,038	8,0	3,83	4,16	0,197	0,226	5,00	2,66	2,33	0,965	0,547	4,50	6,00	-1,500	>0,999
Malonato de metila	1,21	0,171	7,25	4,33	2,91	0,448	>0,999	4,00	4,00	6,00	>0,999	0,047	3,66	7,66	-4,000	>0,999
Treonina	3,59	0,476	4,50	6,16	-1,66	0,741	0,857	3,75	4,33	-0,58	>0,999	0,904	4,83	5,33	-0,500	>0,999
Valina	3,57	0,0380	3,0	7,16	-4,16	0,197	0,228	3,00	5,33	-2,33	0,965	0,547	5,50	4,00	6,000	>0,999

Análise estatística realizada com Múltiplo teste t Mann-Whitney, Método de Benjamini-Krieger et Yekut. Metabólitos que se destacaram nas amostras de pacientes dos grupos A, B e C, comparando grupo A com grupo B/ Grupo A com grupo C e grupo B com grupo C. Δ= Diferença da média entre os grupos A e B.

## 7 DISCUSSÃO

O câncer oral tem um difícil diagnóstico, por essa razão se faz importante uma pesquisa precoce para colaborar com o acréscimo da sobrevivência da pessoa acometida. Atualmente o diagnóstico padrão ouro é a biópsia incisiva feita muitas vezes realizadas no estágio avançado da doença. Diante disso, esse estudo propõe uma avaliação metabólica a partir de plasma de pacientes portadores de CCEO, com o intuito de encontrar um biomarcador evidente para caracterizar a doença antes mesmo da manifestação a partir do metabolismo.

Dos participantes neste estudo foi possível observar que a maioria dos pacientes são do gênero masculino (53,84%), com faixa etária de 60 a 80 anos (76,92%), com hábito de tabagismo (53,84%). Quando confrontamos com a literatura, vimos que nossos dados corroboram com os dados existentes, mostrando que a maioria dos pacientes acometidos são do sexo masculino, com histórico de tabaco e com idade entre 60 e 80 anos (INCA, 2020, BRUNISCHAKI *et al.*, 2018; JIANG X *et al.*, 2019, GIRARDI *et al.*, 2017).

Ao analisarmos os grupos de pacientes a partir do diagnóstico histopatológico da lesão, observamos que a maioria dos casos são de

pacientes que apresentam tumores moderadamente e bem diferenciados representando o grupo B cerca de 46,15%. Um estudo realizado por Filho e colaboradores entre 1997 a 2000 foi possível observar que 52,4% dos pacientes acometidos com CCEO eram com tumores moderadamente diferenciados, estando de acordo com os dados encontrados neste estudo (FILHO *et al.*, 2006).

A partir da análise multivariada, mesmo com uma pequena amostragem foi possível obter uma excelente discriminação entre as amostras de pacientes com diferentes tipos de lesões. Obtivemos discrepância do perfil metabólico de paciente com LCOs e de paciente com CCEO diferenciado ou invasivo, conseguimos discriminar entre os diferentes estágios da doença, quando confrontamos os dados clinicopatológico, e o tipo CCEO, podemos observar com mais clareza a diferença entre as amostras, podendo sugerir que o perfil metabólico apresentado pode ter relação com a clínica e os hábitos desses pacientes. Os dados encontrados nesse estudo corroboram com os dados encontrados no estudo de Tiziani *et al* em 2009, onde foi possível observar discrepância a partir da metabolômica em amostras de soro de pacientes saudáveis com amostras de soro de pacientes com CCEO em diferentes estágios, mostrando que o perfil metabólico obtido para o câncer oral é significativo mesmo para a doença em estágio inicial, sugerindo uma resposta metabólica sistêmica ao câncer (TIZIANI, *et al*, 2009).

De todos os metabólitos encontrados nesse estudo destacamos os mais evidentes e que deram a diferença no perfil metabólico, sendo eles glicerol, lactato, D- glucose- 2, lipoproteína n (CH<sub>2</sub>), fosfoetanolamina, alanina, treonina, malonato de metila, valina e colina. O aumento da detecção de lactato, D- glucose-2, colina nas amostras de plasma de LCOs e CCEO corroboram com os achados no trabalho de Kong *et al* 2015, onde induziram a carcinogênese oral em camundongos através da administração de óxido nitroquilonina (4NQO) e analisaram a partir do plasma as alterações metabólicas durante os estágios da doença, e observaram também uma regulação positiva de lactato, glicose, colina e uma regulação negativa de prolina, isoleucina, e aspartato sugerindo que esses metabólitos plasmáticos podem ser potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce e prevenção da doença (KONG *et al.*, 2015 e Chen, X., e

YU, D., 2019). Ainda analisando os metabólitos que foram evidenciados neste trabalho, observamos o aumento da presença de malonato no plasma de LCOs e CCEO, e confrontando esses dados com a literatura, vimos que o nível de malonato em amostras de CCEO também foi aumentado quando analisada por RMN (BAG et al, 2015 e Chen, X., e YU, D., 2019). Esses dados podem ser explicados visto que, malonato é um componente importante na síntese de ácidos graxos e biogênese de membrana em células de alta proliferação como as CCEO (BAG et al., 2015). Por fim, a presença dos aminoácidos alanina, treonina, valina e fosfoetilonamina, podem estar associados ao catabolismo de aminoácidos como observado em diversos estudos com amostras de CCEO (TIZIANI et al 2009, SRIVASTAVA et al, 2010, BAG et al, 2015 e Chen X., e YU, D., 2019). E a regulação positiva de glicerol e lipoproteína n (CH2) no plasma de LCOs e CCEO pode estar associado ao metabolismo de lipídeos como visto por Sant' Anna- Silva et al em 2019 em células de CCEO (Sant' Anna-Silva et al, 2018 e Chen, X., e YU, D., 2019).

Ao compararmos os grupos de amostras destacando os compostos que discriminaram significativamente os perfis metabólicos entre os grupos de amostras, observamos o aumento significativo do metabólito D-Glucose- 2 em amostras de plasma dos pacientes do grupo B, portadores de CCEO moderadamente e bem diferenciado, em comparação as amostras de plasma dos pacientes do grupo A, portadores de LCOs, e grupo C, portadores de CCEO invasivo, porém quando comparamos o grupo A com o grupo C vimos também aumento da intensidade do sinal de D-Glucose-2 nos pacientes do grupo C, a partir disso vimos que esse metabólito plasmático é mais presente em amostras de CCEO do que em amostra de LCO. A D-Glucose-2 é absorvido pelos transportadores de glicose da célula, com isso as células que possuem maior captação de glicose terão também um aumento na captação de D-Glucose-2, um exemplo das células com essas características são as células tumorais (PELICANO et al, 2006). Quando confrontamos nossos dados com a literatura podemos compreender que em células de câncer oral tem aumento da captação da glicose principalmente na carcinogênese, mostrando que nossos achados entram em concordância com o existente (BAG et al, 2015).

Com relação ao lactato, curiosamente nesse estudo foi observado que nas amostras do grupo A, portadores de LCOs, teve aumento significativo desse metabólito com relação as amostras dos grupos C e B que são de pacientes com CCEO, como visto em outros tipos de cânceres o efeito Warburg está ligado a acidose láctica e é mais presente em casos de carcinomas do que em lesões (BEGER, D.,R. 2013), porém quando comparamos nossos dados com a literatura vimos que em CCEO o lactato não teve contribuição significativa e nem regulação positiva em estudos metabólicos ( TIZIANI et al 2009, e BAG, et al 2015).

Ainda assim, foi notado um aumento significativo de glicerol em amostras do grupo B comparado aos grupos A e C. Os resultados obtidos sugere o envolvimento de vias interligadas no metabolismo de lipídeo em CCEO, uma vez que, o aumento de glicerol está em amostras de CCEO moderadamente e bem diferenciado. Sabemos que a geração de glicerol faz parte da lipogênese, e em células tumorais podem ser importantes para ativar o crescimento e a divisão celular rápida (RAY, U., e ROY, SS., 2017), tendo em vista que a alteração do metabolismo de lipídio é fator bem presente no câncer (MASHIMA et al, 2009). Nesse contexto, interessante, observamos um aumento significativo do lipídio insaturado a lipoproteína n (CH<sub>2</sub>) em amostras do grupo A, portadores de LCOs, em comparação com as amostras dos grupos B e C, esses achados corroboram com o estudo de Rai e colaboradores em 2019 onde foi observado o aumento desse metabólito em amostras de plasma de pacientes com fibrose submucosa oral, um tipo de LCO, porém, pré cancerígena, sugerindo um metabolismo de lipídio irregularizado como também já foi observado em células cancerosas orais (Sant' Anna- Silva et al, 2018 e RAI et al, 2019).

Outro dado encontrado nesse estudo foi o aumento significativo de fosfoetanolamina nas amostras do grupo B quando comparadas com os grupos A e C. A fosfoetanolamina é um aminoácido precursor dos fosfolipídios que são essenciais para formação das membranas celulares, sendo importante para a interação da matriz celular com citosol (Szachowicz-Petelska et al, 2013), em alguns estudos mostram o aumento desse composto durante o processo de carcinogênese (Dobrzyńska, et al, 2015 e CHENG et al, 2016 ), e também na

proliferação e sinalização de crescimento de células de CCEO (Sant' Anna- Silva et al, 2018). A partir disso, podemos sugerir que aumento de fosfoetanolamina em amostras de CCEO moderadamente e bem diferenciado pode estar relacionado com a sua função na membrana plasmática.

## **8 CONCLUSÃO**

Diante do exposto, podemos sugerir que no câncer oral os pacientes mais acometidos apresentam um histórico de tabagismo e com faixa etária entre 60 a 80 anos. Com relação as lesões encontradas nos pacientes acometidos com CCEO observamos que a maioria dos pacientes apresentam carcinoma moderadamente e bem diferenciados.

Conseguimos identificar uma diferença no perfil metabólico associado ao LCOs e CCEO. Além do mais, verificamos que o câncer oral apresenta um metabolismo de lipídeo alterado, faz aporte de aminoácidos e glicólise. Visto que, os metabólitos que mais se destacaram foram glicose, glicerol e fosfoetanolamina aumentando nas amostras de CCEO e lactato e lipoproteína n (CH<sub>2</sub>) aumentando nas amostras de LCOs podendo ser usado como futuros biomarcadores para a detecção precoce da doença ou prevenção.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANUMA D., et al. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol** 1999; 35:476-83.

ASIAGO, V.M. Early Detection of Recurrent Breast Cancer Using Metabolite Profiling. **Cancer Research**. Nov. 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1319

BARASCH A, SAFFORD M, EISENBERG E. Oral cancer and oral effects of anticancer therapy. **Mt Sinai J Med** .1998; 65:370-7.

BAG, S., et al. NMR (1)H and (13)C based signatures of abnormal choline metabolism in oral squamous cell carcinoma with no prominent Warburg effect. (2015). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 459, 574–578. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.149>.

BEGER, D.,R, A review of applications of metabolomics in cancer, **Metabolites** 3 (2013) 552e574.

BROSS, I. D. J.; COOMBS, J. Early onset of oral cancer among women who drink and smoke. **Oncology**, v. 33, n. 3, p. 136–139, 1976.

BRUNISCHAKI, K. A., et al. White blood cell count of patients with oral squamous cell carcinoma at the time of diagnosis: a cross-sectional retrospective study of a population from southern Brazil. **Journal of Dental Science**.2018;33(1):2-5.doi: <https://doi.org/10.15448/1980-6523.2018.1.29190>.

CHEN, X., e YU, D. Metabolomics study of oral cancers. **Springer Nature**. 8 Fev. 2019, 15/22. doi: 10.1007/s11306-019-1483-8

CHENG M, BHUJWALLA ZM, GLUNDE K. Targeting phospholipid metabolism in cancer. **Front Oncol** (2016) 6:266.10.3389/fonc.2016.00266

CHOI, J.S., et al. HR-MAS MR Spectroscopy of Breast Cancer Tissue Obtained with Core Needle Biopsy: Correlation with Prognostic Factors. **Plos One** . Dez., 2012.Disponívelem<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051712>> Acesso em 23 de nov., 2021.

CROWLEY, E. et al. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 8, p. 472–484, 2013.

DE OLIVEIRA, L. R. P. et al. Salivary Metabolite Fingerprint of Type 1 Diabetes in Young Children. **Journal of Proteome Research**, p. acs.jproteome.6b00007, 5 jul. 2016.

DEVIC, S.,Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? **Journal of Cancer** 2016, V7: 817-822. doi: 10.7150/jca.14274

DIAZ, L. A.; BARDELLI, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 6, p. 579–86, fev. 2014.

DOBRZYŃSKA I., et.al. Characterization of human bladder cell membrane during cancer transformation. **J Membr Biol** (2015) 248(2):301– 7.10.1007/s00232-015-9770-4

DOMÍNGUEZ-VIGIL, I. G. et al. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2912–2922, 2018.

FAN, T. W.-M.; LANE, A. N. NMR-based stable isotope resolved metabolomics in systems biochemistry. **Journal of biomolecular NMR**, v. 49, n. 3–4, p. 267–80, 26 abr. 2011.

FEDELE S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. **Head Neck Oncol** 2009; 1:5.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S25–S54, 2015.

FIDALGO, T. K. S. et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. **Metabolomics**, v. 9, n. 3, p. 657–666, 5 jun. 2013.

FILHO, F.S.A., et al. Paradigm of lymphatic spread in squamous cell carcinoma of the base of the tongue. **Rev. Col. Bras.** 33 (2) . Abr 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912006000200005>.

FRANCO EL, KOWALSKI LP, OLIVEIRA BV, CURADO MP, PEREIRA RN, SILVA ME, FAVA AS, TORLONI H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer** 1989; 43:992-1000.

SANTOS JR., G.C. The remodel of the “central dogma”: a metabolomics interaction perspective. **Springer link**. 9 mai. de 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11306-021-01800-8>> /acesso em: 23 de nov. de 2021

GIRARDI, F. M. et al. Histopathological differences between genders in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p. 147–150, 2017.

GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2020. International Agency for Research on Cancer -2020. Disponível em< GLOBOCAN website mapping tool > Acesso em: 01 de agosto. 2021.

GREENMAN, C. et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153–158, 2007

GUPTA, N. et al. Changing Trends in oral cancer – a global scenario. **Nepal Journal of Epidemiology**, v. 6, n. 4, p. 613, 1 maio 2017.

HEITZER, E.; ULZ, P.; GEIGL, J. B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 112–123, 2015.

HOFMAN, P.; POPPER, H. H. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? **Virchows Archiv**, v. 469, n. 6, p. 601–609, 2016.

HSU PP, SABATINI DM. Cancer cell metabolism: warburg and beyond. **Cell** (2008) 134(5):703–7. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021 7.

KONG, X., et al. Analysis of plasma metabolic biomarkers in the development of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. (2015). **Oncology Letters**, 9, 283–289. [https:// doi.org/10.3892/ol.2014.2619](https://doi.org/10.3892/ol.2014.2619)

KOWALSKI LP, CARVALHO AL, MARTINS PRIANTE AV, MAGRIN J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41:534-41.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**.

INCA 2018. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018: Incidência no Brasil. 2018. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp> > Acesso em : 10 de jul. 2018.

INCA 2020. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidência no Brasil. 2020. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao inca 2020](https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao_inca_2020)> Acesso em: 01 de agosto de 2021.

IRANI, S. Pre-cancerous lesions in the oral and maxillofacial region: A literature review with special focus on etiopathogenesis Iranian **Journal of Pathology**, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855922>>. Acesso em: 22 jun. 2018

Jiang\* X, Wu\* J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tobacco Induced Diseases*. 2019;17(April):29. doi:10.18332/tid/105844

JUNIOR ET AL. Oral cancer based on scientific evidences. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 67, n. 3, São Paulo, 2013. Disponível em: <[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?pid=S0004-52762013000300002&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?pid=S0004-52762013000300002&script=sci_arttext&tlng=pt)> Acesso em : 05 de jul. 2018.

MACHADO, A. R. T. Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona spp* para o Controle de Nematoides. Belo Horizonte, 2014.

MASHIMA, T., et al. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, 2009, 100(9), 1369.

MORENO-SÁNCHEZ R, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ S, MARÍN-HERNÁNDEZ A, SAAVEDRA E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* (2007) 274(6):1393–418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x 9.

MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 04, p. 694–699, 2005.

PAVLOVA NN, THOMPSON CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* (2016) 23(1):27–47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006  
PELICANO, H., et al. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**. 2006. 25 (34):4633/4646. PMID 16892078. doi:10.1038/sj.onc.1209597.

PEREIRA DA SILVA, A. P. et al. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 3, p. 717–26, 1 fev. 2009.

RAI, V. Delineating metabolic dysfunction in cellular metabolism of oral submucous fibrosis using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Arch Oral Biol**. 2019 Jan;97:102-108. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.016. Epub 2018 Oct 21.

RAY, U. e ROY, S.S. Aberrant lipid metabolism in cancer cells- the role of oncolipid-activated signaling. **FEBS J**. 2017. 10-1111.

SANT'ANNA-SILVA, A. C. B. et al. Metabolic Profile of Oral Squamous Carcinoma Cell Lines Relies on a Higher Demand of Lipid Metabolism in Metastatic Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 13, 2 fev. 2018.

SCHAFER M, WERNER S (2008) Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:628–638

SHAH JP E LYDIATT W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin* 1995; 45:352-68.

SRIVASTAVA et al. Proton HR-MAS MR spectroscopy of oral squamous cell carcinoma tissues: an ex vivo study to identify malignancy induced metabolic fingerprints. 2011. **Metabolomics**, 7, 278–288. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0253-4>.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009.

SZACHOWICZ-PETELSKA B., et. al. J. Phospholipid composition and electric charge in healthy and cancerous parts of human kidneys. **J Membr Biol** (2013) 246(5):421–5. [10.1007/s00232-013-9554-7](https://doi.org/10.1007/s00232-013-9554-7)

ULAGANATHAN, G. et al. A clinicopathological study of various oral cancer diagnostic techniques. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 9, n. 5, p. 4, nov. 2017.

TIZIANE, S. ET AL. Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using 1 H NMR–Based Metabolomics. **Neoplasia**, v. 11 p. 269-276, marc. 2009

WARD PS, THOMPSON CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* (2012) 21:297–308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014

WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. Database issue,608-617, 27 de maio 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Cancer- 2018. Disponível em:< <http://www.who.int/cancer/en/> > Acesso em : 24 de jun. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Cancer- 2020 Disponível em< <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab>> Acesso em: 23 de nov de 2021

ZAMBONI, N.; SAGHATELIAN, A.; PATTI, G. J. **Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation** *Molecular Cell*, 2015.

**ANEXO I: Cronograma de Execução**

<b>ATIVIDADES</b>	<b>2018/2</b>	<b>2019/1</b>	<b>2019/2</b>	<b>2020/1</b>
Disciplinas	X	X	X	X
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X
Reunião para alinhamento dos procedimentos de coleta sanguínea	X UM MÊS			
Coleta de amostras sang. dos pacientes com diag. clínico de carcinoma oral	X TODO O SEMESTRE	X TODO O SEMESTRE		
Aliquotagem, acondicionamento e transporte da amostra para o laboratório	X	X	X	X
Processamento para metabolômica	X	X	X	X
Espectroscopia por RMN		X	X	X
Aquisição dos espectros por RMN		X	X	X
Análise de dados e quantificação dos metabólitos presente em todas as amostras		X	X	X
Comparação dos resultados com outras pesquisas de colaboração		X	X	X
Divulgação dos resultados do projeto( eventos acadêmicos)			X	X
Preparo de dissertação				X
Elaboração de artigo científico				X

## ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido

### 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 NA MODULAÇÃO 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](mailto:carinabogho@yahoo.com.br); telefone: 21-972009913) e Cláudia Maria Pereira (e-mail: [claudemarie\\_br@yahoo.com.br](mailto: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](mailto:cep@unigranrio.com.br).

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pai / Mãe ou Responsável Legal

## ANEXO III: Questionário utilizado para anamnese

Universidade do Grande Rio Faculdade de Odontologia	
Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Sem tratamento prévio Carcinoma de Células Escamosas Língua oral, gengiva superior, gengiva inferior, assoalho bucal, palato duro, região jugal, sulcos orofaríngeos, área retroamigdal	Tratamento prévio Outros tumores de Cabeça e Pescoço previamente tratados Tumores múltiplos simultâneos RT ou QT prévios

IDENTIFICAÇÃO E DADOS DEMOGRÁFICOS

1. Número do estudo: \_\_\_\_\_
2. Nome do paciente: \_\_\_\_\_
3. Data de nascimento: \_\_\_\_\_
4. Gênero: ( ) Masculino ( ) Feminino
5. Raça: ( ) Branca ( ) Amarela ( ) Negra ( ) Outra \_\_\_\_\_
6. Naturalidade: \_\_\_\_\_
7. Procedência (local de residência anterior a atual): \_\_\_\_\_
8. Endereço: \_\_\_\_\_
9. Telefone: Res: \_\_\_\_\_ Cel: \_\_\_\_\_
10. Profissão: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA CLÍNICA

11. História familiar de câncer: ( ) Não ( ) Sim. Grau de parentesco ( ) Pai ( ) Mãe ( ) Irmão ( ) Outro (s) \_\_\_\_\_ ( ) Desconhece
12. Uso de tabaco: ( ) Não ( ) Sim Tempo \_\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_  
Quantidade (dia) \_\_\_\_\_ Marca \_\_\_\_\_
13. Uso de álcool ( ) Não ( ) Sim Tempo \_\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_  
Frequência \_\_\_\_\_
14. Prática sexo oral: ( ) Sempre ( ) Nunca ( ) Às vezes.
15. Uso de preservativo: ( ) Sempre ( ) Nunca ( ) Às vezes.
16. Portador de alguma alteração sistêmica ( ) Não ( ) Sim. Qual? \_\_\_\_\_
17. Medicamentos: \_\_\_\_\_

LOCO-REGIONAL

18. Local de remoção do tecido: ( ) ponta de língua ( ) corpo de língua ( ) ponta e corpo de língua  
( ) borda lateral de língua ( ) sulco palmo-lingual ( ) assoalho ( ) gengiva inferior  
( ) gengiva superior ( ) trigono retromolar ( ) fundo do sulco de vestibulo ( ) tuberosidade  
( ) palato duro ( ) palato mole ( ) mucosa labial ( ) mucosa jugal

Outras: \_\_\_\_\_

CIRURGIA

19. Data da coleta: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_
20. Tipo de cirurgia: \_\_\_\_\_

Nome do coletor de Dados: \_\_\_\_\_

#### **ANEXO IV: INFRAESTRUTURA E APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO**

A preparação e armazenamento das amostras serão realizados em colaboração com os pesquisadores do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer e os de Metabolômica em colaboração com o CENABIO I- UFRJ que tem convênio já estabelecido com a UNIGRANRIO.

O laboratório de RMN de Biomoléculas contém toda infraestrutura de laboratório para realização do projeto, contando com incubadoras, centrífugas, balanças, equipamento de cromatografia e alta performance, sintetizador de peptídeos, fluorímetro, espectrofotômetro entre outros equipamentos de laboratório.

O CNRMN - Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, pertence a unidade CENABIO I (Centro de Bioimagem I), e fica situado no campus da Ilha do Fundão, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O centro conta com 6 espectrômetros de RMN (400, 500, 600, 700, 800 e 900 MHz), sendo o 600 MHz equipado com criosonda e todos com sondas de tripla ressonância e sondas de banda larga sintonizáveis para diversos núcleos. Estes equipamentos permitem a realização de experimentos necessários para determinação de estrutura de macromoléculas, bem como para análise metabolômica.