

ANÁLISE DO PERFIL MICROBIANO DE LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS

TERESA PAULA DE LIMA GUSMÃO

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Fábio de Abreu Alves, PhD

Coorientador: Emmanuel Dias-Neto, PhD

São Paulo
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Gusmão, Teresa.

Análise do perfil microbiano de lesões orais potencialmente malignas. / Teresa Paula de Lima Gusmão. – São Paulo, 2022.
88f.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Fábio de Abreu Alves.
Coorientador: Emmanuel Dias-Neto.

1. microbioma oral. 2. Lesões potencialmente malignas.
3. metagenômica.

CDU 616

Nome: Teresa Paula de Lima Gusmão

Título: Análise do perfil microbiano de lesões orais potencialmente malignas

Aprovado em: 07/10/2022

Banca Examinadora

Orientador: Fábio de Abreu Alves

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Coorientador: Emmanuel Dias Neto

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Graziella Jaguar

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Jair Carneiro Leão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Membro da banca: João Gonçalves

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Mauro Kasuo Ikeda

Instituição: Fundação Antônio Prudente

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON-SIPAR), através de auxílio à Pesquisa - Estudo de perfis microbianos em tumores humanos: implicações para tumorigênese, prognóstico e resposta ao tratamento. SIPAR 25000.055.167/2015-23.

DEDICATÓRIA

A todos os participantes do estudo, que foram fundamentais para a realização do mesmo e que em momento de dúvidas, diante do diagnóstico de uma lesão potencialmente maligna, se disponibilizaram voluntariamente a contribuir para a realização da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por me abençoar sempre, por me conceder coragem para acreditar, conforto nas horas difíceis e colocar pessoas que foram verdadeiros anjos nessa jornada de 4 anos de doutoranda com muito crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, **José Augusto** e **Nádia**, por todo amor e cuidado, sempre presentes incentivando e apoiando a lutar pelos meus sonhos. E aos meus irmãos, **Juliana**, **Reginaldo** e **Maria Luísa**, por toda torcida para que tudo se encaminhasse tranquilo.

Ao meu amado esposo **Vinicius Fernandes**, por todo apoio diário, cuidado, abraço a cada choro e sorrisos cada vez que algo deu certo. Seu apoio foi fundamental nessa jornada e tenho certeza que nossa cumplicidade só aumentou nesse tempo.

Ao meu orientador **Dr. Fábio Alves**, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por todos os ensinamentos e contribuição no meu processo de aprendizado. Também agradeço pela oportunidade de vivenciar esses 4 anos no Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center, um sonho realizado poder conviver e aprender com profissionais tão capacitados, e por todas as conversas e risadas regadas a cafés.

Ao meu coorientador **Dr. Emmanuel Dias-Neto**, por aceitar o desafio de inserir profissionais de saúde de diversas graduações, eu e outros alunos que participam do laboratório, no mundo da metagenômica. Pela oportunidade aprender com um renomado pesquisador, com uma simplicidade sem igual, disponibilidade para pensar junto.

A **Dra. Thais Bartelli**, por toda ajuda no dia a dia da bancada, por me ensinar sobre todas as fases do processamento laboratorial das amostras, mesmo durante a pandemia, pela ajuda nas análises com o R do projeto, pelos artigos enviados que tanto me ajudaram a entender sobre metagenômica, por todo incentivo e apoio, mesmo quando eu acreditava que não ia dar certo e principalmente pela sua preciosa amizade, conversas e conselhos que ficam para vida.

A todos do Departamento de Estomatologia por toda ajuda, ensinamentos, aulas, confraternizações e apoio. Aos titulares, pela convivência e permitir que eu participasse de seus ambulatórios, em especial Ao **Rodrigo Nascimento** por todo o carinho ao me chamar de “Terência”, pelos ensinamentos, conversas e risadas; Ao **Divaldo Prado** por ensinar a importância da reabilitação do paciente, pelas conversas e por proporcionar churrascos

maravilhosos em Itu. E a **Dra. Graziela Jaguar**, minha admiração e inspiração por ver uma mulher nordestina, profissional exemplar da qual tive a oportunidade de aprender e conviver, minha gratidão por seus conselhos, amizade e cuidado nesses 4 anos. Também agradeço suas considerações na qualificação deste projeto, juntamente com o professor **Dr. Márcio Lopes**, gratidão.

Aos residentes do Departamento de Estomatologia que pude conviver nesses 4 anos, por me ensinarem tanto da dinâmica do ambulatório, pela lembrança do projeto a cada lesão potencialmente maligna que passava no ambulatório, pelas risadas e momentos de almoço ou descontração.

Aos colegas da Pós-graduação foi muito importante compartilhar as alegrias e angústias com vocês. A **Francieli Batista** a quem tenho um carinho enorme e sempre nos alegrando com seu alto astral; **Mariana Bitu**, por aprendermos juntas e cafés; a **Nathalia Mendonça** que desde quando era residente sempre doce e alegre, por nossas conversas, obrigada por tanto ouvir eu dizer “tenho que defender o doutorado”. A **Dra. Marianna Serpa** por ter me ensinado a pipetar, a realizar extração de DNA e acreditar que o DNA estava naquele filtro pequeno e que sempre devemos ir olhando o passo a passo do protocolo para não errar. Em especial, a **Letícia Pacheco** e **Dra. Erica Patrício**, minhas paulistanas que se tornaram porto seguro nessa cidade, amigas que se tornaram família, participaram muito mais do que a rotina da pós-graduação, que ligam só para dizer que estão com saudade, que durante muito tempo no doutorado nossa alegria era almoçar juntas nossas marmitas no refeitório do hospital, eu amo muito vocês!

A todos do Laboratório de Genômica Médica, que me acolheram muito bem. A **Dra. Diana Noronha Nunes**, por estar sempre solícita a me ajudar, todas as vezes que precisei sanou minhas dúvidas, pela motivação na pesquisa e contribuições durante todo o processo. A **Dra. Isabela Kuniko**, por toda sua positividade, sempre nos ensinando a ver o lado bom das coisas. As técnicas **Gabriela Branco** e **Luana Batista**, por toda ajuda com os experimentos de qPCR, por disponibilizarem tantos cafés, pelas conversas sobre nossos queridos filhos pets. E a **Laís Alcarde**, por toda sua doçura e chocolates nos momentos de descontração.

A todos do centro cirúrgico ambulatorial, em especial ao **Arthur Crivellaro**, que me ajudaram quando as coletas de material biológico eram realizadas no centro cirúrgico ambulatorial.

Ao **Dr. Alexandre Defelicibus** e pessoal do Laboratório de Bioinformática pela aplicação dos filtros de qualidade dos dados após o sequenciamento.

Ao departamento de estatística, em especial a **Barbara Beltim** por todas as reuniões e ajudas nas análises estatísticas do projeto.

Ao meu querido professor **Dr. Jair Leão**, por me incentivar na formação acadêmica desde a graduação e um grande incentivador do meu doutorado no A.C.Camargo Cancer Center. E aos queridos amigos do grupo de estomatologia/UPFE, professora **Dra. Alessandra Carvalho**, **Dra. Andreza Barkokebas**, **Adriana Machado** e **Dr. Igor Henrique Silva**, por todos esses anos que partilho de vida acadêmica e amizade com vocês.

A **Dra. Fabiana Zuchetto**, por ser rede de apoio e me ensinar tanto da odontologia clínica, por toda a paciência com minha ausência para realizar as atividades do doutorado e pela sua amizade e conselhos.

A banca examinadora **Dra. Graziela Jaguar**, **Dr. Jair Leão**, **Dr. João Gonçalves** e **Dr. Mauro Ikeda** pela avaliação e arguição da defesa, grata pelas considerações e palavras.

Ao **Programa de Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center** pelo apoio a nós discentes.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES)**, pelo fomento na forma de bolsa de estudos, durante os dois anos dos quais fui dedicação exclusiva.

Ao **Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)**, pelo apoio financeiro que me possibilitou a execução deste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para realização deste estudo.

RESUMO

GUSMÃO TPL. **Análise do perfil microbiano de lesões orais potencialmente malignas.** [Tese de doutorado]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

As lesões orais potencialmente malignas são alterações que exibem maior risco de transformação maligna em comparação com a mucosa saudável. Apesar de sua relevância, a literatura ainda não definiu o papel da microbiota na etiologia e no processo de malignização dessas lesões. Assim, neste trabalho, realizamos um estudo do tipo caso controle de caráter longitudinal, prospectivo e quantitativo onde avaliamos as populações bacterianas do microbioma oral em pacientes com lesões orais potencialmente malignas. Para isso, utilizamos um questionário estruturado e coletamos *swabs* orais em pacientes portadores de leucoplasia, eritroplasia, líquen plano, lesão líquenóide oral e também controles saudáveis. Participaram do estudo 60 indivíduos, no período de coleta de 2018 à 2020, sendo 39 do grupo caso e 21 do grupo controle. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (42/60; 70%) com média de idade de 57 anos, e mais da metade dos indivíduos eram não fumantes (35/60; 58,3%) e etilistas (36/60; 60%). Dentre os diagnósticos, observamos a maioria dos indivíduos com líquen plano oral/lesão líquenóide oral (13/39), seguidos de leucoplasia homogênea (10/39), eritroleucoplasia (8/39), leucoplasia verrucosa proliferativa (6/39) ou eritroplasia (2/39). A borda da língua foi o local mais comumente acometido, com a maioria apresentando múltiplos sítios (21/39). A displasia epitelial foi avaliada nas lesões, exceto líquen plano e lesões líquenóides, e 18 pacientes tiveram algum grau de displasia. Um total de 73 amostras tiveram a região V3-V4 do gene 16S rRNA amplificada e sequenciada, sendo 60 amostras referentes à primeira coleta e 13 ao segundo momento de coleta dos participantes do grupo caso, sendo que 3/13 desses indivíduos vieram a ter um diagnóstico de carcinoma espinocelular oral. Identificamos maior quantidade de genomas bacterianos por genomas humanos nas amostras do grupo caso, no entanto, a diversidade e composição bacteriana foram semelhantes entre casos e controles. No total, identificamos 9 filos, 15 classes, 24 ordens, 47 famílias e 67 gêneros bacterianos. O gênero mais abundante foi *Streptococcus* em ambos os grupos, com menor frequência nos casos. Encontramos ainda alta abundância dos gêneros *Granulicatella* e *Blautia* nos indivíduos com lesões orais e menor abundância de

Methylobacterium, *Lautropia* e *Oribacterium*. Observamos também que a abundância de *Granulicatella* e *Bergeyella* foi maior nas lesões com displasia epitelial. A transformação maligna em carcinoma espinocelular oral ocorreu em 10/39 (25,6%) dos casos, onde a presença de displasia epitelial aparentou ser um fator de risco relevante. A diversidade bacteriana foi semelhante entre os indivíduos do grupo caso que sofreram ou não malignização, porém, a abundância dos gêneros *Capnocytophaga*, *Finnegoldia*, *Prevotella* e *Prevotella 2* foi maior nas amostras que sofreram malignização, mesmo antes do processo acontecer. Não encontramos diferenças na composição bacteriana entre os dois tempos de coleta, ao diagnóstico e após aproximadamente um ano, e também não observamos diferenças significativas na quantidade de DNA bacteriano e humano. Ao inferirmos as vias metabólicas derivadas das bactérias identificadas nas amostras, observamos também similaridade entre os grupos caso e controle, e apenas duas vias preditas apresentaram abundância com diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que distúrbios orais potencialmente malignos podem estar associados a uma disbiose do microbioma oral, e que alguns gêneros bacterianos podem ser potenciais biomarcadores ou agentes importantes neste processo biológico.

Palavras-chaves: microbioma oral, lesões potencialmente malignas, metagenômica.

ABSTRACT

GUSMÃO TPL. **The microbial profile of potentially malignant oral disorders.** [Tese de doutorado]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Oral potentially malignant disorders have a higher risk of becoming cancer than healthy mucosal tissues. However, up until now, the literature did not define the role of the microbiota in the origin and development of malignancy in these lesions. Thus, here we conducted a longitudinal, prospective, and quantitative case-control study where we evaluated the bacterial composition of the oral microbiome in patients with potentially malignant lesions. Therefore, we used a structured questionnaire and performed oral swabs on patients with leukoplakia, erythroplakia, lichen planus, oral lichenoid lesion, and healthy controls. A total of 60 individuals, collected between 2018 to 2020, were enrolled in the study, of which 39 were cases and 21 were controls. The majority of patients were female (42/60; 70%) with a mean age of 57 years and over half of the individuals were non-smokers (35/60; 58.3%) and alcoholics (36/60; 60%). Among the diagnoses, there were oral lichen planus/oral lichenoid lesion (13/39), homogeneous leukoplakia (10/39), erythroleukoplakia (8/39), proliferative verrucous leukoplakia (6/39) and erythroplakia (2/39). The tongue edge was the most common location affected, with the majority having multiple sites (21/39). Epithelial dysplasia was assessed in the lesions, except for lichen planus and lichenoid lesions, and 18 patients had some degree of dysplasia. A total of 73 samples had the V3-V4 region of the 16S rRNA gene amplified and sequenced, in which 60 samples were collected at diagnosis (first collection point) and 13 samples were collected after approximately a year (second moment of collection). At least 03/13 of these patients were later diagnosed with oral squamous cell carcinoma. We identified a higher amount of bacterial per human genomes in the samples of the case group, however, the bacterial diversity and composition were similar between cases and controls. We identified 9 phyla, 15 classes, 24 orders, 47 families, and 67 bacterial genera. The most abundant genus was *Streptococcus* in both groups, with lower relative frequency in the individuals with potentially malignant lesions. We found a higher abundance of the genera *Granulicatella* and *Blautia* in the cases and lower abundance of *Methylobacterium*, *Lautropia*, and *Oribacterium*. We also observed that the abundance of *Granulicatella* and *Bergeyella*

increased in the lesions with epithelial dysplasia. Malignant transformation into oral squamous cell carcinoma occurred in 10/39 (25.6%) of the cases patients, where the presence of epithelial dysplasia was a relevant risk factor. The bacterial diversity was similar between the individuals in the case group regardless if they malignized or not, however, the abundance of the genera *Capnocytophaga*, *Fingoldia*, *Prevotella*, and *Prevotella 2* was higher in the samples that underwent malignization, even before this process took place. We did not find significant differences in the bacterial composition between the two collection points and we also did not observe significant differences in their amount of bacterial and human DNA. When inferring the metabolic pathways derived from the bacteria identified in the samples, we also observed similarity between the case and control groups, and only two predicted pathways showed abundance with statistically significant differences between them. Thus, our results suggest that potentially malignant oral disorders may be associated with a dysbiosis of the oral microbiome, and that some bacterial genera may be potential biomarkers or important agents in this biological process.

Keywords: oral microbiome, potentially malignant lesions, metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curvas de saturação das amostras sequenciadas.....	34
Figura 2	Curva de saturação das amostras com número de sequências abaixo de 500.	34
Figura 3	Razão entre os genomas bacterianos/humanos entre os grupos caso com displasia, caso sem displasia e controle	37
Figura 4	Razão entre os genomas bacterianos/humanos para as amostras com LOPM nos momentos de coleta 1 e 2.....	37
Figura 5	Gráfico de correlação linear observada entre a razão do número de cópias dos genomas bacterianos/humanos em relação ao número de sequências obtidas no sequenciamento do gene 16S rRNA (Correlação Spearman).....	38
Figura 6	Diversidade alfa em relação aos grupos caso e controle.....	40
Figura 7	Diversidade beta entre os grupos caso e controle.....	41
Figura 8	Diversidade alfa em relação aos grupos caso (com e sem displasia) e controle.....	42
Figura 9	Diversidade beta entre os grupos caso (com e sem displasia) e controles.....	43
Figura 10	Abundância relativa das bactérias a nível de família (A) e gênero (B) nas amostras dos casos e controles.....	44
Figura 11	Frequência relativa das bactérias a nível de família (A) e gênero (B) nas amostras dos casos e controles.....	45
Figura 12	Análise comparativa da frequência relativa dos gêneros mais abundantes entre os grupos caso e controle	47
Figura 13	Análise comparativa da frequência relativa dos gêneros menos abundantes entre os grupos caso e controle.....	47
Figura 14	Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso <i>versus</i> grupo controle.....	51
Figura 15	Frequência relativa das bactérias diferencialmente abundantes entre os grupos caso e controle identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC.....	51

Figura 16	Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso sem displasia <i>versus</i> caso com displasia.....	52
Figura 17	Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso com displasia <i>versus</i> caso sem displasia identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC.....	53
Figura 18	Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso com displasia <i>versus</i> grupo controle.....	54
Figura 19	Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso com displasia <i>versus</i> controle identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC.....	54
Figura 20	Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso sem displasia <i>versus</i> grupo controle.....	55
Figura 21	Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso sem displasia <i>versus</i> grupo controle.....	55
Figura 22	Diversidade alfa em relação a ocorrência ou não de malignização.....	59
Figura 23	Diversidade beta em relação a ocorrência ou não de malignização.....	60
Figura 24	Abundância relativa dos gêneros bacterianos de acordo com diagnóstico das LOPM (A, B) e ocorrência ou não de malignização.....	61
Figura 25	Identificação dos gêneros em relação as amostras que malignizaram ou não.	61
Figura 26	Identificação de gêneros bacterianos diferencialmente abundantes pela análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; p<0,05) entre amostras que sofreram ocorrência de malignização ou não.....	62
Figura 27	Identificação de gêneros bacterianos diferencialmente abundantes pelo método ANCOM-BC entre amostras que sofreram ocorrência de malignização ou não.....	62
Figura 28	Frequência relativa das bactérias diferencialmente abundantes entre a ocorrência de malignização ou não identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC.....	63
Figura 29	Diversidade alfa em relação aos momentos de coletas 1 e 2.....	65

Figura 30	Diversidade beta entre os momentos de coleta 1 e 2.....	65
Figura 31	Abundância relativa bacteriana, a nível de gênero, entre os momentos de coletas 1 e 2 (um ano após a primeira coleta).....	66
Figura 32	Diferença da composição microbiana entre as amostras nos diferentes momentos da coleta, coleta 1 e coleta 2.....	67
Figura 33	Diferença das vias metabólicas preditas entre as amostras caso (LOPM) e controle.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais e principais achados dos estudos de microbiota em LOPM disponíveis na literatura.....	17
Tabela 2	Características gerais dos 60 participantes recrutados pelo estudo.....	28
Tabela 3	Dados de saúde bucal dos pacientes casos e controles.....	29
Tabela 4	Descrição das características clínicas das LOPM de acordo com o diagnóstico.....	31
Tabela 5	Correlação da classificação das displasias epiteliais com o diagnóstico das LOPM.....	32
Tabela 6	Correlação das características clínicas dos casos em relação a presença de displasia.....	33
Tabela 7	Valores médios de Ct obtidos para cada gene-alvo entre os grupos do estudo.....	36
Tabela 8	Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com o diagnóstico das LOPM e sua abundância relativa.....	46
Tabela 9	Análise da transformação maligna em relação aos fatores de risco dos pacientes caso.....	59
Tabela 10	Diagnóstico histopatológico com relação aos diferentes momentos da coleta.....	64
Tabela 11	Top 10 vias metabólicas mais abundantes nas amostras dos grupos caso e controle.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios arquiteturais e citológicos para classificação da displasia epitelial oral.....	2
Quadro 2	Critérios para classificação do grau de displasia epitelial oral, segundo OMS.....	3
Quadro 3	Critérios de diagnóstico de LVP, recomendado por Cerero-Lapiedra et al (2010).....	5
Quadro 4	Critérios diagnósticos para líquen plano oral.....	8
Quadro 5	Condições de amplificação do gene 16S rRNA.....	23
Quadro 6	Condições de termociclagem para amplificação do gene 16S rRNA	23
Quadro 7	Condições de amplificação dos fragmentos de DNA bacteriano (16S rRNA - região V1) e humano.....	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Alfa
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ACCCC	A.C.Camargo Cancer Center
ANCOM-BC	Análise de composições de microbioma com correção de viés (do inglês, <i>Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction</i>)
ASV	Variante de sequência de amplicon (do inglês <i>Amplicon Sequence Variant</i>)
CEC	Carcinoma espinocelular oral
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO₂	Dióxido de carbono
CS	Controle saudável
Ct	Limiar do ciclo (do inglês <i>cycle threshold</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eHOMD	Banco de dados de microbioma oral humano expandido (do inglês <i>Human oral microbiome database</i>)
EO	Eritroplasia oral
H₂O	Água
LDA	Análise discriminante linear (do inglês <i>Linear discriminant analysis</i>)
LEfSe	Medidas de tamanho de efeito (do inglês <i>Linear discriminant analysis effect size</i>)
LLO	Lesão liquenóide oral
LO	Leucoplasia oral

LOPM	Lesões orais potencialmente malignas
LPO	Líquen plano oral
LPS	Lipopolissacarídeo
LVP	Leucoplasia verrucosa proliferativa
M	Molar
MCM2	Proteína de suporte microssomal 2
ml	Microlitro
min	Minutos
NA	Bactéria não identificada
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCNA	antígeno de proliferação celular nuclear
PCoA	Análise de coordenadas principais (do inglês <i>Principal Coordinates Analysis</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PICRUSt	Algoritmo de investigação filogenética de comunidades por reconstrução de estados não observados (do inglês <i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TrisHCl	Tris-Cloridrato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Lesões orais potencialmente malignas.....	1
1.1.1	Leucoplasia oral.....	4
1.1.2	Eritroplasia oral.....	6
1.1.3	Líquen plano oral e lesões liquenóides orais.....	7
1.2	Microbiota oral.....	10
1.2.1	Características gerais e abordagens de estudo.....	10
1.2.2	Microbiota oral e lesões orais potencialmente malignas.....	14
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3.	METODOLOGIA.....	19
3.1	Considerações éticas.....	19
3.2	População do estudo.....	19
3.3	Critérios de elegibilidade.....	19
3.3.1	Critérios de inclusão.....	19
3.3.2	Critérios de exclusão.....	20
3.4	Coleta de dados clínicos.....	20
3.5	Coleta e processamento do material biológico.....	21
3.6	Extração de ácidos nucleicos (DNA).....	22
3.7	Sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA bacteriano.....	22
3.7.1	Amplificação do gene alvo (16S rRNA) e sequenciamento.....	22
3.7.2	Processamento, filtragem e análises das amostras sequenciadas.....	23
3.8	PCR em tempo real: análise quantitativa do DNA bacteriano e humano.....	24
3.9	Análise estatística dos dados clínicos.....	25

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Dados clínicos.....	26
4.1.1	Caracterização geral da população estudada.....	26
4.1.2	Características relacionadas à saúde bucal dos participantes.....	29
4.2	Características relacionadas às lesões orais potencialmente malignas.....	30
4.3	Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	33
4.3.1	Processamento dos dados e análise de qualidade.....	33
4.3.2	Caracterização da microbiota bacteriana.....	38
4.3.3	Diversidade microbiana alfa e beta.....	39
4.3.4	Composição bacteriana entre casos e controles.....	43
4.4	Análise microbiana com relação ao diagnóstico clínico dos casos e ocorrência de malignização.....	57
4.4.1	Dados clínicos relacionados a ocorrência de malignização.....	57
4.4.2	Composição bacteriana e análise comparativa dos gêneros em relação a ocorrência de malignização.....	59
4.5	Composição bacteriana e análise comparativa dos gêneros em relação aos diferentes momentos de coletas.....	64
4.6	Análise da capacidade funcional entre casos e controles – Análise PICRUSt.....	68
5	CONCLUSÃO.....	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o grupo caso

Apêndice 2 Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o grupo controle

Apêndice 3 Instrumento de Coleta de Dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS

Lesões orais potencialmente malignas (LOPM) são um grupo de doenças/condições da mucosa que apresentam risco maior em comparação com a mucosa saudável de preceder o diagnóstico de carcinoma espinocelular oral (CEC) (Warnakulasuriya, Johnson & van der Waal 2007). O principal desafio permanece na identificação da pequena parcela de pacientes que serão mais propensos a desenvolver a malignidade, visto que os mecanismos envolvidos no processo de cancerização são particulares e ainda desconhecidos, variando de acordo com uma série de fatores, tais como aqueles relacionados ao paciente ou a lesão em si (Speight, Khurram & Kujan 2018; Warnakulasuriya et al. 2021).

Neste sentido, alguns estudos buscam identificar potenciais biomarcadores relacionados ao risco de transformação maligna e/ou métodos para prever o potencial maligno das lesões, com o intuito de viabilizar um diagnóstico precoce de CEC, e, conseqüentemente, melhorar sua taxa de sobrevivência, que tende a ser maior quando diagnosticado em estágios iniciais (Makarev et al. 2017; Sarode et al. 2019; Mello et al. 2020). Fatores genéticos, epigenéticos, microbianos, de estilo de vida (tabaco, betel, álcool), estão associados com a progressão das LOPM. Até o momento, estudos relacionados a p53, Ki-67, p21, antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA) e proteína de suporte microssomal 2 (MCM2) são alguns marcadores estudados em LOPM (Condurache Hritcu et al. 2021).

As LOPM ocorrem em aproximadamente 4,4% da população mundial, cuja frequência e distribuição podem variar entre as diferentes populações. Possuem uma variedade de características clínicas, incluindo variações de coloração (branco, vermelho e misto branco e vermelho), alterações na superfície das lesões (placa, lisa, ondulada, verrucosa, granular, atrófica), variação no tamanho e localização anatômica, em mucosa jugal, gengiva, língua e assoalho bucal, podendo ser sítio único ou múltiplos (Farah et al. 2014; Mello et al. 2018a; Speight, Khurram & Kujan 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as LOPM podem ser classificadas como: leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica, fibrose oral submucosa, líquen plano oral, lesão palatina de fumo reverso e as condições de lúpus eritematoso oral, disceratose congênita e epidermólise bolhosa oral (Warnakulasuriya, Johnson & van der Waal 2007). A nova classificação proposta pela OMS em 2021 inclui lesões líquenóide orais e doença do enxerto versus hospedeiro, e recomenda a remoção da

epidermólise bolhosa oral por apresentar evidências limitadas quanto à sua malignização (Warnakulasuriya et al. 2021).

O risco de malignização das LOPM é variável, e necessita de um estudo cuidadoso e individualizado uma vez que nem todas as lesões sofrerão transformação maligna. Tal transformação é dependente de vários fatores, associados ou não, que incluem presença de hábitos nocivos, como o tabagismo e etilismo, além da presença de displasia epitelial oral (Warnakulasuriya 2020). A displasia epitelial oral é um conjunto de alterações histopatológicas que pode ou não estar presente nas LOPM, classificada de acordo com os diferentes graus de atipias que ocorrem nos diferentes níveis epiteliais. Estas atipias podem ser restritas a uma parte do epitélio ou presentes em toda sua extensão, podendo promover o rompimento da membrana basal e levar ao surgimento do CEC invasivo (Warnakulasuriya et al. 2008; Woo 2019). A graduação histopatológica da displasia epitelial oral continua sendo o principal método de avaliação do risco de transformação maligna de LOPM (Warnakulasuriya, Johnson & van der Waal 2007). É importante ressaltarmos que mesmo lesões que apresentam displasia epitelial oral podem não se transformar em câncer e, caso se transformem, podem apresentar tempo de transformação maligna variável entre os indivíduos. A OMS (2005) definiu critérios arquiteturais e citológicos do epitélio como determinantes para o diagnóstico das displasias epiteliais orais. As mudanças que foram atualizadas na nova edição de 2017 (Speight, Khurram & Kujan 2018) são mostradas no quadro 1.

Quadro 1 – Critérios arquiteturais e citológicos para classificação da displasia epitelial oral.

CRITÉRIOS ARQUITETURAIS	CRITÉRIOS CITOLÓGICOS
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal do tamanho do núcleo
Perda da polaridade e hiperplasia da camada basal	Variação anormal da forma nuclear
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal do tamanho da célula
Aumento do número de mitoses típicas	Variação anormal da forma da célula
Mitoses anormalmente superficiais	Aumento da razão núcleo-citoplasma
Ceratinização prematura individual de células (disceratose)	Figuras mitóticas atípicas
Pérolas de ceratina nas projeções epiteliais da camada espinhosa	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Perda de coesão das células epiteliais	Hipercromasia nuclear

Fonte: adaptado de Speight, Khurram & Kujan 2018.

Segundo a OMS, a classificação das displasias depende do nível de comprometimento epitelial, do número de terços afetados e da presença de alterações arquitetônicas e citológicas (Warnakulasuriya et al. 2008; Woo 2019). Na mais recente classificação das displasias epiteliais orais pela OMS (2017), estas podem ser classificadas em leve, moderada e intensa, conforme o respectivo risco de transformação maligna (Quadro 2). Nesta nova classificação o carcinoma in situ é considerado juntamente com a displasia intensa (Ranganathan et al. 2020).

Quadro 2 – Critérios para classificação do grau de displasia epitelial oral, segundo OMS (2017).

GRAU	DESCRIÇÃO
Displasia leve	Distúrbios arquiteturais e com mínima atipia citológica limitados ao terço inferior do epitélio.
Displasia moderada	Distúrbios arquiteturais e citológicas estendendo-se até dois terços da espessura total do epitélio.
Displasia intensa	Distúrbios arquiteturais estendendo-se por mais de dois terços do epitélio acompanhado por atipia citológica. Distúrbios arquiteturais que se estendem até o terço médio do epitélio com intensa atipia citológica também é classificado como displasia epitelial intensa. O carcinoma in situ é a forma mais grave de displasia intensa com distúrbios arquiteturais e pronunciada atipia citológica em toda espessura do epitélio.

Fonte: adaptado de Reibel et al. 2017 e Speight, Khurram & Kujan 2018.

Embora seja largamente usado pela comunidade científica, estes critérios de diagnóstico podem sofrer variação intra e interobservador por serem dependentes dos patologistas na avaliação do grau de comprometimento epitelial e por estarem sujeitos à subjetividade na definição dos critérios arquiteturais e citológicos individuais (Geetha et al. 2015). Neste sentido, o sistema de classificação binário pode ser utilizado de forma alternativa ao sistema de classificação da OMS na orientação do tratamento das LOPM, classificando as alterações epiteliais em baixo e alto risco de malignização (Yan et al. 2020).

Lesões de baixo risco apresentam até quatro alterações arquiteturais e até cinco alterações citológicas enquanto as lesões de alto risco apresentam mais de quatro alterações arquiteturais e mais de cinco alterações citológicas (Kujan et al. 2006). As displasias leves, de acordo com a OMS, estão entre as displasias de baixo risco e as displasias moderadas e

intensas dentre as de alto risco, tornando a classificação mais objetiva e de melhor consenso entre os patologistas (Kujan et al. 2006; Warnakulasuriya et al. 2008; Ranganathan et al. 2020). Entretanto, ainda são necessários estudos longitudinais para verificar o valor preditivo de risco de transformação maligna das LOPM através deste sistema de classificação binário (Speight, Khurram & Kujan 2018; Woo 2019; Ranganathan et al. 2020).

Dentre as LOPM, a queilite actínica é associada ao efeito da exposição crônica e cumulativa da radiação ultravioleta, ocorrendo principalmente nas áreas expostas da face e vermelhão do lábio enquanto a fibrose oral submucosa e lesão palatina de fumo reverso são LOPM associadas ao betel e ao tabaco, e não são lesões comuns no Brasil (Warnakulasuriya et al. 2021). As LOPM diretamente relacionadas a condições sistêmicas de lúpus eritematoso oral, disceratose congênita e doença do enxerto versus hospedeiro possuem características que se enquadram nos critérios de exclusão deste estudo. Portanto, as LOPM classificadas como leucoplasia, eritroplasia, líquen plano oral e lesões líquenóides orais foram o foco deste trabalho e serão discutidas mais extensamente nas seções a seguir.

1.1.1 LEUCOPLASIA ORAL

A leucoplasia oral (LO) é uma LOPM definida como placas brancas, não removíveis à raspagem, que possuem características que não se enquadram clínica e histopatologicamente a qualquer outra enfermidade e apresenta risco de desenvolvimento de CEC questionável (Warnakulasuriya, Johnson & Van der Waal 2007; Abidullah et al. 2014). A etiologia das LO não está clara. São as LOPM mais frequentes na cavidade oral, com prevalência global variando de 2% a 4,1%, predileção pelo sexo masculino, geralmente observada entre quinta e sexta década de vida e possuem como localização mais comum a borda lateral de língua e o assoalho da boca, seguidos pela mucosa jugal, palato duro e mole e mucosa gengival/alveolar (Warnakulasuriya & Ariyawardana 2016; Mello et al. 2018a; Wetzel & Wollenberg 2020).

Clinicamente, podem englobar dois subtipos, homogênea e não-homogênea. As leucoplasias homogêneas apresentam-se como uma placa ou mancha branca uniformemente finas, são geralmente bem demarcadas e podem exibir rachaduras/fissuras superficiais (Van der Waal 2009; Warnakulasuriya 2020). Enquanto isso as leucoplasias não homogêneas possuem aparência clínica variada, sendo subdivididas em eritroleucoplasias/leucoplasias salpicadas com áreas brancas e vermelhas ou leucoplasias nodulares/verrucosas, com pequenas projeções polipoides ou superfície enrugada.

As leucoplasias não homogêneas apresentam maior risco de transformação maligna em relação as homogêneas (Warnakulasuriya & Ariyawardana 2016; Speight, Khurram & Kujan 2018) e existe discordância entre os estudos sobre o real risco de transformação maligna das LO, variando de 0,13% a 40,8% (Warnakulasuriya & Ariyawardana 2016; Aguirre-Urizar, Mendoza & Warnakulasuriya 2020). O sexo feminino, subtipo clínico não-homogêneo e presença de displasia epitelial oral são significativamente mais relacionados à transformação maligna (Aguirre-Urizar, Mendoza & Warnakulasuriya 2020).

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é um subconjunto de leucoplasia não homogênea, uma variante incomum da LO, que apresenta particularidades e comportamento biológico próprio. A LVP é caracterizada por lesões multifocais ou uma grande leucoplasia em locais contíguos. Possui etiologia desconhecida, são lentamente mais progressivas, podendo apresentar evolução ao longo dos anos, apresentando mínima associação ao tabaco e acometendo mais as mulheres (Warnakulasuriya et al. 2020). Hansen et al (1985) determinaram que lesões diagnosticadas como LVP poderiam ter inicialmente um aspecto homogêneo, sem displasia, seguido de aparência verrucosa e múltiplas lesões confluentes. Outros autores (Cerero-Lapiedra et al. 2010) propuseram a reformulação dos critérios dividindo-os em maiores e menores, conforme o quadro 3, e de acordo com essa classificação, o diagnóstico de LVP é confirmado quando apresenta três critérios maiores (sendo o critério histopatológico incluso) ou com dois critérios maiores e dois menores.

Quadro 3: Critérios de diagnóstico de LVP, recomendado por Cerero-Lapiedra et al (2010).

Critérios maiores	Critérios menores
Leucoplasia com mais de dois locais, geralmente na gengiva, palato e rebordo alveolar.	Lesão de leucoplasia oral que ocupa pelo menos 3 cm de área afetada
Apresentar áreas verrucosa	Acometer mulheres
progressão e disseminação da LPV	Não fumar, independentemente do sexo.
presença de recidiva em área previamente tratada.	Evolução da doença superior a 5 anos
No exame histopatológico pode variar de hiperqueratose epitelial oral ou hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucoso ou carcinoma escamoso.	

Fonte: adaptado de Villa et al (2018).

Além disso, as LVP apresentam maior tendência a recidivas e um alto potencial de transformação maligna que varia entre 40 e 100% em períodos de 4 a 11 anos após o aparecimento da lesão (Carrard, Brouns, Van der Waal 2013, Pentenero et al. 2014; Palaia et al. 2021). Um estudo recente sugere o uso do termo “leucoplasia proliferativa” para essas lesões, pois as mesmas podem não apresentar o padrão verrucoso, mas também áreas homogêneas/fissuradas e eritroplásicas (Villa et al. 2018).

As estratégias terapêuticas para LO dependem da avaliação dos fatores de risco e características clínico-patológicas para uma intervenção adequada. Entretanto é importante incluir a vigilância clínica, em intervalos determinados de acordo com o risco individual. Outras estratégias incluem ressecção cirúrgica convencional ou por laser de alta potência, quimioprevenção, crioterapia, terapia fotodinâmica (Lodi et al. 2016; Nadau & Kerr 2018).

Em casos extensos ou multifocais a terapia fotodinâmica tem sido utilizada, apresentando melhora clínica e redução do tamanho da lesão (Li et al. 2019). A quimioprevenção, através de agentes tópicos, inclui protocolos a base de carotenóides (betacaroteno e licopeno), vitaminas C (ácido ascórbico); E (α -tocoferol) e A (ácido retinóide), bleomicina e inibidores de ciclo-oxigenase sistêmicos (Ribeiro et al. 2010; Chau et al. 2017). No entanto, ensaios de quimioprevenção em LO apresentaram limitações e não forneceram evidência forte de sucesso. Além disso, todas terapias foram associadas à recorrência da doença (Lodi et al. 2016; Nadau & Kerr, 2018; Chau et al. 2017) e a LVP, mesmo com tratamento ablativo, apresentaram taxas de recorrências de até 85% (Mortazavi et al. 2019).

1.1.2 ERITROPLASIA ORAL

A eritroplasia oral (EO) é uma lesão em forma de placa ou mancha de coloração avermelhada que não pode ser diagnosticada como qualquer outra lesão definível e não pode ter causas traumáticas, vasculares ou inflamatórias (Warnakulasuriya, Johnson & van der Waal 2007). Essa lesão pode estar associada à leucoplasia, sendo denominada assim como eritroleucoplasia. Apesar de ser considerada a mais incomum LOPM, com uma prevalência entre 0,02% e 0,83% (Reichart & Phillipsen 2005), apresenta alta taxa de transformação maligna, variando de 1,3% a 34%, algumas vezes apresentando casos de carcinoma *in situ* quando se realiza a análise histológica da lesão (Yang et al. 2015; Speight, Khurram & Kujan 2018). As EO têm como diagnóstico diferencial lesões como a candidíase oral, líquen plano erosivo, lesões vasculares superficiais, lúpus eritematosos, pênfigo, penfigóide, melanoma

amelanótico, mucosite, reação a drogas ou irritação local, dentre outras (Villa, Villa & Abati 2011; Yardimci et al. 2014).

Esta lesão acomete preferencialmente indivíduos de meia-idade e idosos e embora possa afetar qualquer área da cavidade oral, o palato mole e assoalho são mais comumente afetados (van der Waal 2010). Sua etiopatogênese é incerta, porém o tabagismo e etilismo tem sido mencionado como fortes fatores de risco (Feng et al. 2012). As EO geralmente apresentam pequenas dimensões ao diagnóstico, embora estudos demonstrem altas taxas de mutação no gene *TP53* e características histopatológicas de CEC ou alto grau displasia epitelial (van der Waal 2010; Feng et al. 2012; Warnakulasurya et al. 2020).

Na maioria dos casos, as EO devem ser tratadas, não só devido ao alto risco de malignização, como também pelo quadro sintomatológico, como desconforto, formigamento e sensibilidade ao toque, a bebidas quentes ou alimentos condimentados (Warnakulasurya et al. 2020). O tratamento recomendado é a excisão cirúrgica tradicional ou a laser, combinando-as ou não. Os estudos que relatam as taxas de recorrência após o tratamento são poucos, mas estima-se que sejam altas, em torno de 5 para cada 7 casos (van der Waal 2010; Feng et al. 2012; Yang et al. 2015).

1.1.3 LÍQUEN PLANO ORAL E LESÕES LIQUENÓIDES ORAIS

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória muco-cutânea crônica mediada imunologicamente (Alrashdan, Cirillo, McCullough 2016). Possui etiologia controversa, entretanto, foi sugerido que distúrbios mediados por linfócitos T desregulados por gatilhos exógenos afetam as células epiteliais, influenciando a apoptose celular e levando à uma inflamação crônica (Gururaj et al. 2021). Segundo estudo de Gonzalez-Moles et al (2021) a prevalência global de LPO foi 1,01%, com aumento significativo e progressivo com a idade, especialmente acima da quarta década de vida.

A apresentação clínica do LPO é diversa, incluindo placa reticular, atrófica, papular, erosiva e bolhosa. A localização mais comum é a mucosa jugal, seguida de língua, gengiva, lábio inferior e palato (Gururaj et al. 2021). O LPO reticular é o mais comum, geralmente assintomático, com lesões simétricas, bilaterais e presença de estrias brancas conhecidas como “estrias de Wickham”. Seu padrão atrófico e erosivo demonstra sintomatologia dolorosa e ardor, com presença de erosão ou ulceração irregular e estrias periféricas irradiadas (Yardimci et al. 2014; Gururaj et al. 2021).

O diagnóstico de LPO deve ser realizado utilizando as características clínicas e histopatológicas, segundo OMS (2020) descritas em Warnakulasuriya et al. 2021, dos quais endossa propostas descritas já anteriormente (quadro 4).

Quadro 4: Critérios diagnósticos para líquen plano oral, segundo OMS (2020).

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA OMS PARA LÍQUEN PLANO ORAL	
CRITÉRIOS CLÍNICOS	
1.	Presença de lesões brancas bilaterais relativamente simétricas, afetando mucosa jugal, e/ou língua, e/ou lábio, e/ou gengiva.
2.	Presença de lesões papulares, uma rede, tipo renda, de linhas branco-acinzentadas levemente elevadas (padrão reticular) com ou sem erosões e ulcerações.
3.	Pode se apresentar como gengivite descamativa.
CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS	
1.	Presença de uma zona bem definida, tipo banda, de infiltração celular que é confinada a parte superficial do tecido conjuntivo, consistindo principalmente de linfócitos.
2.	Sinais de degeneração vacuolar da camada de células basais ou suprabasais com apoptose de queratinócitos.
3.	No tipo atrófico existe um afinamento epitelial, podendo apresentar ulceração devido a falha na regeneração epitelial. Poderá apresentar um infiltrado inflamatório misto.

Fonte: adaptado de Warnakulasuriya et al. 2021.

As lesões liquenóides orais (LLO) são semelhantes ao LPO nas características clínicas e histopatológicas, mas possuem a apresentação típica diferente. Estas lesões podem não ser simétricas e se apresentar unilateral (Van Der Meij & Van Der Waal 2003). Clinicamente podem ser classificadas como: i) lesões de contato liquenóide oral que possuem relação topográfica direta com um agente agressor, mais comumente materiais restaurados, como o amálgama; ii) reações medicamentosas liquenóides orais que surgem associada ao uso de medicações; iii) lesões liquenóides orais da doença do enxerto versus hospedeiro, em pacientes que apresentam a doença do enxerto versus hospedeiro aguda ou crônica (Al-Hashimi et al. 2007).

O potencial risco de transformação maligna do LPO é uma questão de debate contínuo, possivelmente por falhas no diagnóstico clínico, diferenciação das LLO e falha no acompanhamento minucioso dos casos (van der Meij et al. 2007). Um obstáculo importante nessa discussão sobre o possível potencial de transformação maligna do LPO é causado pela

falta de critérios diagnósticos clínicos e histopatológicos claros, o que resulta em uma precária correlação clínico-patológica no momento do diagnóstico (Fitzpatrick et al. 2014; van der Waal, 2014; Yardimci et al. 2014).

Recentemente, Ramos-Garcia, Gonzalez-Moles & Warnakulasuriya (2021) em estudo incluindo sete revisões sistemáticas publicadas anteriormente, relataram que a taxa de transformação maligna no LPO variou de 0,44-2,28% e LLO de 1,88-3,8%. O maior risco de desenvolvimento de CEC para pacientes com LPO são lesões atróficas e erosivas na língua, uso de tabaco, álcool e infecção pelo vírus da hepatite C (Gonzalez-Moles et al. 2019; Giuliani et al. 2019; Ramos-Garcia, Gonzalez-Moles & Warnakulasuriya 2021). Em outro estudo, onde foram avaliados pacientes com LPO e LLO, os autores observaram uma taxa de transformação maligna de 1,09% para LPO e de 3,2% para LLO, atingindo principalmente a língua e com um tempo médio estabelecido entre o diagnóstico e a transformação maligna de 51,4 meses (Fitzpatrick et al. 2014).

Outra revisão sistemática, usando os critérios diagnósticos da OMS (2003), relatou uma taxa de transformação maligna de 0,9% para LPO e uma taxa de transformação maior de 2,5% para LLO (Aghabari et al. 2017). Em contraparte, estudo realizado por Mares et al. (2013) acompanhou por um tempo médio de 164 meses, 32 pacientes distribuídos em dois grupos, um de pacientes com LPO (8/32) e outro com LLO (24/32) e observaram que apenas dois pacientes com lesão liquenóide estabeleceram evolução maligna, com tempo de 45 e 113 meses após o diagnóstico inicial. Tais resultados assemelham-se aos obtidos em estudo similar, porém com seguimento médio de 53,8 meses, realizado por Van der Meij et al. (2007). Neste trabalho, embora todos os casos de evolução maligna foram de pacientes que inicialmente tinham LLO, os autores não possuíam dados substancialmente relevantes para suportar a hipótese de que pacientes portadores de LLO tinham um maior risco de transformação maligna quando comparados aos portadores de LPO.

Os portadores de LPO requerem um monitoramento a longo prazo, com realização de biópsia para obtenção do diagnóstico. O LPO reticular segue sem necessidade de tratamento, devido seu caráter totalmente assintomático. No entanto, nas formas sintomáticas do LPO erosivo e atrófico e das LLO devem ser tratados com corticoterapia tópica e sistêmica, caso necessário. Outras formas de tratamento dependem do uso de retinóides, ácido hialurônico a 0,2% em gel, tracolimus, além de excisão cirúrgica, crioterapia e laser CO₂ (Yardimci et al. 2014; Barbosa et al. 2015; Carrozo et al. 2019).

Embora a estratificação de risco de pacientes com LOPM possa ser fundamental para a seleção de um tratamento proporcional ao grau de risco de progressão e transformação maligna, os fatores utilizados para sua estratificação ainda são imperfeitos. Desta maneira, espera-se que abordagens relacionadas à medicina personalizada, como metagenômica, proteômica e metabolômica, possam ajudar na identificação de biomarcadores preditivos de progressão maligna e na possibilidade de uma intervenção personalizada e mais eficiente (Nadau & Kerr 2018).

1.2 MICROBIOTA ORAL

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E ABORDAGENS DE ESTUDO

A microbiota oral é caracterizada pelo conjunto de microrganismos incluindo vírus, arqueobactérias, bactérias, protozoários e fungos encontrados na cavidade oral, a qual também contém diferentes nichos ecológicos, como os dentes, sulco gengival, língua e mucosas. O microbioma oral, por sua vez, é definido como o conjunto do material genético de todos os microrganismos presentes na cavidade oral, sejam eles achados esporádicos, simbióticos, comensais ou patogênicos (Gao et al. 2018).

A microbiota oral é a segunda mais abundante do corpo humano depois do trato gastrointestinal e está constantemente exposta ao ambiente externo, sendo deste modo uma microbiota complexa e dinâmica, cuja composição pode ser influenciada por fatores externos e ligados ao hospedeiro, como estilo de vida, idade, condições sistêmicas, dentre outros (Killian et al. 2016; Gao et al. 2018; Lee et al. 2021). Embora flutuações na composição da microbiota sejam comuns na homeostasia decorrente da relação simbiótica da microbiota *versus* o hospedeiro, alterações na sua composição podem levar a um quadro chamado disbiose. Tal condição pode ser decorrente da i) diminuição da presença de microrganismos benéficos; ii) expansão de microrganismos potencialmente patogênicos e/ou iii) diminuição da diversidade microbiana de uma maneira geral (Peterson & Round 2014), o que pode levar a um perfil funcional potencialmente diferente no microbioma e, conseqüentemente, causar ou exacerbar alguma alteração patológica. A disbiose oral está associada a cáries dentárias, doenças periodontais, doenças da mucosa oral e até mesmo doenças sistêmicas (Peterson & Round 2014; Thomas et al. 2014; Gao et al. 2018; Varoni et al. 2019; Lee et al. 2021).

O estudo da microbiota humana através de métodos tradicionais dependentes do cultivo apresenta diversas limitações, tais como a baixa especificidade e sensibilidade,

principalmente devido à dificuldade na identificação de bactérias não cultiváveis ou fastidiosas. Nesse sentido, a metagenômica, estudo do microbioma através do sequenciamento de ácidos nucleicos e independente de cultivo, permite melhor caracterização e entendimento da diversidade microbiana oral e da sua associação com a saúde e a doença. A composição da microbiota humana por meio do sequenciamento pode ser determinada através de sequenciamento direcionado (ou alvo) ou sequenciamento amplo tipo *shotgun* (Schmidt et al. 2014; Grassl et al. 2016; Varoni et al. 2019).

O sequenciamento direcionado trata-se do sequenciamento de um gene-alvo específico, como o gene 16S rRNA, utilizado para identificação de procariotos, uma vez que este é altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias e arqueias. Este gene possui nove regiões hipervariáveis (V1-V9) que podem ser amplificadas e sequenciadas utilizando conjuntos específicos de iniciadores para identificação de diferentes gêneros bacterianos. As regiões V3-V4 fornecem identificação confiável de algumas espécies, embora por vezes seja uma limitação não permitir diferenciação entre certos táxons bacterianos (Varoni et al. 2019).

O sequenciamento *shotgun*, por sua vez, é baseado no sequenciamento de todo o DNA e/ou RNA de uma amostra, permitindo a identificação não só de bactérias, mas também dos demais organismos presentes em determinado nicho e componentes da microbiota. Além disso, por permitir o sequenciamento de todo o repertório gênico e não ser limitado a um marcador específico, como o 16S rRNA, o sequenciamento *shotgun* permite a identificação dos organismos a nível de espécie ou cepas, fornecendo ainda possibilidade de caracterização do perfil funcional e metabólico do microbioma. Essa abordagem possibilita representar os organismos pouco conhecidos ou para os quais não há complementaridade genômica suficiente com os iniciadores usados na abordagem 16S. Outra vantagem é a capacidade de inferir a função biológica das proteínas presentes, determinando assim, em vários casos, os elementos ativos em um dado fenótipo de interesse, incluindo genes virais, bacterianos, fúngicos e outros, de modo a melhor definir a interação dos organismos com seu hospedeiro. No entanto, esta abordagem é mais custosa e pode não ser tão eficiente para classificação taxonômica dos microrganismos quando há uma grande quantidade de DNA do hospedeiro, como é o caso de amostras teciduais humanas em contraste com amostras fecais, por exemplo (Sharpton 2014; Bikel et al. 2015, Albuquerque et al. 2022). Do mesmo modo, os dados de

sequenciamento *shotgun* demandam análises de bioinformática mais extensas e demoradas, se comparadas aos *pipelines* de 16S.

Ao longo dos anos diversos estudos procuraram classificar a composição microbiana da cavidade oral. De acordo com o banco de dados de microbioma oral humano expandido (eHOMD – *Human oral microbiome database*), atualizado pela última vez em 09 de fevereiro de 2020 (Homepage, 2022), pelo menos 774 espécies bacterianas orais foram catalogadas, das quais 58% têm sua classificação taxonômica definida e 42% permanecem sem classificação, sendo que 26% destes microrganismos ainda não puderam ser cultivados em laboratório.

As bactérias são os taxa mais abundantes da cavidade oral e sua diversidade em indivíduos saudáveis, determinada pelo perfil de 16S rRNA, apresenta como filos mais representativos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes e Spirochaetes (Verma et al. 2018). Estudos mostram que os cinco principais gêneros encontrados são *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria* e *Haemophilus* (Bikel et al. 2015; Gao et al. 2018; Lee et al. 2021). Em estudo de análise do microbioma em indivíduos saudáveis, a maioria dominada por *Streptococcus*, seguida em abundância por *Haemophilus* na mucosa jugal, *Actinomyces* na placa supragengival e *Prevotella* na placa subgengival (Ahn et al. 2011).

Alterações no microbioma oral também podem ser desencadeadas por mudanças e intensificação de hábitos, que incluem o tabagismo e etilismo. Estudo utilizando o marcador genético 16S rRNA, observou uma significativa redução na riqueza bacteriana no grupo formado por tabagistas isolados, bem como no grupo formado por indivíduos que associavam o tabagismo ao etilismo, quando comparados a indivíduos do grupo controle que não utilizam nenhuma destas substâncias. Dentre os gêneros identificados, observou-se redução do gênero *Neisseria* em ambos os grupos de estudo, porém apenas o grupo dos tabagistas isolados mostrou aumento significativo dos gêneros *Prevotella* e *Capnocytophaga* e redução dos gêneros *Granulicatella*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* e *Gemella*. O grupo controle apresentou maior abundância para o gênero *Aggregibacter*. Estes resultados demonstraram que estes hábitos, já reconhecidamente carcinogênicos, desempenham um importante papel nas alterações de comunidades bacterianas da cavidade oral (Thomas et al. 2014).

Estudo realizado por Lazarevic et al. (2010), avaliou a composição da microbiota salivar inter e intra individual e observou que os filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria,

Bacteroidetes e uma candidata a divisão TM7 dominaram as amostras estudadas. *Fusobacteria* e *espiroquetas* apresentaram as menores frequências médias, possivelmente por estarem em limites abaixo dos detectados no estudo. Por meio de estudos moleculares identificou-se um total de 81 gêneros bacterianos, dentre eles destacaram-se *Streptococcus*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Campylobacter* e *Selenomonas* nas amostras analisadas.

Os microrganismos desempenham um importante papel na carcinogênese, sejam eles agentes etiológicos principais, coadjuvantes ou simplesmente por fazerem parte da composição microbiana local. Agentes infecciosos também são diretamente relacionados ao aparecimento de malignidades seja pela capacidade de induzir inflamações crônicas, ocasionando ou afetando a proliferação celular, que combinados com fatores de risco, podem levar à oncogênese ou inibindo a apoptose celular (Schwabe & Jobin 2013; Karpiński 2019).

Dentre eles, destacam-se a bactéria *Helicobacter pylori* e o vírus da hepatite tipo C na patogênese do câncer de estômago e de fígado, respectivamente. Além destas, estudos apontam possível associação entre *Salmonella typhi* e câncer de vesícula; *Chlamydomphila pneumoniae* e o câncer de pulmão, *Propionibacterium acnes* e o câncer de próstata e *Escherichia coli* em processos inflamatórios no intestino que levam ao aumento do risco de câncer de cólon (Pushalkar et al. 2012).

A microbiota oral, mesmo em indivíduos saudáveis, pode contribuir diretamente para a carcinogênese devido ao metabolismo e produção de substâncias tóxicas por comunidades bacterianas. Recentemente foram avaliadas bactérias que compõem a microbiota oral em indivíduos saudáveis utilizando o gene codificador do 16S rRNA como marcador, e verificou-se que parte destes microrganismos, especialmente as do gênero *Neisseria*, e espécies como *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus mitis* e *Prevotella histicola* eram capazes de produzir a partir do etanol e da glucose, doses significativas de acetaldeído, substância de propriedades carcinogênicas reconhecidas (Moritani et al. 2015).

Espécies bacterianas presentes na cavidade oral, como as *fusobacterias*, podem migrar para ambientes extra orais, como o intestino, causando inflamação. A presença de microrganismos orais e intestinais na microbiota fecal em pacientes com câncer colorretal e saudáveis foi avaliada e observou-se diferenças estatisticamente significantes na abundância de *Fusobacterium nucleatum*, comum no biofilme subgengival e doença periodontal, e

Clostridioides difficile entre os grupos estudados, caracterizando assim um possível envolvimento destes microrganismos no câncer de cólon (Fukugaiti et al. 2015).

1.2.2 MICROBIOTA ORAL E LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS

A análise das comunidades microbianas em LOPM abre caminho para entendermos a relação entre a disbiose bacteriana e sua possível implicação no desenvolvimento do câncer de boca. Estudos comparando microbioma entre amostras de LOPM, CEC e controles saudáveis foi encontrado uma redução do filo Firmicutes e níveis altos de Bacteroidetes em amostras de LOPM e CEC (Schmidt et al. 2014; Hu et al. 2016; Mok et al. 2017; Hashimoto et al. 2019). Com relação aos gêneros, a diminuição de *Streptococcus* e aumento de *Fusobacterium* nos pacientes com LOPM podem resultar num ambiente pro-inflamatório (Schmidt et al. 2014).

Um estudo comparando amostras de saliva de pacientes com CEC, leucoplasia e controles saudáveis, observou que os gêneros *Granulicatella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* e *Fusobacterium* apresentavam abundância de mais de 1% em todos os grupos. O gênero *Haemophilus* foi mais abundante no grupo de leucoplasia, já os gêneros *Streptococcus* e *Abiotrophia* foram mais abundantes nos controles saudáveis. O gênero *Bacillus* foi mais abundante do grupo de CEC, seguido por uma proporção maior no grupo de leucoplasias em relação aos controles. Os autores sugerem que os microrganismos e seus produtos são supostamente tóxicos para as células hospedeiras e podem induzir mutações e alterações nas vias de sinalização das mesmas (Hu et al. 2016).

Outro estudo comparou a microbiota da mucosa de indivíduos com leucoplasias orais, coletada por *swab*, com aquela da mucosa saudável contralateral dos mesmos pacientes, além de indivíduos controle saudáveis. Foi observado um aumento da abundância de *Rothia mucilaginosa*, *Alloprevotella spp*, *Neisseria meningitidis* e *Leptotrichia spp*. e menor abundância de *Neisseria oralis*, *Streptococcus infantis* e *Lautropia mirabilis* em pacientes com leucoplasia em comparação com os indivíduos saudáveis. Já os gêneros *Fusobacterium*, *Leptotrichia* e *Campylobacter* foram significativamente mais abundantes na mucosa com leucoplasia em comparação com a mucosa contralateral (Amer et al. 2017).

No estudo Decsi et al (2018), observou que nas amostras de LOPM havia uma maior abundância relativa das espécies *Streptococcus oralis* e *Fusobacterium nucleatum* e uma diminuição da abundância de *Gemella haemolysans* e *Streptococcus mitis* em comparação ao

tecido saudável. Em Mok et al (2017), a abundância relativa de *Streptococcus* e *Veillonella* foi maior nos controles enquanto a abundância relativa de *Neisseria*, *Gemella* e *Granulicatella* foi maior nos grupos de LOPM. O gênero *Gemella* apresentou abundância relativa discrepante entre os estudos, isso pode ser explicado devido a metodologias diferentes, Decsi et al (2018) utilizaram amostras de tecido, com sequenciamento shotgun, já Mok et al (2017) utilizaram amostras de *swabs*, sequenciando as regiões V6-V9 do 16S RNA.

Outro estudo analisou a microbiota de biópsias obtidas de pacientes com LVP comparando com indivíduos saudáveis, observando composição e diversidade microbiana oral significativamente diferentes entre os grupos. Os potenciais patógenos identificados nos pacientes com LVP foram *Oribacterium* sp. *táxon oral 108*, *Campylobacter jejuni*, *Eubacterium* sp., *Tannerella* e *Porphyromonas* (Herreros-Pomares et al. 2021).

Estudos comparando o microbioma de LPO e controles saudáveis relatam que a diversidade microbiana é maior nas amostras de LPO (He et al. 2017; Du et al. 2020) ou que não é significativamente diferente entre os grupos (Choi et al. 2016; Wang et al. 2016; Yu et al. 2020). Os filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, bacteroidetes e Fusobacteria foram encontrados no LPO e nos controles. De maneira geral, os estudos relatam menor abundância do gênero *Streptococcus* nas amostras de LPO (Choi et al. 2016, Wang et al. 2016, He et al. 2017, Du et al. 2020; Yu et al. 2020). Com relação aos gêneros mais abundantes nas amostras de LPO observamos uma variação entre os estudos, sendo os gêneros mais relatados *Leptotrichia* (Choi et al. 2016; Wang et al. 2016; He et al. 2017), *Lautropia* (He et al 2017; Yu et al. 2020) e *Fusobacterium* (He et al. 2017; Du et al. 2020), *Acinetobacter* (Choi et al. 2016), *Oribacterim* (Yu et al. 2020), *Granulicatella* e *Oceanobacillus* (Du et al. 2020).

Choi et al (2016) descrevem também a diminuição da abundância de *Escherichia* nas amostras de LPO. Wang et al (2016) comparam amostras de LPO erosivo, LPO reticular e controles saudáveis, no qual observaram aumento de *Porphyromonas* em LPO erosivo e aumento de *Solobacterium* em LPO reticular. No estudo de He et al (2017) *Achromobacter*, *Mobiluncus*, *Moraxella*, *Hymenobacter* foram detectados apenas no grupo de líquen plano oral e nenhum gênero foi detectado apenas nos controles saudáveis. Já Yu et al (2020), relatam aumento da abundância de *Lautropia* e *Gemella* em LPO erosivo e aumento da abundância de *Haemophilus* e *Neisseria* em LPO não erosivo. Neste estudo ainda relataram diminuição da abundância dos gêneros *Abiotrophia*, *Eikesella*, *Aggregatibacter*, *Bacteroides*, *Neisseria* e *Ezakiella* nas amostras de LPO quando comparada com os controles saudáveis.

Para melhor visualização dos estudos encontrados a respeito dos microbiomas nas LOPM, na tabela 1 apresenta as características dos estudos (número de participantes e diagnósticos, tipo da amostra, região sequenciada, gêneros ou espécies bacterianas encontradas e autor/ano) encontrados na literatura.

Outros estudos identificam uma disbiose microbiana associada ao câncer bucal, entretanto estes não revelaram a presença/abundância de qualquer bactéria individual ou conjunto que seja consistentemente enriquecido em amostras de CEC em relação aos controles saudáveis. (Robledo-Sierra et al. 2019; Su Mun et al. 2021). Entretanto, vale destacar que a abundância de *Fusobacterium* e a diminuição de *Streptococcus* foi relatada em amostras de pacientes com CEC (Su Mun et al. 2021).

Diante das diferenças metodológicas entre os estudos, critérios de elegibilidade, tipos de amostras, regiões sequenciadas e métodos de sequenciamento utilizado, há uma dificuldade na identificação de alterações microbianas consistentes entre os estudos e que possam ter valor preditivo e de surgimento da lesão neoplásica propriamente dita.

Novos estudos prospectivos são importantes para determinar o real impacto da microbiota oral nas LOPM, levando em consideração alguns fatores determinantes, como o uso tabaco e álcool, hábitos culturais e de higiene, a dieta e a etnia. O uso de tabaco e álcool já fator conhecido por estar associado às LOPM e que pode impactar a microbiota (Warnakulasuriya, 2020; Thomas et al. 2014). A dieta que pode atuar de maneira importante no processo da carcinogênese, promovendo desequilíbrios na microbiota e ocasionando à disbiose, exemplificado pela dieta ocidental, caracterizada por baixa ingestão de fibras e elevada quantidade de açúcares e gorduras estão mais associados com a disbiose (Weyrich 2021). Além disso, levar em consideração a miscigenação, uma característica na população brasileira que também pode ser determinante na microbiota oral (Altayb et al. 2022), que em geral também se relaciona a hábitos culturais, de dieta e hábitos de higiene bucal.

Dentre os diferentes tipos de amostra estudadas como saliva, que embora potencialmente represente de maneira geral todos os nichos da cavidade oral, pode não representar as alterações microbianas presentes especificamente nas áreas lesionais. A microbiota associada ao epitélio da mucosa oral lesional pode ser analisado através de *swab* ou biópsia do tecido, sendo o *swab* a técnica mais simples e confortável para o paciente (Varoni et al. 2019). Também não existem, até o momento, estudos que acompanharam o

microbioma das LOPM até a progressão em CEC e como este pode se modificar neste processo.

Tabela 01: Características gerais e principais achados dos estudos de microbiota em LOPM disponíveis na literatura.

N participantes / diagnóstico	Tipo de amostra	Região do 16S rRNA ou tipo de sequenciamento	Gêneros ou espécies bacterianas encontrados	Autor/Ano
8 LO/EO; 16 CEC; 6 CS	swab	V4	<i>Streptococcus</i> e <i>Rothia</i> reduzidas e aumento de <i>Fusobacterium</i> em CEC; <i>Streptococcus</i> reduzido e <i>Fusobacterium</i> aumentados em LOPM	Schimdt et al 2014
13 LPO; 11 CS	swab	V1-V3	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i> reduzidos em LPO; <i>Leptotrichia</i> e <i>Anicetobacter</i> aumentadas em LPO	Choi et al 2016
10 LO; 19 CS	saliva	Não específica	<i>Haemophilus</i> elevados em LO; <i>Streptococcus</i> e <i>Abiotrophia</i> elevados nos controles; <i>Bacillus</i> foi maior em CEC>LO>controles.	Hu et al 2016
37 LPO 18 CS	saliva	V4	<i>Streptococcus</i> reduzido e <i>Leptotrichia</i> aumentada em LPO; <i>Porphyromonas</i> aumentada em LPO do tipo erosivo e <i>Solobacterium</i> aumentada em LPO do tipo reticular	Wang et al 2016
36 LO 32 CS	swab	V1-V2	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> e <i>Campylobacter</i> elevados em leucoplasia comparados com a mucosa contralateral; <i>Rothia mucilaginosa</i> , <i>Alloprevotella spp</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Leptotrichia spp.</i> elevados e <i>Neisseria oralis</i> , <i>Streptococcus infantis</i> e <i>Lautropia mirabilis</i> reduzidos em LO comparados aos controles.	Amer et al 2017
43 LPO 21 CS	swab	V3	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> e <i>Lautropia</i> elevados em LPO <i>Streptococcus</i> diminuídos em LPO	He et al 2017
9 LOPM 9 CEC; 9 CS	swab	V6-V9	<i>Neisseria</i> , <i>Gemella</i> e <i>Granulicatella</i> foram mais abundantes no grupo Caso. <i>Streptococcus</i> foi maior no grupo controle (Controle>LPOM>CEC)	Mok et al 2017
23 LPO	Enxague bucal e cytobrush	V1-V3	<i>Streptococcus Actinomyces</i> , <i>Rothia</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Neisseria</i> elevadas em LPO	Kragelund 2018
2 LVP 5 LPO	Tecido	Shotgun	<i>Streptococcus oralis</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> elevados e <i>Gemella haemolysans</i> e <i>Streptococcus mitis</i> reduzidos nas LOPM em comparação ao tecido saudável.	Decsi et al 2018
6 LO; 6 CEC; 4 CS	saliva	V4	<i>Streptococcus</i> diminuído em LO e CEC; <i>Porphyromonas gingivalis</i> encontrada em LO e CEC; <i>Solobacterium</i> foi mais elevado em CEC comparado a LO	Hashimoto 2019
20 LPO; 10 CS	swab	V3-V4	<i>Fusobacterium</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Oceanobacillus</i> elevados em LPO e <i>Streptococcus</i> , <i>Neisseria</i> e <i>Burkholderiales</i> diminuídos em LPO	Du et al 2020
10 LPOE; 10 LPONE; 10 UAR; 10 CS	saliva	V4	<i>Lautropia</i> e <i>Gemella</i> elevadas em LPOE; <i>Haemophilus</i> e <i>Neisseria</i> em LPONE; <i>Abiotrophia</i> , <i>Eikesella</i> , <i>Aggregatibacter</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Neisseria</i> e <i>Ezakiella</i> diminuídas em LPO comparada a CS.	Yu et al 2020
10 LVP; 5 CS	Tecido	V3-V4	<i>Oribacterium sp. o táxon oral 108</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Tannerella</i> e <i>Porphyromonas enriquecidos</i> em LVP	Herreros-Pomares 2021

Legenda: (LO): Leucoplasia oral; (EO): eritroplasia oral; (CEC): Carcinoma espinocelular; (CS): controle saudável; (LPO): líquen plano oral; (LPOE): líquen plano oral erosivo; (LVP): leucoplasia verrucosa proliferativa; (UAR): ulceração aftosa recorrente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as populações bacterianas que compõem o microbioma oral de pacientes com lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar quantitativamente (relação DNA humano/bacteriano) por real time PCR.
- Caracterizar, quantificar e comparar as populações microbianas presentes na mucosa oral saudável e em lesões orais potencialmente malignas utilizando a abordagem de sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano.
- Comparar as populações microbianas em diferentes momentos do estudo (ao diagnóstico e após um ano do diagnóstico).

3. METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC) sob número 2358/17 (Anexo 1). Após a aprovação pelo CEP institucional, foi iniciado o recrutamento de pacientes para o estudo. Para todos os pacientes potencialmente elegíveis foi apresentado o estudo e estes foram convidados a participarem de forma voluntária. A coleta de dados e amostras biológicas foi realizada somente após a leitura, entendimento, aceite da participação do estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi do tipo caso controle de caráter longitudinal, prospectivo e quantitativo, junto a pacientes portadores de lesões orais com potencial de malignização. O universo do estudo corresponde aos pacientes atendidos no Departamento de Estomatologia do ACCCC, São Paulo/SP, no período entre os anos de 2018 a 2020. Devido ao caráter inovador do estudo, que avaliou um universo bacteriano ainda desconhecido em termos de composição e frequência e também por não haver embasamento da literatura que permitisse realizar um cálculo de um tamanho amostral ideal, o tipo de amostragem empregada foi não probabilístico, com amostra por conveniência.

Desta forma, foi considerada uma casuística de 60 participantes, respaldada pelo Departamento de Estomatologia do ACCCC, por ser factível e baseada no número de pacientes com LOPM atendidos e tratados na instituição por ano e considerando os critérios de inclusão deste estudo. O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis, acompanhantes dos pacientes atendidos no Departamento de Estomatologia do ACCCC seguindo o pareamento por idade (\pm 5 anos), sexo, e hábitos nocivos (tabagismo e etilismo).

3.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes diagnosticados com leucoplasia, eritroplasia, líquen plano oral e lesão líquenóide oral que aceitaram participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

- Indivíduos com mucosa oral saudável, pareados com os pacientes do grupo caso que aceitaram participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2).

3.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Todos os indivíduos que tenham feito uso de antibióticos a menos de 45 dias da coleta do material biológico.
- Todos os indivíduos que fizeram uso de antisséptico bucal em intervalo inferior a duas horas antes da coleta.
- Todos os indivíduos com histórico de radioterapia em região de cabeça e pescoço e quimioterapia.
- Todos os pacientes portadores de diabetes, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso, disceratose congênita ou comorbidades relacionadas ao sistema imunológico.
- Indivíduos com doenças psiquiátricas ou incapazes de compreender o estudo, ou que se recusaram a participar do estudo e não assinaram o TCLE.

3.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

O instrumento de coleta de dados (Apêndice 3) foi adaptado a partir de instrumento de coleta de dados previamente validado em estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (Estudo de perfis microbianos em tumores humanos: implicações para tumorigênese, prognóstico e resposta ao tratamento. SIPAR 25000.055.167/2015-23 - projeto este que financiou o estudo da microbiota aqui apresentado), e incluiu variáveis que contemplam dados sócio demográficos, hábitos diários e nocivos, clínico-patológicos lesionais e relacionados ao microbioma estudado e suas possíveis variações.

A coleta de dados teve início em maio de 2018, no qual foi realizada a abordagem aos pacientes portadores de LOPM atendidos no Departamento de Estomatologia do ACCCC, com explicação do estudo e convite a participar da pesquisa. Aqueles que concordaram, de forma voluntária, foram convidados a assinar o Termo de consentimento Livre e Esclarecido TCLE (Apêndice 1), após devida leitura e entendimento do mesmo. Em todos os momentos deixamos clara a opção do paciente em não participar dos procedimentos relacionados a este estudo. Sequencialmente foi realizado o preenchimento do instrumento de coleta de dados,

foi preconizado o sigilo das informações e anonimato dos sujeitos envolvidos. Posteriormente foi realizado exame clínico minucioso visando o diagnóstico clínico das LOPM, além do registro fotográfico das áreas lesionais objetivando o controle dos casos frente as áreas a serem observadas em momentos posteriores.

O grupo controle foi constituído por acompanhantes de pacientes atendidos no Departamento de Estomatologia do ACCCC que pareassem por sexo, idade e hábitos nocivos (tabagismo e etilismo). Os indivíduos que concordaram, de forma voluntária, foram convidados a assinar o TCLE (Apêndice 2), após também a devida leitura e entendimento do mesmo. Também foi aplicado o instrumento de coleta de dados e foi realizado um exame clínico da cavidade oral para confirmação de que os mesmos não apresentavam lesão em boca.

3.5 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Após a confirmação clínica das lesões foi realizada a coleta de material biológico da mucosa oral com auxílio de *swab* cotonetizado (COPAN – FLOQSwabs™/USA) estéreis sem meio de cultura. Foram realizados movimentos circulares (2 voltas) de forma individual sobre a área lesional, único *swab* por paciente, em todos os sítios lesionais. Após a coleta, os *swabs* foram inseridos em seus respectivos tubos e adicionados 2ml de solução estabilizadora (0,1M de NaCl, 0,1M de TrisHCl, 0,01M de EDTA, 0,1mg/ml de proteinase K e 0,5% de SDS), todos os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e armazenados em freezer (-20°C) para posterior realização de estudo metagenômico por meio de extração, amplificação e sequenciamento do DNA bacteriano.

Após a coleta do *swab*, foi realizada a biópsia da lesão, conduzida pelo estomatologista titular do departamento e seguindo os protocolos de realização de biópsia do Departamento de Estomatologia do ACCCC para diagnóstico anatomopatológico da lesão realizado pelo Departamento de Patologia do ACCCC. Os pacientes que apresentaram diagnóstico anatomopatológico de CEC foram excluídos do estudo. O paciente manteve o acompanhamento e tratamento das LOPM preconizado de acordo com o Departamento de Estomatologia do ACCCC e após um ano da coleta inicial o paciente foi submetido a uma nova coleta de *swab*, sendo a realização de uma nova biópsia a critério da conduta clínica dos titulares do Departamento de Estomatologia do ACCCC. Os indivíduos do grupo controle não foram submetidos a biópsia e segunda coleta de *swab*.

3.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (DNA)

A extração de DNA das amostras foi realizada com o kit *EZNA Universal Pathogen Kit* (Omega Biotek, EUA) utilizado na rotina de outros projetos do nosso grupo. Uma vez que este kit não apresenta protocolo específico para *swab*, foi utilizado o protocolo de extração de DNA para soro e fezes, com algumas modificações padronizadas para melhoria da lise celular e maior homogeneização da amostra, sendo elas: aumento do tempo de vórtex (lise física das células) de 5 min para 10 min, aumento na quantidade de *proteinase K* (de 20µl para 40 µl) e aumento do tempo de incubação de 15 min para 3 horas, conforme condições previamente testadas. Após a extração de DNA todas as amostras foram quantificadas pelo *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Thermo Fisher Scientific, EUA), para identificar a quantidade de massa de DNA por microlitro. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até amplificação e sequenciamento.

3.7 SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS DO GENE 16S rRNA BACTERIANO

3.7.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE ALVO (16S rRNA) E SEQUENCIAMENTO

Para avaliar a composição bacteriana, foi utilizada a abordagem de sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano. Os iniciadores utilizados para amplificação do gene alvo foram U341F: 5'- **CCTACGGGRSGCAGCAG**-3' e 806R: 5'- **GGACTACHVGGGTWTCTAAT** 3', que geram *amplicons* de tamanho médio de 500 pares de bases. A enzima *KAPA2G Robust HotStart ReadyMix* (KAPA Biosystems, EUA) foi utilizada para amplificação, conforme condições apresentadas nos quadros 5 e 6. A massa de DNA usada como molde nas reações de amplificação foi de 5ng (podendo variar entre 10 ng e 2ng – dependendo da presença e quantidade de inibidores em cada amostra), conforme quantificação prévia pelo *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Como controle positivo da reação utilizamos DNA de *Escherichia coli* e como controle negativo apenas água ultrapura (Sigma, EUA). Avaliamos 3 µl dos produtos de amplificação por eletroforese em géis de agarose 1% corados com *SybrSafe* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, os *amplicons* das amostras dos 60 pacientes foram purificados com *beads* magnéticas *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, EUA), quantificados no *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e então foi realizada a construção das bibliotecas e sequenciamento.

Quadro 5 - Condições de amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.

Reação	Volume (µl)
Primer U341F (2,5 µM)	1,5
Primer U806R (2,5 µM)	1,5
<i>Kapa 2G Robust Mix Hotstart</i>	7,5
Amostra + H ₂ O	4,5
Volume final	15

Quadro 6 - Condições de termociclagem para amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 min	1x
Desnaturação	95°C	20 s	32x
Anelamento	55°C	15 s	
Extensão final	72°C	5 min	1x

Para a construção de cada biblioteca, utilizamos o *Ion Plus Fragment Library Kit* (Thermo Fisher, EUA) buscando utilizar pelo menos 50ng de cada *amplicon* purificado (podendo variar de 10ng a 100ng, valores aceitáveis pela plataforma de sequenciamento). A quantificação das bibliotecas foi feita por PCR quantitativo em tempo real com o kit *Ion Library TaqMan Quantitation* (Thermo Fisher, EUA). A seguir o sequenciamento foi realizado pela plataforma Ion Torrent S5 (Thermo Fisher, EUA), com os reagentes *Ion 520 & Ion 530 ExT Kit-Chef* e *Ion 520 chip kit* (Thermo Fisher, EUA), visando gerarmos pelo menos de 10-30 mil sequências para cada amostra, o que se mostrou suficiente para saturar a identificação de populações bacterianas da boca, conforme estudo anterior de nosso grupo (Thomas et al. 2014).

3.7.2 PROCESSAMENTO, FILTRAGEM E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS GERADAS

As sequências obtidas passaram por processamento no *pipeline* estruturado pelo Núcleo de Biologia Computacional, desenvolvido em conjunto com o Laboratório de Genômica Médica do ACCCC. O processamento consistiu em: 1) remoção dos adaptadores e iniciadores; 2) remoção de sequências mapeadas no genoma humano; 3) importação das sequências restantes para o programa *Quantitative insights into microbial ecology 2 (Qiime2)*

(Bolyen et al. 2019); 4) aplicação de filtro de qualidade (*phred score* > 10); e 5) remoção de ruídos das sequências através do *Deblur* (controle de qualidade usando a referência do 16S como filtro positivo) (Amir et al. 2017).

Foi realizada classificação das sequências em *Amplicon Sequence Variant* (ASVs) no qual foi determinado sequências únicas e exatas com uma confiança estatística definida. Este método de classificação possui como vantagem uma identificação mais precisa dos microrganismos e maior facilidade de comparação entre estudos. A seguir, estas ASVs foram anotadas por meio de busca de similaridade contra sequências presentes no banco de dados bacteriano SILVA visando a classificação taxonômica das ASVs (Quast et al. 2013; Weinroth et al. 2022). Ao final das aplicações dos filtros e com as sequências restantes, foram feitas curvas de saturação para observarmos se todas as amostras haviam atingido a saturação (ou seja, se toda a diversidade de sequências bacterianas diversas presente em cada amostra teria sido devidamente amostrada durante o sequenciamento) e poderiam seguir para a análises comparativas. Como filtro adicional, foram consideradas somente as ASVs representadas por pelo menos 3 sequências.

Os dados restantes foram então analisados quanto à hipótese de normalidade e homogeneidade dos dados. A partir disso, foram selecionados testes paramétricos ou não paramétricos adequados para comparação da diversidade alfa (*Observed*, *Shannon*) entre os grupos de interesse. Para análise da diversidade beta (*Bray Curtis*, *Weighted* e *Unweighted unifrac*), foi utilizado o teste multivariado ANOSIM. As bactérias diferencialmente abundantes entre os grupos foram determinadas pelos métodos de LefSe e ANCOM-BC (Segata et al. 2011; Lin & Peddada 2020). Todas as análises foram realizadas no RStudio (v.4.1.0) com os pacotes apropriados.

3.8 PCR EM TEMPO REAL: ANÁLISE QUANTITATIVA DO DNA BACTERIANO E HUMANO

A fim de avaliar a presença e proporção de DNA bacteriano e humano na amostra biológica coletada, visando uma análise quantitativa da microbiota, os DNAs obtidos para cada amostra individual (casos e controles) foram amplificados por PCR quantitativo (qPCR), utilizando protocolo desenvolvido por nosso grupo (Albuquerque et al. 2022). Para isso, utilizamos dois pares de iniciadores para a amplificação, um específico para uma região do gene V1 do 16S-rDNA (F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' e R: 5'-TTACTCACCCGTICGCCRCT-3') e outro para detecção de fragmentos de DNA humano (ACT1) (F: 5'-

CCATCTACGAGGGGTATGC-3' e R: 5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGTA-3'). Cada par de iniciadores é capaz de gerar fragmentos com aproximadamente 100bp. Para cada reação, utilizamos 2ng de DNA e os reagentes do *Fast SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher, EUA), em 10µl de reação - Quadro 7. As amostras foram analisadas em duplicata e como controle positivo foi utilizado DNA de *E. coli*, enquanto água ultrapura (Sigma, EUA) foi utilizada como controle negativo. O protocolo de amplificação foi realizado na plataforma *QuantStudio 7* (Thermo Fisher, EUA) e iniciou-se com uma desnaturação a 95°C por 20s, seguido de 95°C por 3s e 60°C por 30s (40 ciclos). A partir dos Cts (*cycle threshold*) obtidos, foi determinado o número de cópias dos genomas humano e bacteriano, como descrito em Albuquerque et al (2022), para avaliar a relação entre os Cts médio na PCR em tempo real entre as amostras dos diferentes grupos e as proporções de genomas para bactérias-humanos entre os grupos caso e controle foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Dado a não normalidade dos dados, na análise dos valores da variação entre Cts (alvo bacteriano e DNA humano - delta Cts) e porcentagem de sequências obtidas no sequenciamento utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman.

Quadro 7 – Condições de amplificação dos fragmentos de DNA bacteriano (16S rRNA - região V1) e humano.

Reação	Volume (µl)
16S (V1) - bacteriano	
Iniciador V1F (2µM)	1,0
Iniciador V1R (2µM)	1,0
Fast SYBR Green 2X mix	5,0
Amostra (2ng) + H2O	3,0
Volume final	10,0
Humano	
Iniciador beta-actina F (2µM)	1,0
Iniciador beta-actina R (2µM)	1,0
Fast SYBR Green 2X	5,0
Amostra (2ng) + H2O	3,0
Volume final	10,0

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICOS

Para registrar todas as informações coletadas neste projeto criamos um banco de dados usando o sistema *Research Electronic Data Capture* (REDCap), onde inserimos todas as informações pertinentes ao projeto. A partir dele exportamos os dados para o programa

estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para análise de associação entre as variáveis clínicas e os grupos caso e controle utilizamos os testes de Fisher e qui-quadrado para variáveis qualitativas e Mann-Whitney para as variáveis quantitativas. Para todos os testes estatísticos, foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS CLÍNICOS

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra do estudo incluiu um total de 60 indivíduos, sendo 39 pacientes no grupo caso (pacientes com LOPM) e 21 indivíduos no grupo controle, conforme a tabela 2.

Os grupos caso e controle foram pareados por sexo, idade e hábitos de tabagismo e etilismo, devido ao impacto que esses fatores possuem na composição da microbiota oral (Thomas et al. 2014; Gao et al. 2018). A maioria dos indivíduos recrutados foram do sexo feminino (42/60; 70%) com média da idade 57 anos. No grupo caso, a mediana da idade foi de 63 (variando de 21 a 92) anos e no grupo controle de 55 (variando de 33 a 80) anos. A maioria dos indivíduos do estudo relataram nunca terem fumado (35/60; 58,3%) e eram etilistas (36/60; 60%). Uma vez que estes dados foram usados para pareamento dos indivíduos, estas variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos caso e controle.

A maioria dos participantes se auto declarou branco (37/60; 61,7%), sendo 28/39 (71,8%) no grupo caso e 9/21 (42,9%) no grupo controle, incluindo 9/21 (42,9%) pardos. Com relação ao estado civil, a maioria era casado (41/60; 68,3%) e possuía ensino superior completo (33/60; 55%), podendo ser explicada pelo fato de o recrutamento ter ocorrido numa instituição privada e na qual a maioria dos pacientes do grupo caso possuía convênio médico (40/39; 66,7%) e o grupo controle ser formado por acompanhantes de pacientes atendidos na mesma instituição.

A maioria dos pacientes (34/60; 56,7%) apresentava comorbidades e oito pacientes apresentaram mais de uma comorbidade. As comorbidades mais frequentes foram hipertensão (n=23), seguida por doença reumática (n=8) e doença pulmonar obstrutiva

crônica (n=8) e cardiopatia (n=4). Além disso, 14 indivíduos do estudo tiveram diagnóstico de câncer anteriormente, sendo 11 pacientes do grupo caso e três indivíduos do grupo controle.

Dos 11 pacientes do grupo caso, apenas um paciente teve diagnóstico de adenocarcinoma de próstata sem comprometimento linfonodal, tratado apenas com cirurgia e enquanto os outros 10 indivíduos já tiveram diagnóstico de CEC em cavidade oral anteriormente. No grupo controle, um indivíduo teve diagnóstico de câncer de próstata, tratado com prostatectomia, outro teve câncer de ovário, tratado com histerectomia e outro câncer de pele, também tratado também com remoção cirúrgica.

Entre os 10 pacientes do grupo caso que tiveram diagnóstico de CEC em cavidade oral anteriormente, dois pacientes apresentaram CEC in situ (com localização em borda lateral de língua), seis pacientes apresentaram CEC invasivo (sendo quatro localizados em borda lateral de língua, um em ventre de língua e um em mucosa jugal direita), um paciente apresentou CEC verrucoso em palato mole e outro paciente apresentou CEC em lábio inferior. Todos estes pacientes não apresentaram comprometimento linfonodal, nem metástases a distância e foram tratados com ressecção cirúrgica. Em 4/10 pacientes foi realizado esvaziamento cervical e 6/10 pacientes já realizavam acompanhamento de LOPM (Eritroleucoplasia e LVP) na Instituição.

Em relação ao uso de medicações, a maioria dos pacientes relatou fazer uso contínuo de alguma medicação (40/60;80%). As medicações mais utilizadas foram os anti-hipertensivos (n= 23), seguidos de terapia de reposição ou suplementação hormonal levotiroxina (n=15). A maioria não realizou tratamento com anti-inflamatórios recentemente (37/60;61,7%). A maioria utilizou antibiótico há mais de 01 ano (23/60; 38,4%), e embora 6/60 pacientes relataram que não lembravam a última vez que utilizaram antibiótico, todos relataram um intervalo de pelo menos 45 dias sem consumir essa medicação. Com relação ao método de aquecimento e cozimento dos alimentos, gás e eletricidade foram mais utilizados em ambos os grupos.

Tabela 2: Características gerais dos 60 participantes recrutados pelo estudo.

Variáveis		Total (60)	Casos (39)	Controles (21)	Valor de <i>p</i>
		N (%)	N (%)	N (%)	
Sexo	Feminino	42 (70)	27 (69,2)	15 (71,4)	0,489 ^a
	Masculino	18 (30)	12 (30,8)	6 (28,6)	
Idade	Mediana	58	63	55	0,300 ¹
	(min-máx)	(21-92)	(21-92)	(33-80)	
Etnia	Branco	37 (61,7)	28 (71,8)	9 (42,9)	0,071 ^b
	Negro	5 (8,3)	2 (5,1)	3 (14,2)	
	Pardo	18 (30)	9 (23,1)	9 (42,9)	
Estado Civil	Solteiro	11 (18,3)	7 (18)	4 (19)	0,907 ^b
	Casado	41 (68,3)	26 (66,7)	15 (71,4)	
	Viúvo	3 (5,0)	2 (5,1)	1 (4,8)	
	Divorciado	5 (8,4)	4 (10,2)	1 (4,8)	
Grau de Instrução	Ensino Fundamental	8 (13,3)	6 (15,4)	2 (9,5)	0,694 ^b
	Ensino Médio	19 (31,7)	13 (33,3)	6 (28,6)	
	Ensino Superior	33 (55)	20 (51,3)	13 (61,9)	
Fumante	Não	35 (58,4)	22 (56,4)	13 (61,9)	0,846 ^a
	Sim	8 (13,3)	5 (12,8)	3 (14,3)	
	Ex- Fumante	17 (28,3)	12 (30,8)	5 (23,8)	
Etilista	Não	22 (36,7)	15 (38,5)	7 (33,3)	1,00 ^a
	Sim	36 (60,0)	22 (56,4)	14 (66,7)	
	Ex- Etilista	2 (3,3)	2 (5,1)	0 (0)	
Apresenta Comorbidades	Não	26 (43,3)	14 (35,9)	12 (57,1)	0,189 ^b
	Sim	34 (56,7)	25 (64,1)	9 (42,9)	
Diagnóstico de Câncer	Não	46 (76,7)	28 (71,8)	18 (85,7)	0,340 ^b
	Sim	14 (23,3)	11 (28,2)	3 (14,3)	
Uso contínuo de medicação	Não	12 (20)	4 (10,3)	8 (38)	0,017 ^b
	Sim	48 (80)	35 (89,7)	13 (62)	
Uso de anti-inflamatório	Não	37 (61,7)	23 (59)	14 (66,7)	0,759 ^a
	Sim	23 (38,3)	16 (41)	7 (33,3)	
Uso de antibiótico	Entre 1 e 6 meses	17 (28,3)	12 (30,8)	5 (23,8)	0,232 ^b
	Entre 6 meses e 1 ano	14 (23,3)	7 (17,9)	7 (33,3)	
	Mais de 1 ano	23 (38,4)	17 (43,6)	6 (28,6)	
	Não lembra	6 (10,0)	3 (7,7)	3 (14,3)	
Método de aquecimento e cozimento dos alimentos	Gás	31 (51,7)	21 (53,8)	10 (47,6)	0,687 ^a
	Eletricidade	29 (48,3)	18 (46,2)	11 (52,4)	

Legenda: (1) :Teste de independência; (a): Teste de qui-quadrado com correção de continuidade; (b): Teste exato de Fisher; (*): valor de *p* estatisticamente significativo.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À SAÚDE BUCAL DOS PARTICIPANTES

Com relação à saúde bucal, descrita na tabela 3, a maioria dos pacientes tanto do grupo caso quanto do grupo controle já haviam tido perda de dente permanente (42/60;70%) e não utilizavam prótese dentária (45/60;75%). Com relação aos cuidados de higiene bucal, a maioria dos pacientes do grupo caso relataram a escovação dentária 3 vezes ao dia (20/39; 51,2%), utilização do fio dental diariamente (22/39;56,4%) e não usam enxaguante bucal (59%). No grupo controle, a maioria relatou escovar os dentes 2x ao dia (9/21;42,9%), utilizam fio dental raramente (6/21;28,6%) ou não usam (6/21;28,6%) e não utilizam enxaguante bucal (15/21;71,4%). Embora a escovação dentária tenha sido uma variável estatisticamente significativa, mais frequente nos indivíduos com LOPM, a higiene oral não é um fator de risco estabelecido para LOPM e estudos mostram que a escovação dentária na realidade pode ser um fator protetor de risco de CEC em cavidade oral e que os fatores higiene oral precária e ausência de visitas ao dentista podem estar associados ao câncer de boca (Wu, Zang e Zou 2021). Vale ressaltar também que os cuidados com a higiene bucal impedem o desenvolvimento e maturação do biofilme e também podem reduzir a carga bacteriana (Seigh et al. 2021).

Tabela 3: Dados de saúde bucal dos participantes do estudo.

Variáveis		Total (60)	Casos (39) N (%)	Controles (21) N (%)	Valor de p
Já perdeu dente permanente	Não	18 (30)	11 (28,2)	7 (33,3)	0,906 ^b
	Sim	42 (70)	28 (71,8)	14 (66,7)	
Usa prótese dentária	Não	45 (75)	29 (74,3)	16 (76,1)	1,00 ^a
	Sim	15 (25)	10 (25,7)	5 (23,9)	
Escovação dentária	1x ao dia	7 (11,7)	0 (0)	7 (33,3)	<0,001 ^{b,*}
	2x ao dia	28 (46,7)	19 (48,7)	9 (42,9)	
	3x ao dia	25 (41,6)	20 (51,2)	5 (23,8)	
Uso de fio dental	Diário	27 (45)	22 (56,4)	5 (23,8)	0,051 ^b
	Algumas vezes	10 (16,7)	6 (15,4)	4 (19)	
	Raramente	14 (23,3)	8 (20,5)	6 (28,6)	
	Não usa	9 (15)	3 (7,7)	6 (28,6)	
Uso de enxaguante bucal	Diário	6 (10)	6 (15,4)	0 (0)	0,131 ^b
	Algumas vezes	9 (15)	7 (17,9)	2 (9,5)	
	Raramente	7 (11,7)	3 (7,7)	4 (19)	
	Não usa	38 (63,3)	23 (59)	15 (71,4)	

Legenda: (a): Teste de qui-quadrado com correção de continuidade; (b):Teste exato de Fisher; (*): valor de p estatisticamente significativo.

4.2 CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS ÀS LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS

Na tabela 4, descrevemos as características clínicas e histopatológicas relacionadas ao diagnóstico das lesões. No qual prevaleceu o diagnóstico de LPO/LLO (13/39), seguido de leucoplasia homogênea (10/39). As lesões de sítios anatômicos múltiplos foram mais comuns (21/39) e aspectos clínicos das lesões predominantes foram placas brancas, seguido de áreas eritematosas. Além disso, a localização anatômica mais comum foi a borda lateral de língua em leucoplasias homogêneas, corroborando com achados de outros estudos em diferentes populações (Aittiwarapoj et al. 2019, Pires et al. 2020). Já outro estudo retrospectivo que avaliou 208 casos de leucoplasias (64,13%), eritroleucoplasia (11,1%) e eritroplasia (4,8%), as localizações mais comuns foram gengiva, seguida de mucosa jugal e língua (Mello et al. 2018a). A segunda localização mais comum foi em mucosa jugal em LPO/LLO, também apresentada em outros estudos, como a localização mais comum em LPO (Radochová et al. 2021, Netto et al. 2022).

Dez pacientes apresentaram diagnóstico de leucoplasia homogênea com prevalência de placas brancas em borda de língua. Entre os pacientes, apenas um paciente apresentou lesões em múltiplos sítios, com superfícies das lesões em placas brancas e verrucosas, sendo que o mesmo não apresentava critérios para classificar como LVP. Os pacientes que apresentaram diagnóstico de LVP (n=6) tiveram múltiplos sítios anatômicos localizados predominantemente em mucosa jugal, rebordo alveolar e borda de língua. Com relação aos aspectos das lesões prevaleceu placas e eritema. Em dois pacientes foi observado áreas liquenóides e apenas um paciente apresentou áreas verrucosas.

Eritroleucoplasias foi observada em oito pacientes. Na qual, localização anatômica mais comum foi borda de língua. Em apenas dois pacientes se observou sítios anatômicos múltiplos, ambos localizados em rebordo alveolar superior, mucosa jugal e palato duro. Com relação aos aspectos das lesões, todos apresentavam eritemas e placas brancas.

Onze pacientes tiveram diagnóstico de LP e dois pacientes de LLO, sendo a localização anatômica mais comum a mucosa jugal seguida do rebordo alveolar. Os aspectos das lesões mais comuns foram eritemas, estrias e placa. Em três pacientes com LPO tiveram lesões em mucosa jugal bilateral e os dois pacientes com LLO tiveram lesão em apenas mucosa jugal unilateral.

Tabela 4: Descrição das características clínicas das LOPM de acordo com o diagnóstico.

		Leucoplasia homogênea	LPV	Eritroleucoplasia	Eritroplasia	LPO/ LLO
N= 39		10	6	8	2	13
Sítios anatômicos	Único	9	0	6	2	1
	Múltiplos	1	6	2	0	12
Localização anatômica	Assoalho bucal	0	0	1	0	0
	Borda de língua	10	4	4	2	4
	Dorso de língua	0	0	0	0	1
	Mucosa jugal	1	4	2	0	11
	Mucosa labial	0	1	1	0	2
	gengiva	1	4	2	0	7
	Palato duro	0	1	2	0	0
	Lesão fundamental	Eritema	0	3	7	2
Erosão	0	0	0	0	3	
Estrias	0	0	0	0	6	
Liquenóide	0	2	0	0	1	
Mácula	0	0	1	0	0	
Úlcera	0	0	0	0	3	
Verrucosa	1	1	0	0	0	
Placa	10	6	7	1	4	

Legenda: (LVP): leucoplasia verrucosa proliferativa; (LPO/LLO): líquen plano oral/ lesão líquenóide oral.

No nosso estudo, 18 pacientes apresentaram displasia epitelial oral no exame anatomopatológico. Na tabela 5, correlacionamos a classificação das displasias epiteliais orais com o diagnóstico das LOPM, exceto líquen plano e lesões líquenóides pois estas lesões não apresentam displasia epitelial oral na sua histologia (Van der Meij et al. 2007). A displasia epitelial leve prevaleceu em pacientes com diagnóstico clínico de eritroleucoplasia (tabela 5).

Entretanto, em estudo retrospectivo avaliando 684 pacientes com diagnóstico de LOPM (considerando apenas leucoplasias, eritroplasias e queilite actínica) mostram eritroleucoplasias apresentaram displasia moderada ou intensa em 41% dos casos (Pires et al. 2020). Importante relatar que um paciente com diagnóstico de leucoplasia homogênea apresentou displasia epitelial intensa no exame anatomopatológico, visto que na literatura a

leucoplasia homogênea está mais associada a displasia epitelial leve ou mesmo não apresentar displasia (Arduino et al. 2009; Bagan et al. 2022).

Tabela 5: Correlação da classificação das displasias epiteliais com o diagnóstico das LOPM.

Classificação das displasias	Diagnóstico das LOPM				Valor de <i>p</i>
	Leucoplasia homogênea	LVP	Eritroleucoplasia	Eritroplasia	
Sem displasia	5	2	1	0	0,253
Leve	2	3	5	1	
Moderada	2	1	2	1	
Intensa	1	0	0	0	

Legenda: Teste de qui-quadrado com correção de continuidade; LVP: leucoplasia verrucosa proliferativa.

Na tabela 6, correlacionamos as características clínicas dos casos com a presença e ausência de displasia epitelial oral, visto que a presença de displasia epitelial oral é o principal risco para a transformação maligna das lesões. O sexo feminino (71,4% e 66,9%), etnia branco (71,4% e 77,8%) que não fumavam (52,4% e 61,1%) e etilista (61,9% e 62,2%) foram mais prevalentes nos casos com a presença e a ausência de displasia epitelial oral respectivamente. Em revisão sistemática de Mello et al (2018b), as LOPM foram identificadas mais comumente no sexo masculino (56,9%) e de etnia branca (73,7%). Já em outro estudo retrospectivo e realizado no Brasil, Pires et al (2020), teve maior prevalência do sexo feminino, fumantes/ex-fumantes e etilistas. A maioria dos casos com ausência de displasia epitelial oral não tiveram diagnóstico de câncer anteriormente (19/21; 90,5%), já nos casos com presença de displasia oral a metade (9/18; 50%) já teve diagnóstico de câncer anteriormente e esta diferença foi estatisticamente significativa devido a inclusão dos casos de LPO/LLO nos casos com ausência de displasia epitelial oral ($p=0,005$).

Tabela 6: Correlação das características clínicas dos casos em relação com a presença e ausência de displasia epitelial oral.

Variáveis		Casos sem displasia N = 21 (%)	Casos com displasia N = 18 (%)	Valor de <i>p</i>
Sexo	Feminino	15 (71,4)	12 (66,7)	0,748
	Masculino	6 (28,6)	6 (33,3)	
Etnia	Branco	15 (71,4)	14 (77,8)	0,679
	Negro	1 (4,8)	1 (5,5)	
	Pardo	5 (23,8)	3 (16,7)	
Fumante	Nunca fumou	11 (52,4)	11 (61,1)	0,859
	Ex fumante	7 (33,3)	5 (27,8)	
	Fumante	3 (14,3)	2 (11,1)	
Etilismo	Nunca bebeu	8 (38,1)	5 (27,8)	0,496
	Etilista	13 (61,9)	13 (72,2)	
Teve câncer	Não	19 (90,5)	9 (50)	0,005*
	Sim	2 (9,5)	9 (50)	

Legenda: Teste de qui-quadrado com correção de continuidade; *: valor de p estatisticamente significativo.

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

4.3.1. PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE DE QUALIDADE

Um total de 73 amostras foram coletadas e tiveram a região V3-V4 do gene 16s rRNA amplificadas e sequenciadas. Destas, 60 amostras correspondiam à primeira coleta e 13 correspondiam à segunda coleta realizada nos participantes do grupo caso (após ~1 ano), sendo que 03/13 destas amostras foram coletadas após diagnóstico de CEC em cavidade oral. Após processamento das sequências brutas e aplicação dos filtros de qualidade descritos na Metodologia, restaram um total de 121.291 sequências, com uma mediana de 1.267 sequências por amostra (mínimo de 169 e máximo de 20.484). Para determinarmos o número de sequências necessárias que pudessem garantir a cobertura de toda a diversidade bacteriana (saturação) nas amostras, curvas de saturação foram construídas para a totalidade das amostras dos indivíduos caso e controle - Figura 1. Todas as amostras apresentaram perfil de saturação.

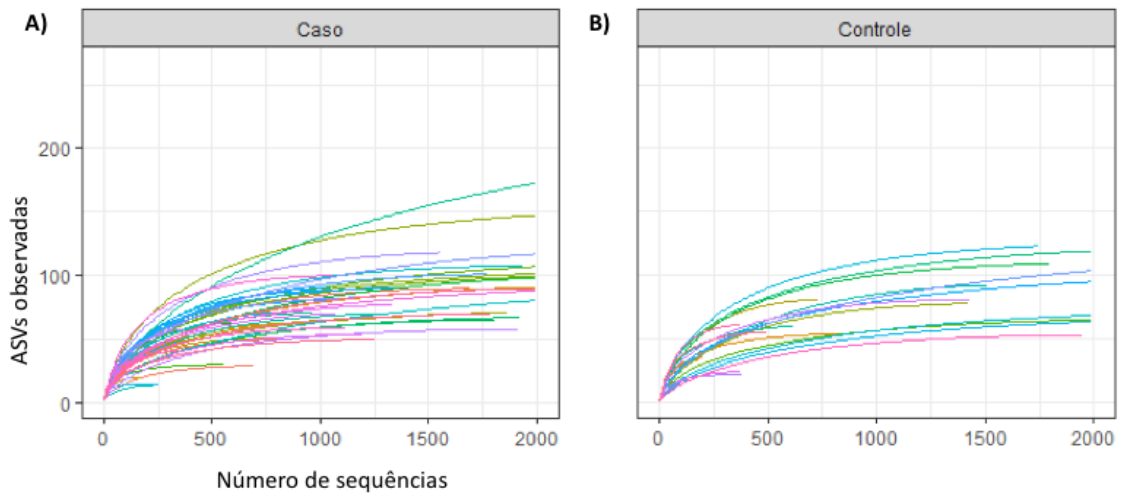


Figura 1 – Curvas de saturação das amostras sequenciadas. (A) Curvas de saturação do grupo caso. (B) Curvas de saturação do grupo controle. As diferentes cores representam as diferentes amostras sequenciadas.

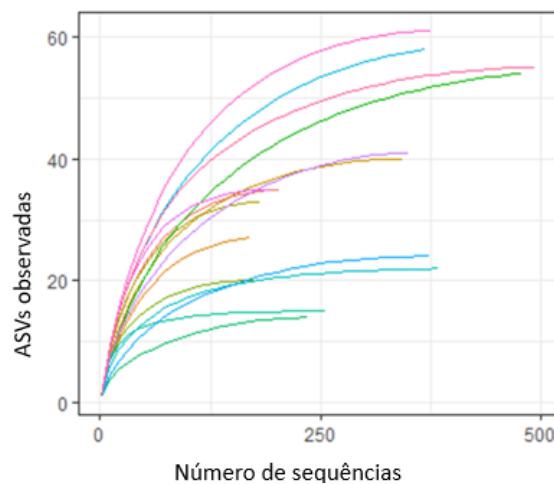


Figura 2 – Curva de saturação das amostras com número de sequências abaixo de 500. As diferentes cores representam as diferentes amostras sequenciadas.

Foram observados diferentes perfis de saturação para as amostras, no entanto, de modo geral, as amostras dos dois grupos saturaram com aproximadamente 500 sequências, e apenas duas amostras do grupo caso saturaram acima de 1500 sequências, indicando que estas amostras possuem maior diversidade bacteriana. Com relação as ASVs, obtivemos uma mediana de ASVs por amostra no grupo caso de 69 (mínimo de 13 e máximo de 260) e 67 (mínimo de 22 e máximo de 123) no grupo controle (Figura 1). Mesmo as amostras que permaneceram com um menor número de sequências (Figura 2) parecem ter alcançado a saturação desejada, permitindo assim a inclusão das mesmas nas análises do estudo. Essa variação pode ser explicada pela própria variabilidade microbiana interindividual, como

também a quantidade de ácidos nucléicos extraídos das amostras ou ainda relacionada a algum viés de amplificação no momento da reação de amplificação, o que seria reflexo de uma inabilidade de termos todos os microrganismos recuperados durante a geração dos *amplicons*. Estes fatores são vieses conhecidos em experimentos de metagenômica (Nearing, Comeau & Langille 2021) e a análise de saturação pela diversidade ajuda a investigarmos sua ocorrência.

Além de realizarmos a caracterização da microbiota bacteriana por sequenciamento, estimamos também a quantidade de genomas bacterianos e humanos nas amostras com a finalidade de investigarmos possíveis flutuações quantitativas que pudessem estar associadas com a quantidade de sequências obtidas no sequenciamento e também com a presença de LOPM e as condições clínicas associadas a esse diagnóstico, como a presença de displasia. Para isso, realizamos PCR quantitativo utilizando a região V1 do gene 16S rRNA e um fragmento do genoma humano para normalização dos valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos. As reações foram feitas em duplicatas e para realização dos cálculos foram utilizados os valores médios de Ct obtidos para cada alvo (16S ou humano) em cada amostra. O número de genomas humanos e bacterianos em cada amostra foram calculados a partir de um protocolo previamente estabelecido pelo nosso grupo, baseado na normalização do número de cópias de cada gene alvo e curvas padrão previamente construídas, sendo: cópias do genoma humano (\log_{10}) = $9,02 - (0,268 \times \text{valor médio de Ct})$; cópias de genomas bacterianos (\log_{10}) = $9,06 - (0,298 \times \text{valor médio de Ct})$ (Albuquerque et al. 2022).

Ao investigarmos os valores de Ct obtidos para os grupos caso e controle, observamos, conforme a tabela 7, que os valores médios de Cts bacterianos de ambos os grupos foram menores que de humanos, indicando maior quantidade de DNA bacteriano que de humano nas amostras. Ao normalizarmos os dados, avaliando os valores da razão dos Ct médios 16S/humano entre os grupos caso e controle, observamos diferença estatisticamente significativa, indicando maior presença de DNA bacteriano nas amostras coletadas dos pacientes com LOPM (caso) que aquelas dos indivíduos do grupo controle. Da mesma maneira, quando utilizamos os valores de Ct obtidos para inferirmos a razão de genomas bacterianos/genomas humanos, observamos maior presença de DNA bacteriano nas amostras dos indivíduos com LOPM, independente ou não da presença de displasia (Figura 3). Os valores observados, em \log_{10} foram uma média de 3,51 ($\pm 2,6$) para os casos com LOPM, sendo 3,87 ($\pm 3,5$) e 3,21 ($\pm 1,7$) para os casos com e sem displasia, respectivamente, e 2,05 ($\pm 1,9$) para

os controles. Conforme demonstrado na seção a seguir, esse aumento na quantidade bacteriana no grupo caso, não foi refletida em maior diversidade bacteriana em comparação com os indivíduos sem LOPM (Figura 3).

Curiosamente, observamos que existe uma tendência, embora não significativa ($p=0,086$) na diminuição da quantidade bacteriana nas amostras daqueles indivíduos com LOPM ao longo de seu acompanhamento (Figura 4), com valores em log 10 (média) de 4,41 ($\pm 3,1$) na coleta no momento 1 e 2,97 ($\pm 2,0$) no momento de coleta 2, após ~ 1 ano de acompanhamento. Embora diversos estudos tenham investigado a composição da microbiota em tecidos normais e ao longo da malignização, para diversos tipos tumorais (Bornigen et al. 2017; Hogan et al. 2021), ainda não se sabe ao certo o impacto da variação quantitativa na população microbiana e a ocorrência de neoplasias.

Tabela 7: Valores médios de Ct obtidos para cada gene-alvo entre os grupos do estudo.

Iniciador	n	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p^a
Ct do 16S-V1				
Grupo caso	39	19,1 (3,34)	18,7 (14,0-25,6)	0,009*
Grupo controle	21	21,6 (2,86)	21,7 (14,4-28,1)	
Ct do alvo humano (ACT)				
Grupo caso	39	29,1 (2,08)	29,1 (25,2-33,1)	0,806
Grupo controle	21	29,1 (2,13)	28,7 (26,2-35,0)	
Razão Ct 16S/humano				
Grupo caso	39	0,66 (0,08)	0,67 (0,47-0,83)	<0,001*
Grupo controle	21	0,74 (0,07)	0,74 (0,52-0,84)	

Legenda: (a): Teste não paramétrico de Mann-Whitney; (*): valor de p estatisticamente significativo; (DP): desvio padrão; (mín): mínimo; (máx): máximo.

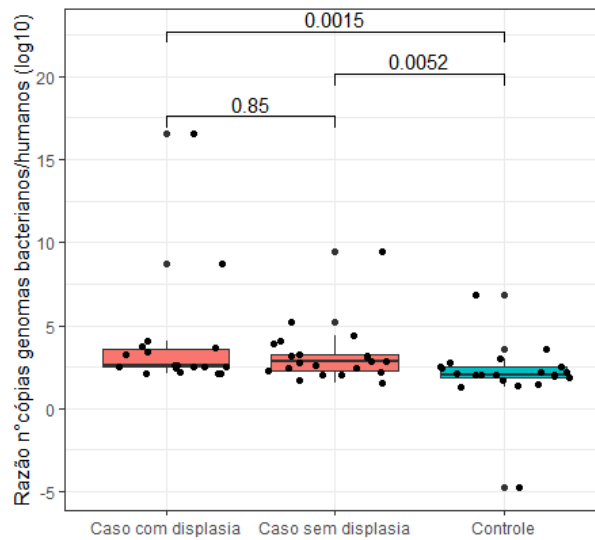


Figura 3 – Razão entre os genomas bacterianos/humanos entre os grupos caso com displasia, caso sem displasia e controle. Teste não paramétrico de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

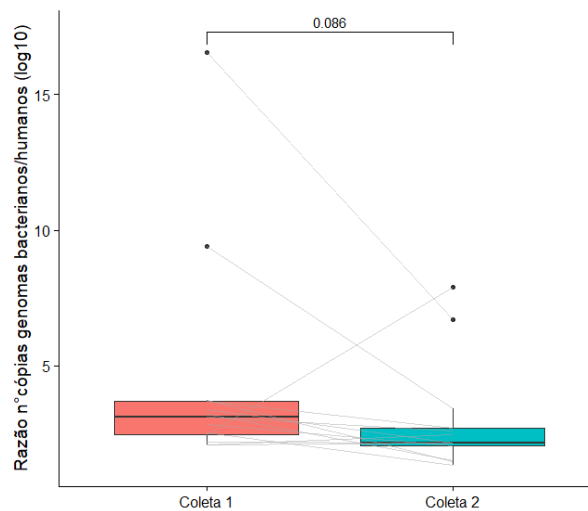


Figura 4 – Razão entre os genomas bacterianos/humanos para as amostras com LOPM nos momentos de coleta 1 e 2. Teste não paramétrico de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

A seguir, investigamos se as amostras que apresentaram menor quantidades de sequências tinham realmente menor quantidade de DNA bacteriano. Observamos que há uma baixa e não significativa correlação negativa ($R = -0,041$ e $p = 0,073$) entre a razão do número de genomas bacterianos/humanos em cada amostra e o número de sequências obtidas, independente de pertencerem ao grupo caso ou controle, conforme a figura 5. Dessa maneira, consideramos que as amostras que tiveram menor número de sequências devido a algum

outro fator intrínseco ou da própria metodologia empregada no estudo. Além disso, embora as amostras de *swab* oral utilizadas no estudo tenham apresentado maior quantidade de genoma bacteriano por humano, este tipo amostral ainda é considerado um tipo com baixa biomassa bacteriana, conforme observado anteriormente por nosso grupo, quando comparado com outras amostras como fezes e pele, e por vezes, a amplificação do gene 16S rRNA está sujeita à diversos fatores interferentes, como quantidade de DNA total e bacteriano da amostra, presença de inibidores da reação de amplificação, ciclagem, entre outros (Albuquerque et al. 2022).

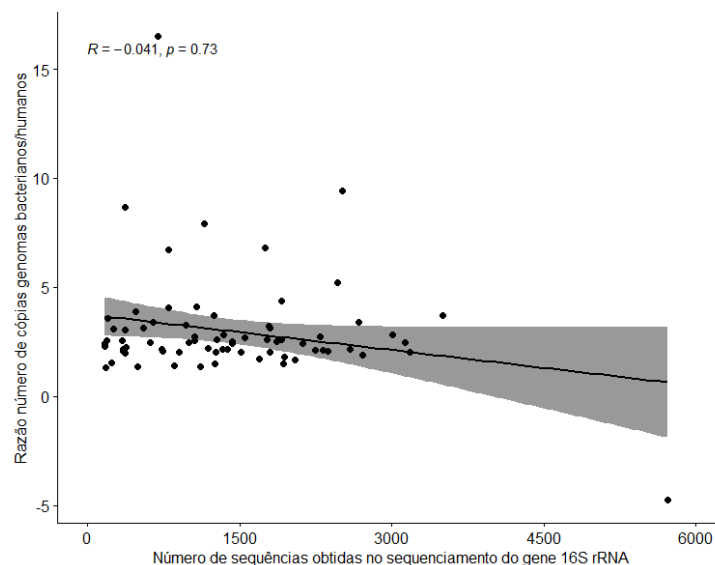


Figura 5 – Gráfico de correlação linear observada entre a razão do número de cópias dos genomas bacterianos/humanos em relação ao número de sequências obtidas no sequenciamento do gene 16S rRNA (Correlação Spearman). Área sombreada representa o intervalo de confiança (95%).

4.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA

Nas 60 amostras correspondentes à primeira coleta, foi possível identificarmos um total de 9 filos, 15 classes, 24 ordens, 47 famílias e 67 gêneros bacterianos, sendo que prosseguimos com as análises utilizando os níveis taxonômicos de família e gênero. Apesar das amostras do grupo caso apresentarem mais ASVs que no grupo controle a mediana entre os grupos é muito próxima e não podemos afirmar que existe uma maior diversidade bacteriana no grupo caso. Em todos os níveis taxonômicos identificamos ASVs classificadas como desconhecidas, com as nomenclaturas “NA” ou “uncultured_bacterium”. Essas nomenclaturas são usadas pelo banco de dados SILVA para denominar táxons ainda não identificados na literatura ou porque a região sequenciada não foi suficiente para classificação

desta bactéria. Neste estudo a nível de gênero foram observadas 300 ASVs classificadas como desconhecidas, sendo 195 para o grupo caso e 105 para o grupo controle, representando 0,8% de todos dos gêneros das amostras do estudo. A nível de família foram observadas 60 ASVs classificadas como desconhecidas, 39 do grupo caso e 21 do grupo controle, representando 0,16% de todas as famílias das amostras do estudo, sendo a frequência de ASVs classificadas como desconhecidas ainda menor. Devido a essa limitação, seguimos as análises e discussões apenas com as bactérias que possuem classificação taxonômica já conhecida e anotada no banco de dados, uma vez que a técnica de sequenciamento do gene 16S-rDNA é limitante para um maior aprofundamento filogenético. Uma alternativa a esta abordagem é o uso da técnica de sequenciamento do tipo *shotgun sequencing*, que realiza o sequenciamento de todos os ácidos nucléicos da amostra, possibilitando a montagem de genomas completos e permitindo maior sensibilidade na identificação de gêneros, espécies e até cepas, mesmo que menos abundantes.

4.3.3 DIVERSIDADE MICROBIANA ALFA E BETA

A diversidade alfa tem o objetivo de avaliar qual a diversidade microbiana existente dentro de uma dada amostra. O método mais simples simplesmente reflete o número de táxons presentes em cada amostra, táxons observados ou simplesmente *Observed*. Nesta métrica, uma amostra que apresente mais táxons que a outra, também irá apresentar maiores valores de diversidade. No entanto, duas amostras podem conter o mesmo número de táxons, mas a frequência de cada um pode ser diferente entre as duas amostras. Esta heterogeneidade na distribuição das frequências dos táxons não é capturada pelo índice *Observed*, mas pode ser medida pelo índice de Shannon (também chamado de Índice de Diversidade de Shannon, Índice de Shannon–Wiener, Índice de Shannon–Weaver ou Entropia de Shannon) (Lande, 1996). Neste estudo os utilizamos estes dois índices. Conforme apresentado na figura 6, casos e controles apresentaram uma diversidade alfa semelhante entre si, não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparada à diversidade microbiana entre os grupos.

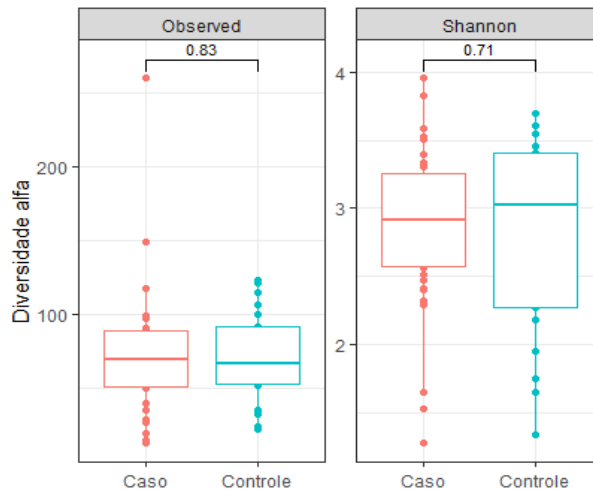


Figura 6 – Diversidade alfa em relação aos grupos caso e controle. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência e diferença significativa entre os grupos. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

Além da diversidade alfa, analisamos também os grupos quanto a possíveis diferenças na sua composição através da diversidade beta, que permite mensurar as diferenças entre grupos de amostras que, neste caso, refletem casos e controles. As métricas mais utilizadas são *Bray-Curtis*, índice quantitativo que avalia a similaridade da composição microbiana e as distâncias *UniFrac* (*unweighted* e *weighted*) que avaliam quão próximas são as bactérias dentro da classificação filogenética. A lógica desta métrica é que bactérias mais similares filogeneticamente, devem apresentar atividades metabólicas mais parecidas, o que levaria a uma menor distância *UniFrac*. Enquanto o índice *UniFrac unweighted* tem maior foco em presença/ausência de diferentes táxons e sua distância filogenética, o índice *weighted* avalia também considerando a abundância dessas bactérias na composição final (Bray & Curtis 1957; Lozupone et al. 2007). Na avaliação da diversidade beta por meio do método de redução de dimensionalidade *Principal Coordinates Analysis* (PCoA), não observamos diferença na composição bacteriana entre as amostras dos grupos caso e controle, em todos os índices avaliados (Figura 7), o que sugere que as abundâncias e as distâncias filogenéticas entre as bactérias são semelhantes entre os grupos, não observando um valor de p significativo.

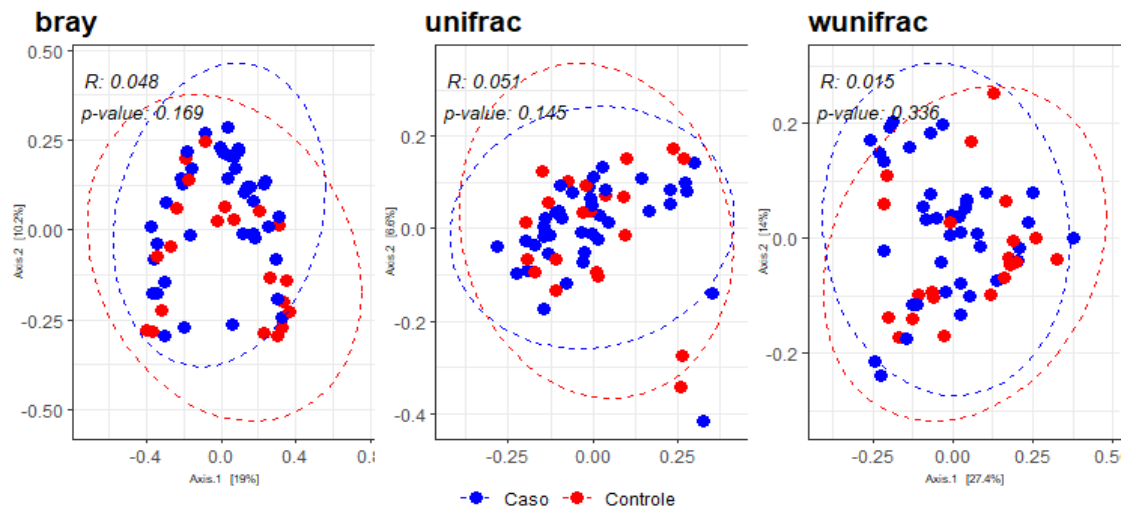


Figura 7 – Diversidade beta entre os grupos caso e controle. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, sendo o R seu coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

De maneira similar ao nosso estudo, Mok et al (2017) ao analisarem amostras de *swabs* da mucosa de LOPM, CEC e indivíduos saudáveis, observaram maior riqueza microbiana nas amostras de CEC, mas valores semelhantes de diversidade entre as LOPM e controles saudáveis. Além disso, estudos que analisaram o microbioma de pacientes com diagnóstico de líquen plano oral e controles saudáveis (por meio de amostras de mucosa e saliva, respectivamente), mostraram uma diversidade bacteriana semelhante entre os grupos estudados (Choi et al. 2016; Yu et al. 2020). É importante lembrarmos que, na casuística de nosso estudo 13/39 (33,33%) indivíduos tinham lesão do tipo LPO/LLO, sendo os nossos dados similares aos apresentados acima por estes autores. No entanto, alguns estudos, ao utilizarem tipos amostrais diferentes para análise da microbiota oral, identificaram maior diversidade em LOPM, como é o caso de Hu et al (2016) que, ao analisarem amostras de saliva de leucoplasias, CEC e mucosas saudáveis observaram maior diversidade microbiana no grupo de CEC e Leucoplasias e Decsi et al (2018), que, através do sequenciamento de biópsias das LOPM e tecidos saudáveis do mesmo paciente, também detectaram uma diversidade bacteriana aumentada nas lesões.

Essa variabilidade entre os estudos e nas diversidades bacterianas encontradas pode ser explicada pela diferença nas regiões do gene 16S RNA sequenciadas e também pelos diferentes tipos de amostras estudadas (*swab*, saliva ou biópsias). Enquanto nos estudos de Choi et al (2016) e Yu et al (2020) as regiões sequenciadas foram V1-V3 e V4, respectivamente,

Mok et al (2017) sequenciaram as regiões V6-V9 e em nosso estudo, sequenciamos as regiões V3-V4. Por outro lado, Hu et al (2016) não especificaram a região do gene 16S rRNA estudada e Decsi et al (2018) realizaram um sequenciamento do tipo *shotgun*. Além disso, diversos outros fatores podem influenciar o perfil bacteriano identificado em análises metagenômica, como o método de extração de DNA, o *pipeline* escolhido para análise bioinformática, entre outros (Knight et al. 2018; Lagier et al. 2018; Teng et al. 2018).

Como a presença de displasia é um indicador da possibilidade de transformação maligna nas LOPM e pode estar associada às alterações na microbiota, também realizamos análise de diversidade alfa comparando o grupo caso com e sem presença de displasia *versus* o grupo controle. Para os índices *Observed* e *Shannon* observamos novamente uma similaridade entre as diversidades dos grupos analisados, sem significância estatística (Figura 8). Na análise de diversidade beta, observamos diferença significativa na avaliação métrica *weighted unifrac* ($p=0,044$), o que sugere uma diferença na composição bacteriana entre os grupos, em relação à sua abundância e filogenia bacteriana (Figura 9).

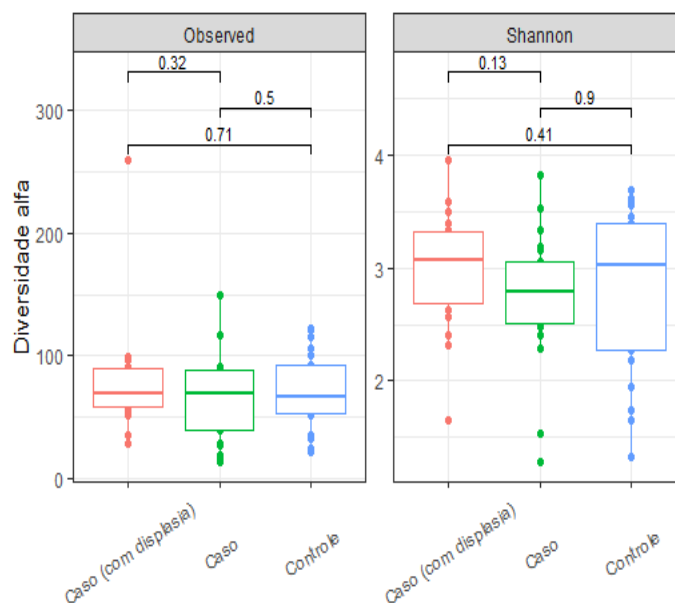


Figura 8 – Diversidade alfa em relação aos grupos caso (com e sem displasia) e controle. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

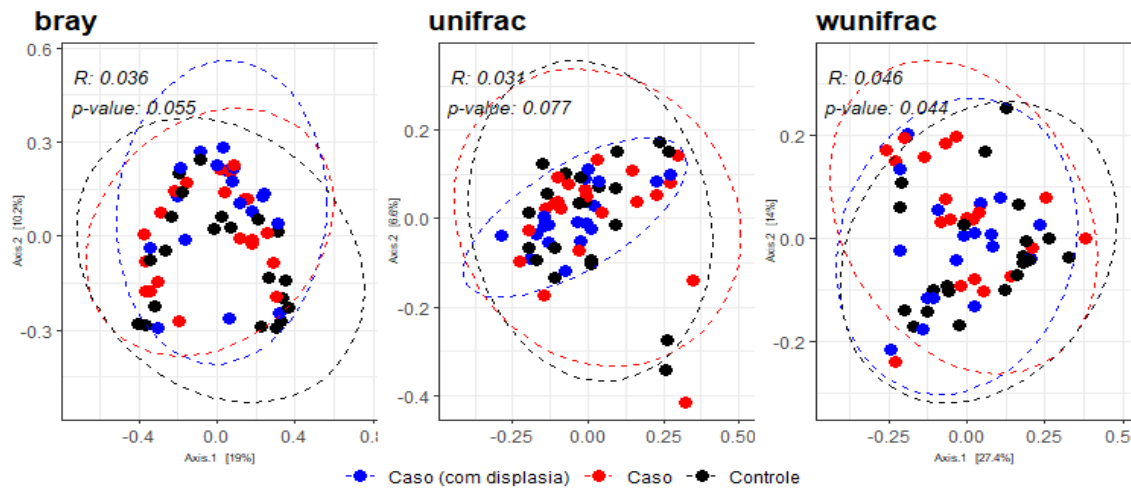


Figura 9 – Diversidade beta entre os grupos caso (com e sem displasia) e controles. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, sendo o R seu coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4.3.4 COMPOSIÇÃO BACTERIANA ENTRE CASOS E CONTROLES

As amostras apresentaram uma composição bacteriana com predomínio de 15 famílias e 17 gêneros dentre aqueles com abundância relativa maior que 10%, mostrando uma variabilidade entre si em ambos os grupos analisados (Figura 10). A família *Streptococcaceae* foi a mais abundante em ambos os grupos, correspondendo a quase 50% das bactérias observadas, seguida das famílias *Pausteurellaceae* e *Micrococcaceae* (Figura 10A). Da mesma maneira, *Streptococcus*, *Rothia* e *Haemophilus* foram os gêneros predominantes (Figura 10B) em ambos os grupos.

Observamos, na figura 11, que das 47 famílias e dos 67 gêneros presentes nas 60 amostras sequenciadas, apenas 14 famílias e 15 gêneros tiveram frequência acima de 1%, indicando que o microbioma oral é dominado por alguns grupos bacterianos. Ambos os grupos estudados têm famílias e gêneros mais abundantes com perfil similar entre si (Figura 11), com exceção das famílias *Carnobacteriaceae* e *Porphyromonadaceae* que apresentavam frequência maior que 1% apenas no grupo caso e as famílias *Beijcrinckiaceae* e *Burkholderiaceae* no grupo controle (Figura 11A). A nível de gênero, o *Streptococcus* foi o mais abundante tanto nos casos quanto nos controles. Observamos os gêneros *Granulicatella* e *Porphyromonas* dentre os mais abundantes apenas no grupo caso e o gênero *Methylobacterium* e *Lautropia*, dentre os mais abundantes apenas no grupo controle (Figura 11B).

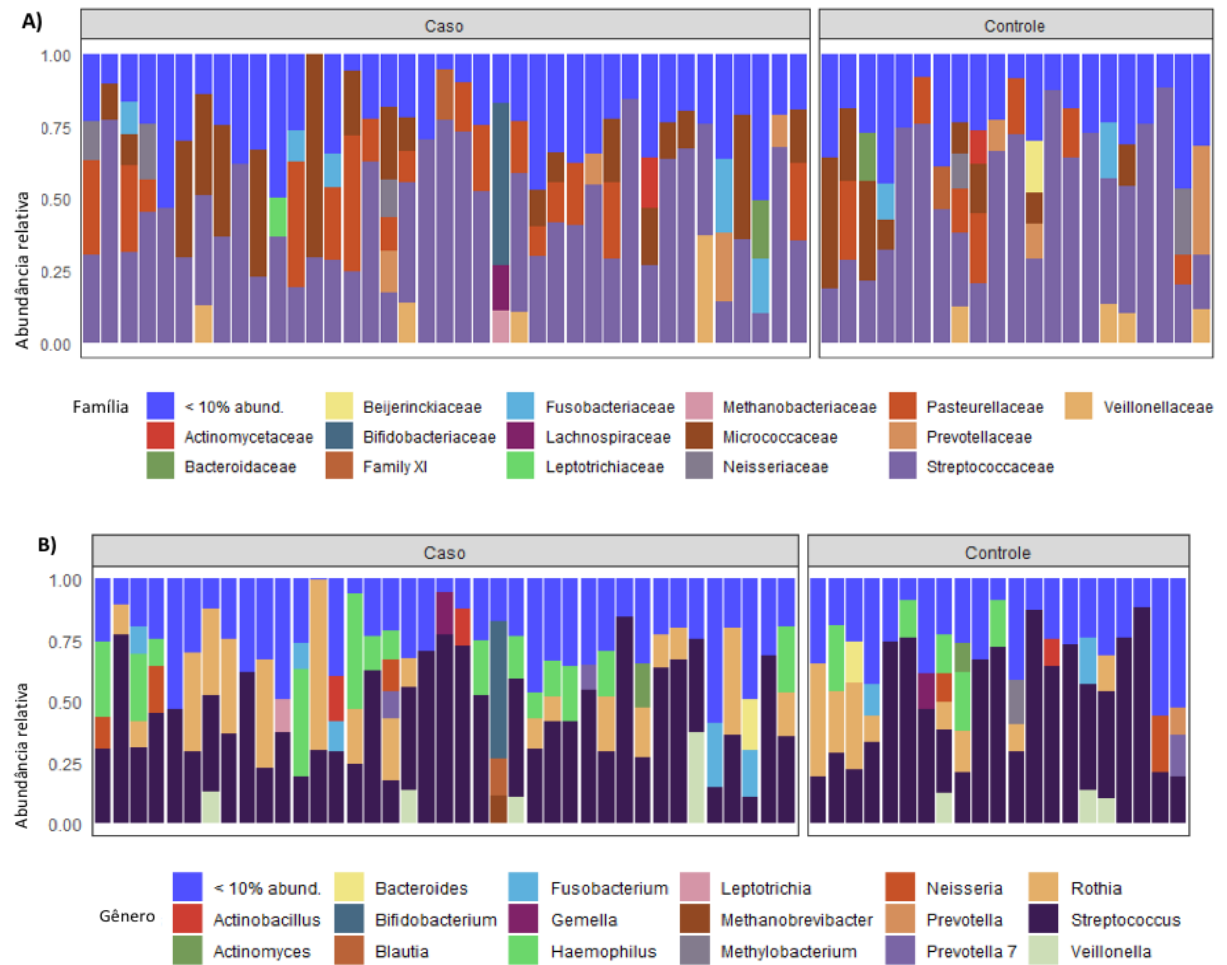


Figura 10 – Abundância relativa das bactérias a nível de família (A) e gênero (B) nas amostras dos casos e controles. Cada coluna representa uma amostra estudada. Somente amostras correspondentes à primeira coleta são apresentadas na figura.

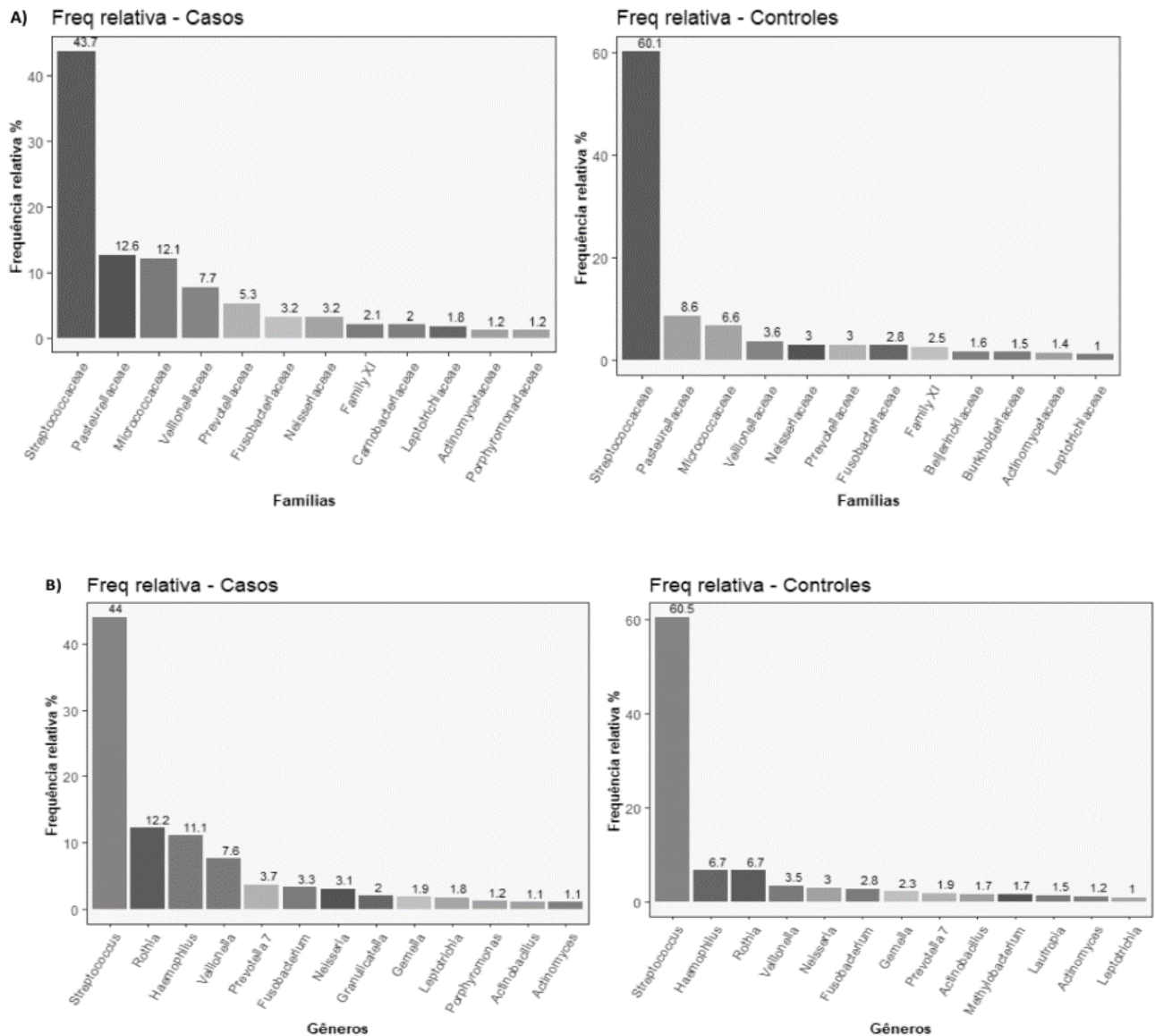


Figura 11 – Frequência relativa das bactérias a nível de família (A) e gênero (B) nas amostras dos casos e controles. Somente bactérias com frequência relativa acima de 1% nas amostras foram apresentadas na figura.

Para melhor diferenciar as composições das amostras do grupo caso, levando em consideração o diagnóstico das LOPM, descrevemos na tabela 8 os 10 gêneros mais abundantes. Não incluímos os outros gêneros na lista por apresentarem uma frequência relativa muito baixa (<1%). De modo geral, observamos que as bactérias mais abundantes e seus valores entre os diferentes diagnósticos foram similares. As amostras de LVP apresentam um perfil diferenciado com relação aos outros diagnósticos, no qual *Capnocytophaga* aparece dentre os mais frequentes, enquanto que os gêneros *Neisseria*, *Prevotella 7* e *Granulicatella* não aparecem dentre os gêneros mais frequentes em LVP.

Tabela 8: Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com o diagnóstico das LOPM e sua abundância relativa.

TOP	Gêneros	Frequência	TOP	Gêneros	Frequência
10		relativa	10		relativa
Líquen plano oral/Lesão liquenóide oral			Leucoplasia Homogênea		
1º	<i>Streptococcus</i>	0,5182	1º	<i>Streptococcus</i>	0,4711
2º	<i>Haemophilus</i>	0,1755	2º	<i>Rothia</i>	0,1057
3º	<i>Rothia</i>	0,0889	3º	<i>Haemophilus</i>	0,0871
4º	<i>Veillonella</i>	0,0374	4º	<i>Neisseria</i>	0,0404
5º	<i>Neisseria</i>	0,0285	5º	<i>Prevotella 7</i>	0,0365
6º	<i>Fusobacterium</i>	0,0262	6º	<i>Gemella</i>	0,0326
7º	<i>Prevotella 7</i>	0,0236	7º	<i>Fusobacterium</i>	0,0309
8º	<i>Gemella</i>	0,0154	8º	<i>Veillonella</i>	0,0293
9º	<i>Porphyromonas</i>	0,0099	9º	<i>Actinobacillus</i>	0,0288
10º	<i>Granulicatella</i>	0,0089	10º	<i>Granulicatella</i>	0,0223
Leucoplasia Verrucosa Proliferativa			Eritroleucoplasia		
1º	<i>Streptococcus</i>	0,5043	1º	<i>Streptococcus</i>	0,2802
2º	<i>Veillonella</i>	0,1008	2º	<i>Rothia</i>	0,2549
3º	<i>Leptotrichia</i>	0,0522	3º	<i>Haemophilus</i>	0,1825
4º	<i>Rothia</i>	0,0491	4º	<i>Fusobacterium</i>	0,0488
5º	<i>Fusobacterium</i>	0,0462	5º	<i>Neisseria</i>	0,0397
6º	<i>Actinobacillus</i>	0,0378	6º	<i>Prevotella 7</i>	0,0262
7º	<i>Gemella</i>	0,0313	7º	<i>Granulicatella</i>	0,0260
8º	<i>Haemophilus</i>	0,0217	8º	<i>Veillonella</i>	0,0229
9º	<i>Prevotella</i>	0,0194	9º	<i>Porphyromonas</i>	0,0210
10º	<i>Capnocytophaga</i>	0,0144	10º	<i>Alloprevotella</i>	0,0165
Eritroplasia					
1º	<i>Streptococcus</i>	0,4379			
2º	<i>Veillonella</i>	0,1269			
3º	<i>Rothia</i>	0,1146			
4º	<i>Haemophilus</i>	0,1008			
5º	<i>Prevotella 7</i>	0,0587			
6º	<i>Neisseria</i>	0,0315			
7º	<i>Granulicatella</i>	0,0289			
8º	<i>Fusobacterium</i>	0,0220			
9º	<i>Gemella</i>	0,0145			
10º	<i>Actinomyces</i>	0,0135			

Ao compararmos estatisticamente as frequências relativas dentre todos os gêneros encontrados em ambos os grupos, e não somente os mais abundantes descritos acima, apenas o gênero *Granulicatella* se mostrou mais abundante de maneira significativa no grupo caso ($p=0,0025$) (Figura 12) enquanto os gêneros *Oribacterium* e *Lautropia* foram menos abundantes nesse grupo ($p= 0,026$ e $p= 0,016$, respectivamente) (Figura 13).

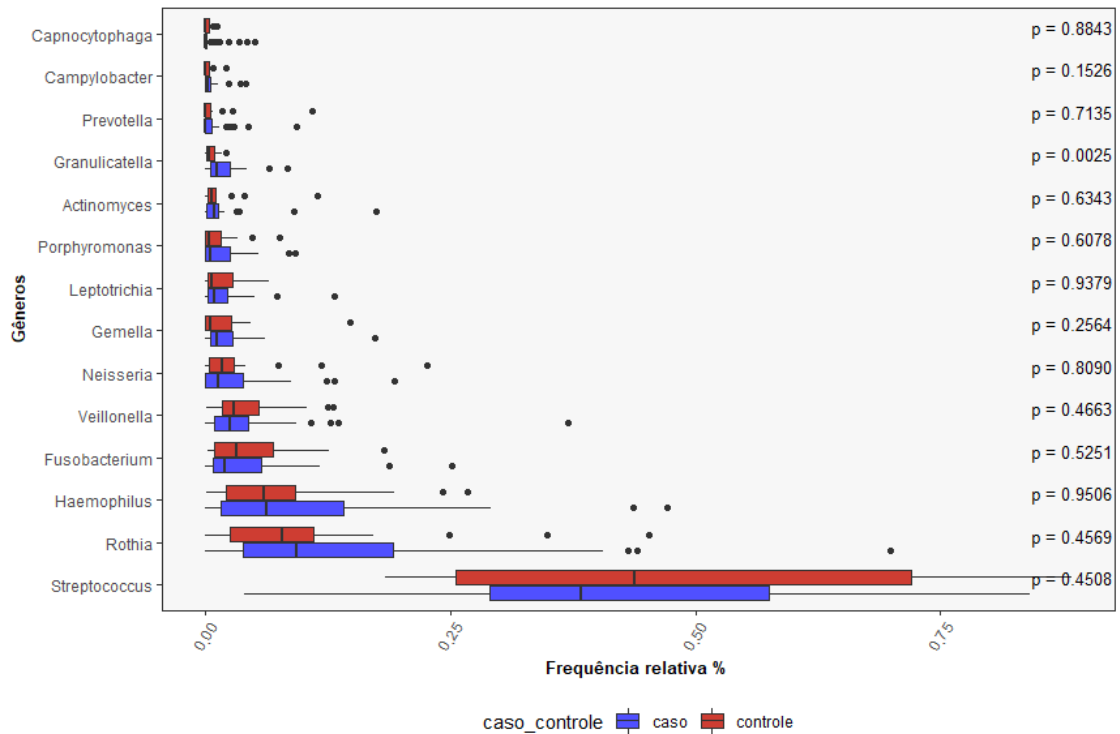


Figura 12 – Análise comparativa da frequência relativa entre os grupos caso e controle. A figura mostra os gêneros mais abundantes identificados em ambos os grupos. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

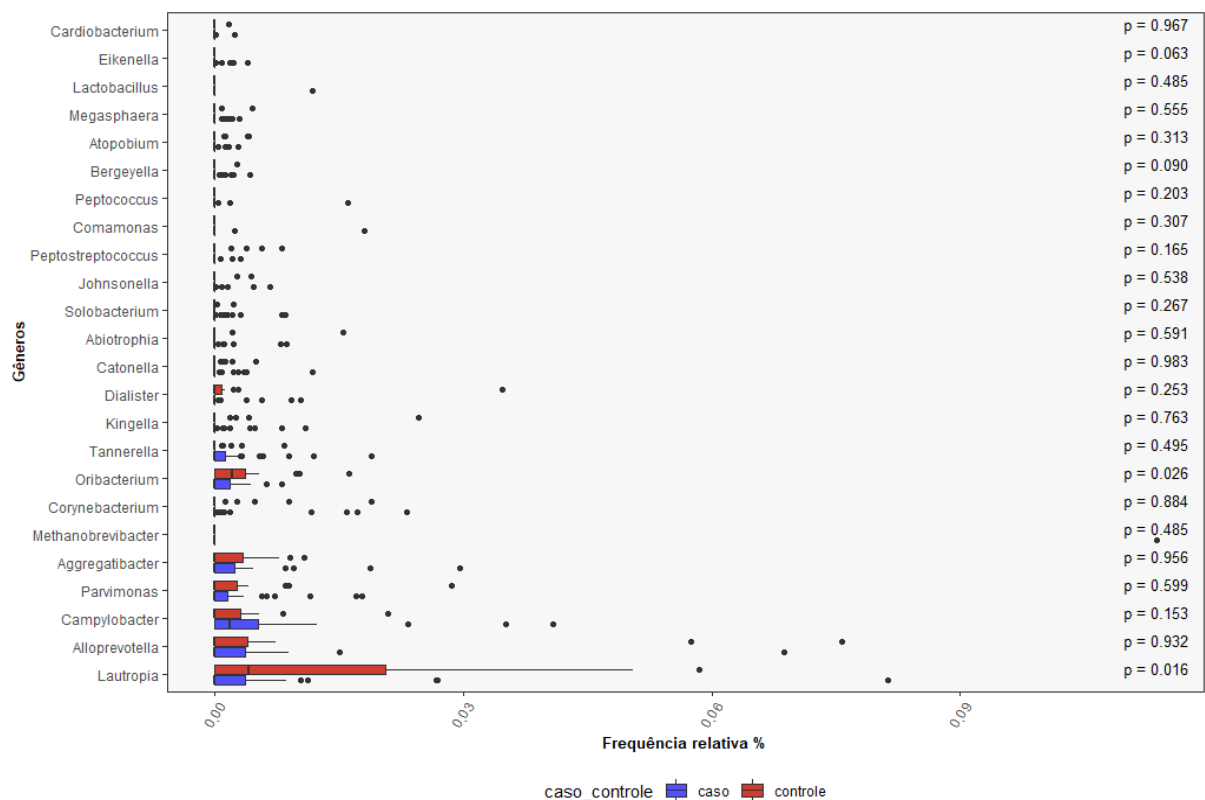


Figura 13 – Análise comparativa da frequência relativa entre os grupos caso e controle. A figura mostra os gêneros menos abundantes identificados em ambos os grupos. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

De maneira geral o gênero *Streptococcus*, embora tenha apresentado uma frequência relativa menor nos casos que nos controles (44% e 60,5%, respectivamente- Figura 11B), foi o gênero mais abundante em ambos os grupos e em todas LOPM, conforme a tabela 8. Estes dados estão de acordo com a literatura, na qual estudos identificaram *Streptococcus* como o gênero mais abundante na cavidade oral de indivíduos saudáveis (Bik et al. 2010; Ahn et al. 2011). As bactérias do gênero *Streptococcus* são características da microbiota oral, sendo a análise quantitativa dessas bactérias indispensável para a compreensão dos processos patológicos (Gao et al. 2018). Outros estudos que compararam o microbioma de amostras de CEC, LOPM e controles saudáveis, observaram uma diminuição na abundância de *Streptococcus* no sentido CEC<LOPM<Controles (Schmidt et al. 2014; Mok et al. 2017 e Hashimoto et al. 2019), indicando uma provável disbiose da microbiota oral relacionada ao CEC e LOPM. Outros estudos também observaram menor frequência relativa de *Streptococcus* nas amostras de leucoplasias e LPO em relação as amostras de controles saudáveis (Hu et al. 2016; Choi et al. 2016; Wang et al. 2016; Amer et al. 2017; He et al. 2017; Du et al. 2020). Adicionalmente, em outro estudo que realizou o sequenciamento do tipo *shotgun*, a frequência relativa de *Streptococcus* não teve diferença significativa entre as LOPM e os tecidos saudáveis dos mesmos pacientes (58,62% e 61,82% respectivamente) (Decsi et al. 2018), indicando que a disbiose relacionada ao CEC e LOPM pode não ser localizada somente no sítio afetado e espera-se que a microbiota oral como um todo esteja sujeita à disbiose nas condições CEC e LOPM. Essas bactérias gram-positivas são componentes importantes da microbiota humana, estando presente em diversos nichos corporais, mas principalmente na cavidade oral (Abranches et al. 2018).

Dentre os demais gêneros mais abundantes, *Rothia* apresentou maior frequência relativa nos casos em relação aos controles (12,2% e 6,7%, respectivamente – Figura 11B). Essas bactérias gram-positivas fazem parte da microbiota normal da cavidade oral e orofaringe, sendo as espécies *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginosa* patógenos oportunistas que podem causar infecções graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Tsuzukibash et al. 2017). Alterações na frequência desse gênero em LOPM foram relatadas previamente. Um estudo observou uma redução de *Rothia* nas amostras de LOPM (leucoplasias e eritroplasias) e CEC em comparação com controles saudáveis (mucosa normal contralateral) (Schmidt et al. 2014), enquanto outros autores relataram um aumento da abundância de *Rothia mucilaginosa* em leucoplasias (amostras também coletadas por

swabs) quando comparada com controles saudáveis, sugerindo que este aumento poderia contribuir para produção de acetaldeído, um carcinógeno produzido a partir da metabolização de etanol, capaz de causar mutações no DNA (Amer et al. 2017). Em achado similar, Decsi et al (2018), relataram *Rothia mucilaginosa* ausente da amostra de tecido saudável e presente, com frequência relativa de 2%, nas amostras de LOPM dos mesmos indivíduos. Vale ressaltarmos, dentre estes estudos, as diferentes regiões de 16S rRNA sequenciadas, sendo V4 (Schmidt et al. 2014), V1-V2 (Amer et al. 2017) e *shotgun* (Decsi et al. 2018), além do uso de diferentes tipos de amostras e diferentes plataformas de sequenciamento, o que confere maior robustez aos achados.

O gênero *Haemophilus* apresentou frequência relativa maior entre os casos, em relação aos controles (11,1% e 6,7%, respectivamente). Um estudo feito com amostras de saliva não estimulada mostrou que *Haemophilus* foi mais abundante no grupo de leucoplasia (1,51%) do que nos grupos de CEC (0,54%) e controles (0,34%) (Hu et al. 2016). Já no estudo de Decsi et al (2018) a espécie *Haemophilus influenzae* foi ligeiramente mais frequente nos controles (1,82%) que no grupo de LOPM (1,38%). Da mesma maneira, o gênero *Porphyromonas* foi mais abundante e encontrado com frequência acima de 1% apenas no grupo caso, tendo abundância relativa de 0,008% nos controles. Outro estudo relatou que *Porphyromonas gingivalis* foi mais abundante nas amostras de CEC e leucoplasias, não sendo encontrada no grupo controle (Hashimoto et al. 2019). Em nosso estudo, este gênero foi o 9º mais abundante nos casos com LPO/LLO, corroborando o estudo de Wang et al (2016), que através de amostras de saliva não estimulada e pelo sequenciamento da região V4 do 16S, *Porphyromonas* apresentou abundância elevada significativa em amostras de LPO do subtipo erosivo.

Com relação ao gênero *Fusobacterium*, a frequência relativa desse gênero no grupo caso foi um pouco maior, mas ainda assim próxima aos controles (3,3% e 2,8%, respectivamente), e esteve presente dentre os 10 gêneros mais abundantes em todos os diagnósticos do grupo caso (Tabela 8). Da mesma maneira, Decsi et al (2018) encontraram uma frequência relativa da espécie *F. nucleatum* de 5,25% em LOPM e 3,64% nos controles, sendo não significativa. Na literatura é sugerida a associação de *Fusobacterium* com CEC (Schmidt et al. 2014; Perera et al. 2018; Su Mun et al. 2021). Além disso, a espécie *Fusobacterium nucleatum* já foi descrita como relevante em diversos tipos tumorais, como tumores colorretais e gástrico (Boehm et al. 2020).

Foi encontrado na literatura apenas um estudo que realizou a análise do microbioma das LPV, através de amostras de biópsias de 10 pacientes com LVP comparando-as com 5 controles saudáveis, por meio do sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S na plataforma *Illumina*. Os gêneros mais frequentes encontrados nos pacientes com LVP corroboram nosso estudo, com exceção dos gêneros *Actinobacillus* e *Capnocytophaga* (3,78% e 1,44%, respectivamente) entre os 10 gêneros mais frequentes em LVP no nosso estudo (Herrerros-Pomares et al. 2021).

Embora tenhamos observado grande similaridade entre a microbiota dos grupos estudados, a seguir realizamos análises visando identificar gêneros bacterianos diferencialmente abundantes entre casos e controles e, portanto, bactérias que sejam potenciais biomarcadoras das LOPM e seu processo de malignização. Para isso, utilizamos os métodos estatísticos LefSe, que considera a abundância relativa bacteriana, e ANCOM-BC, que leva em consideração sua quantificação absoluta nas amostras. O teste LefSe (*Linear discriminant analysis effect size*) é um algoritmo que determina as características dos gêneros mais prováveis de explicar as diferenças entre os dois grupos, utilizando em conjunto testes padrão para estabelecer significância estatística, além de testes adicionais para avaliar a consistência biológica dessas diferenças e o score LDA (análise discriminante linear) para estimar o tamanho do efeito de cada característica diferencialmente abundante (Segata et al. 2011). A fim de aumentar a quantidade de dados e a descoberta de biomarcadores, realizamos também a análise de composições de microbioma com correção de viés (ANCOM-BC) para determinar a abundância absoluta das bactérias diferencialmente abundantes, que corrige vieses induzidos por suas diferenças entre as amostras e modela os dados de abundância absoluta usando regressão Linear (Lin & Peddada 2020).

Ao compararmos casos e controles, identificamos 5 gêneros diferencialmente abundantes por LefSe (Figura 14A, Figura 15), e 3 gêneros na análise por ANCOM-BC (Figura 14B, Figura 15). A análise LefSe identificou os gêneros *Methylobacterium* (média 0,0006 casos e 0,012 controles), *Lautropia* (média 0,004 casos e 0,014 controles) e *Oribacterium* (média 0,001 casos e 0,003 controles) estatisticamente mais abundante nos indivíduos controles. Já os gêneros *Blautia* (média 0,004 casos e 0,001 controles) e *Granulicatella* (média 0,017 casos e 0,005 controles) foram mais abundantes nos casos, considerando o LDA score >3, sendo um achado relevante. O gênero NA8 se refere a uma bactéria ainda não identificada e nomeada

como “NA” pelo banco de dados SILVA, usado para anotação taxonômica das ASVs. Por esse motivo, não a consideramos nas nossas discussões.

Também encontramos uma elevada abundância dos gêneros *Blautia* e *Granulicatella* nos pacientes caso, pela análise de ANCOM-BC, juntamente com o gênero *Bergeyella*, reforçando uma provável importância desses gêneros nas amostras de LOPM. Importante ressaltarmos que o gênero *Blautia*, apesar de ter apresentado maior abundância relativa média no grupo caso, esteve presente em um número maior de amostras do grupo controle, enquanto os gêneros *Lautropia*, *Methylobacterium* e *Oribacterium* não só apresentaram maior frequência relativa média no grupo controle, como também foram identificadas em um número maior de amostras deste grupo, um fator importante ao considerarmos bactérias que sejam relevantes em determinado contexto biológico (Figura 15).

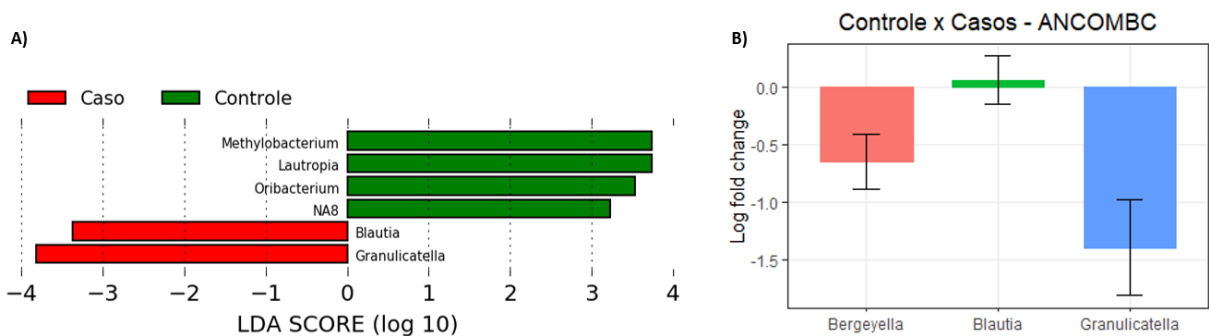


Figura 14 – Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso *versus* grupo controle. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; p<0,05). B) análise por ANCOM-BC.



Figura 15 – Frequência relativa das bactérias diferencialmente abundantes entre os grupos caso e controle identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo e cada coluna no eixo x representa uma amostra testada.

Também buscamos identificar bactérias diferencialmente abundantes entre o grupo de casos com e sem presença de displasia e encontramos uma abundância elevada de *Granulicatella* (LDA>3; média 2,4% caso com displasia e 1% caso sem displasia) nas amostras com ocorrência de displasia (Figura 16A). O gênero *uncultured_bacterium*, que aparece diferencialmente abundante pela análise ANCOM-BC (Figura 16B) se refere, assim como os gêneros nomeadas como NA, a uma bactéria ainda não identificada taxonomicamente e nomeada pelo banco de dados SILVA, então não a consideramos nas nossas discussões.

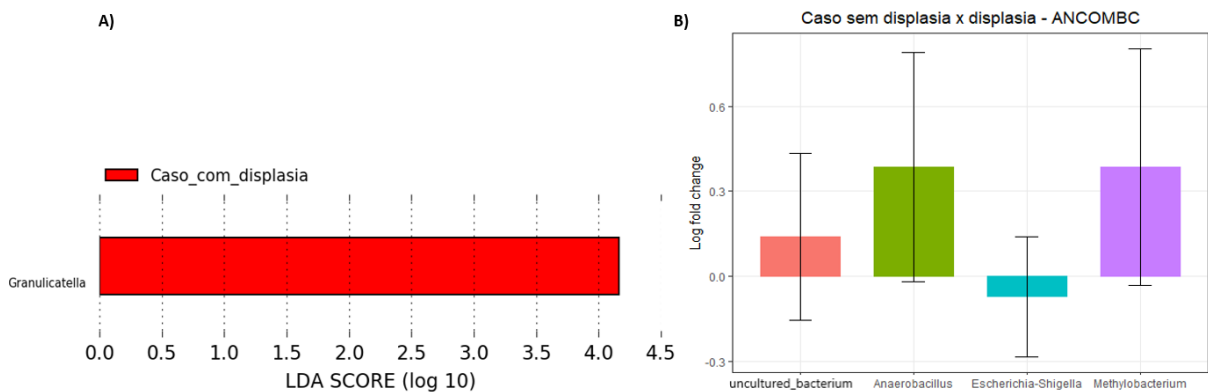


Figura 16 – Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso com displasia *versus* caso sem displasia. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; $p < 0,05$). B) análise por ANCOM-BC.

A abundância relativa de *Anaerobacillus* (média 0,01% caso com displasia e 0,05% caso sem displasia) e *Methylobacterium* (média 0,02% caso com displasia e 0,09% caso sem displasia) se mostra reduzida em casos sem presença de displasia, enquanto o gênero *Escherichia-Shigella* (média 0,2% caso com displasia e 0,03% caso sem displasia) apresentou uma abundância diminuída neste grupo. Esses gêneros, como representado na figura 17, estão presentes em poucas amostras, dificultando a comparação e a compreensão do real papel destes como agentes biológicos relevantes nas LOPM.

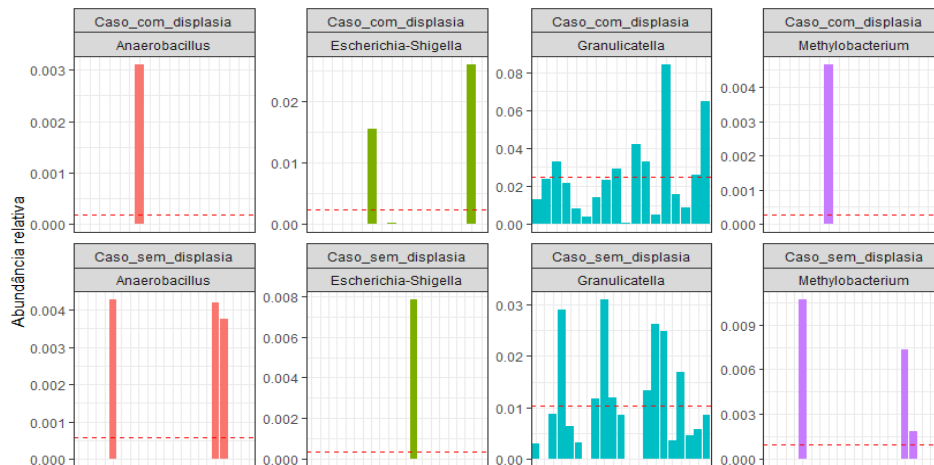


Figura 17 – Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso com displasia *versus* caso sem displasia identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo e cada coluna representa uma amostra testada.

Comparando o grupo caso com displasia e o grupo controle, através da análise LefSe (LDA>3) e ANCOM-BC, observamos novamente um enriquecimento das bactérias do gênero *Bergeyella* (média 0,06% caso com displasia e 0,01% controle) e *Granulicatella* (média 2,4% caso com displasia e 0,5% controle) no grupo caso com displasia e em ambas as análises (Figura 18). Por outro lado, no grupo controle, há um enriquecimento de *Lautropia* (média 0,19% caso com displasia e 1,4% controle), *Methylobacterium* (média 0,02% caso com displasia e 1,2% controle), *Anaerobacillus* (média 0,01% caso com displasia e 0,05% controle), *Bacillus* (média 0,05% caso com displasia e 0,08% controle). Apesar de *Blautia* (média 0,2% caso com displasia e 0,1% controle) ter uma abundância relativa maior na amostra do grupo caso com displasia, este gênero está mais presente em amostras do grupo controle, novamente dificultando o entendimento de seu papel biológico nesse grupo, e reforçando a importância de utilizarmos mais de um método estatístico para identificação de biomarcadores bacterianos relevantes (Figura 19).

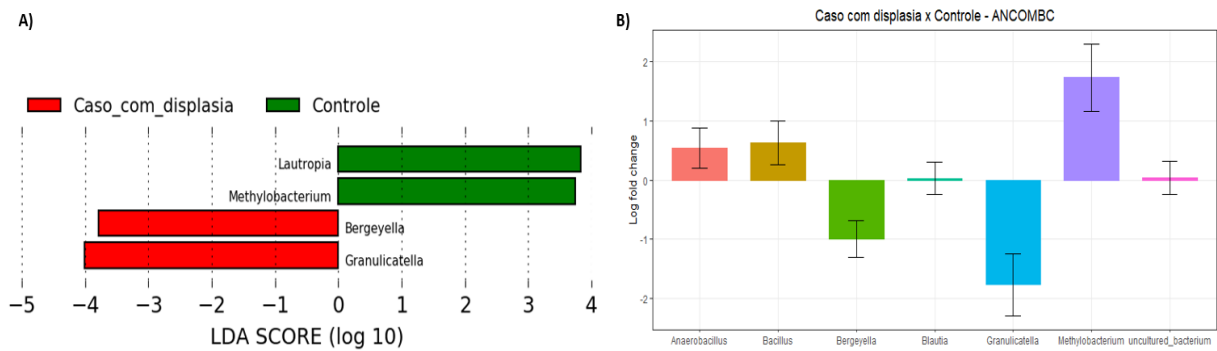


Figura 18 – Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso com displasia *versus* grupo controle. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; $p < 0,05$). B) análise por ANCOM-BC.



Figura 19 – Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso com displasia *versus* controle identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo e cada coluna representa uma amostra testada.

A seguir, quando realizamos a comparação do enriquecimento bacteriano entre os casos sem displasia e controles, na análise LefSe ($LDA > 3$), encontramos enriquecimento dos gêneros *Oribacterium* (média 0,08% caso sem displasia e 0,3% controle) (Figura 20A) e na análise ANCOM-BC (Figura 20B), dos gêneros *Blautia* (frequências médias 0,7% caso sem displasia e 0,1% controle) e *Peptostreptococcus* (média 0,01% caso sem displasia e 0,09% controle) (Figura 21).

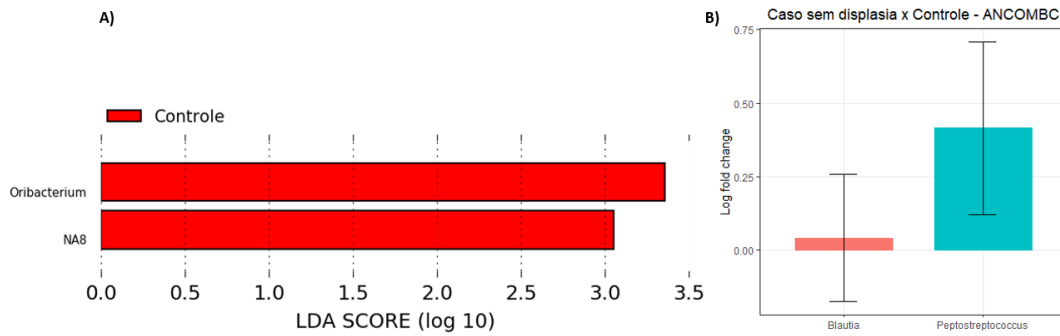


Figura 20 – Diferença da composição microbiana entre as amostras do grupo caso sem displasia *versus* grupo controle. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; p<0,05). B) análise por ANCOM-BC.

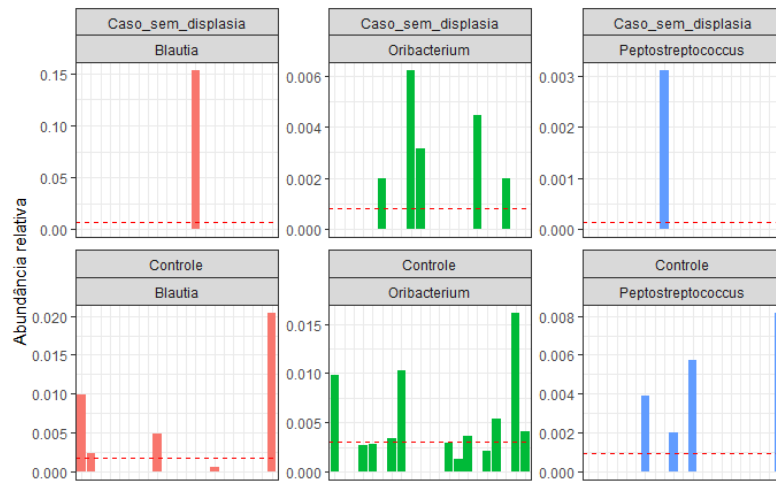


Figura 21 – Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes dos grupos caso sem displasia *versus* grupo controle. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo e cada coluna representa uma amostra testada.

Os pacientes do grupo caso com presença de displasia (média 2,4%) apresentaram um enriquecimento de *Granulicatella* nas análises comparativas com os pacientes sem displasia (média 1%) e com os controles (média 0,5%). O gênero *Granulicatella* é uma bactéria da cavidade oral, já descrito como potencial biomarcador das LOPM, também encontrado diferencialmente abundante nos estudos de Desci et al (2018) e Mok et al (2017) em comparação com a mucosa saudável, amostras de tecido e *swabs*, respectivamente. No estudo de Li et al (2021), *Granulicatella* foi encontrada como biomarcador de displasia em esôfago, enquanto Du et al (2020) relataram maior enriquecimento de *Granulicatella* e *Fusobacterium* em amostras de *swabs* da mucosa de paciente com líquen plano comparado com controles saudáveis, através de sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S.

No nosso estudo, o gênero *Blautia* (média 0,4% casos e 0,1% controles) apresentou um enriquecimento no grupo caso em relação ao grupo controle, mas devemos levar em consideração também a importante observação de que este gênero aparece enriquecido em apenas 2 amostras do grupo caso. É um gênero de bactérias anaeróbicas, presente no microbioma do trato gastrointestinal saudável, sendo dominante na microbiota intestinal e podendo apresentar correlação significativa com disfunções fisiológicas do hospedeiro, como obesidade, diabetes, câncer e diversas doenças inflamatórias (Liu et al. 2021). No estudo de Lee et al (2017), *Blautia* está entre os gêneros com maior abundância nas amostras de saliva não estimulada de LOPM, quando comparado com amostras de saliva não estimulada de CEC e mucosa saudável, por sequenciamento da região V4 do 16S.

O gênero *Methylobacterium* apresentou abundância relativa maior no grupo controle em relação ao grupo caso. Se por um lado a frequência observada foi baixa em ambos os grupos (controles: 1,2%; casos: 0,06%), tal fato não descarta a possibilidade de *Methylobacterium* ter um papel biológico importante. As bactérias do gênero *Methylobacterium* são bacilos gram-negativos fastidiosos já relatados como patógenos oportunistas em humanos, podendo ocasionar infecções em pacientes imunocomprometidos (Lai et al. 2011). Um estudo da disbiose bacteriana e CEC em cavidade oral, utilizando amostras de tecido em áreas de CEC e como controle área adjacente clinicamente saudável, pelo sequenciamento da região V4 do 16S, também encontrou *Methylobacterium*, juntamente com os gêneros *Blautia* e *Anaerobacillus*, significativamente diminuídas nas lesões de CEC em relação aos controles (Sarkar et al. 2021).

Nos nossos dados, o gênero *Oribacterium* teve uma redução de abundância no grupo caso sem displasia em relação ao grupo controle (média 0,08% caso sem displasia e 0,3% controle). Enquanto no estudo de Yu et al (2020) foi observado uma abundância maior do gênero *Oribacterium* em amostras de saliva de pacientes com LPO em relação aos controles saudáveis através de sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA, neste estudo os níveis de *Abiotrophia*, *Eikenella*, *Aggregatibacter*, *Bacteroides*, *Neisseria* e *Ezakiella* foram menores no LPO. Dentre esses gêneros mencionados apenas o gênero *Neisseria* apresenta uma frequência relativa maior no grupo caso em relação ao grupo controle, mas não apresentaram diferenças estatísticas de abundância em nosso estudo. Em outro estudo de Herreros-Pomares et al (2021) ao analisarem a disbiose oral em amostras de tecido de LVP comparando com controles saudáveis, através do sequenciamento das regiões V3-V4, também foi

observado um enriquecimento de *Oribacterium* nas amostras de LVP, entretanto dos 10 pacientes com LVP, 8 apresentavam displasia epitelial enquanto no nosso estudo, tivemos no grupo caso sem displasia apenas 2 pacientes com diagnóstico de LVP.

O gênero *Lautropia* apresentou redução da abundância no grupo caso em relação aos controles (média 0,4% casos e 1,4% controles), sendo esta diferença maior dos casos com displasia em relação ao grupo controle (média 0,19% caso com displasia e 1,4% controle). No estudo de Amer et al (2017), a espécie *Lautropia mirabilis* diminuíram nas leucoplasias orais em comparação com os controles saudáveis. Já em outro estudo, He et al (2017) relataram um aumento significativo de *Lautropia* em pacientes com LPO, correlacionando com uma disfunção imunológica local do LPO.

Já o gênero *Bergeyella* apresentou maior abundância relativa no grupo caso com displasia versus controle nas duas análises (LefSe e ANCOM-BC), entretanto podemos observar na figura 18, que a abundância relativa deste gênero é muito baixa em ambos os grupos (média 0,06% no grupo LOPM com displasia e 0,01% no grupo controle). Este gênero é descrito como habitante da microbiota oral saudável (Bik et al. 2010; Esberg et al. 2022). A espécie *Bergeyella cardium* é descrita como um dos novos patógenos relacionados à endocardite infecciosa (Guo et al. 2018; Mulliken et al. 2019) e ainda não foi descrito como diferencialmente abundante nos estudos relacionados a LOPM.

4.4. ANÁLISE MICROBIANA COM RELAÇÃO AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO DOS CASOS E OCORRÊNCIA DE MALIGNIZAÇÃO

4.4.1 DADOS CLÍNICOS RELACIONADOS A OCORRÊNCIA DE MALIGNIZAÇÃO

Diante da presença de transformação maligna das LOPM, realizamos análise da composição bacteriana com relação ao diagnóstico clínico dos casos e ocorrência de malignização. Além da coleta ao diagnóstico da LOPM, realizamos o acompanhamento longitudinal dos pacientes, com a finalidade de observarmos a ocorrência ou não de transformação maligna. Importante salientarmos que esta coleta e sequenciamento foi realizado antes que a mesma tivesse passado por uma transformação maligna.

Com isso, em nosso estudo, dos 39 participantes com LOPM, dez pacientes (25,6%) tiveram ocorrência transformação maligna da LOPM em CEC, sendo a mediana do tempo de acompanhamento até a transformação maligna foi de 16,23 meses (variando de 6,86 - 41,5 meses). Com relação ao diagnóstico das LOPM a maior parte era formada por

eritroleucoplasias (7/10), seguido de LVP (2/10) e um indivíduo (1/10) com leucoplasia homogênea. Estes dados estão de acordo com a literatura, onde lesões não homogêneas como as eritroleucoplasias têm maior risco de transformação maligna quando comparadas com lesões homogêneas (Speight et al 2018; Aguirre et al 2021). Em nosso estudo, nenhum paciente com diagnóstico clínico de LPO/LLO sofreu transformação maligna. Dos pacientes que tiveram transformação maligna, cinco pacientes já tiveram diagnóstico anterior de câncer de boca. Quanto ao estadiamento, nove pacientes tiveram estadiamento patológico T1, apenas um paciente teve estadiamento patológico T2 e nenhum paciente teve comprometimento linfonodal. Todos os pacientes foram tratados com cirurgia e apenas um paciente realizou radioterapia em região de cabeça e pescoço após a cirurgia.

A transformação maligna ocorreu em sete mulheres e três homens e prevaleceu nos pacientes não tabagistas e etilistas, entretanto estas variáveis não foram estatisticamente significantes. Em uma metanálise recente, as mulheres mostraram um risco 1,65 (IC 95%: 1,38 – 1,97; $p < 0,001$) vezes maior de transformação que homens e os hábitos de tabagismo e etilismo foram investigados em 16 estudos, dos quais 42,4% deles eram tabagistas e 26,3% estilistas (Aguirre et al. 2021). Outra revisão sistemática mostrou o risco de transformação de 13,1% para mulheres e 1,7% para homens (Warnakulasuriya e Ariyawardana 2016). Contudo, ainda não está claro porque as mulheres têm essa maior predisposição à transformação maligna em comparação com os homens. Em pacientes não tabagistas existe associação de maior taxa de transformação maligna em LO, sugerindo que não tabagistas podem ter uma predisposição para transformação maligna (Speight et al. 2018; Aguirre et al. 2021).

Em nossos dados, a presença de displasia epitelial oral foi um fator de risco estatisticamente significativo ($p=0,02$) para a transformação maligna (tabela 9). Ao menos oito pacientes apresentaram displasia epitelial, sendo 4 com displasia epitelial leve e 4 com displasia epitelial moderada, de acordo com o consenso da literatura, onde displasia epitelial é um fator de risco para transformação maligna e a presença de displasia epitelial representa um risco de transformação é até 23,8 vezes maior (Aguirre et al. 2021). Outra revisão sistemática mostrou que a displasia moderada/grave é associada a um risco maior de transformação maligna comparado à displasia leve com OR de 2,4 (IC 99% 1,5-3,8) (Iocca et al. 2019). Em estudo retrospectivo de coorte com 1401 pacientes, 49 (3,5%) desenvolveram CEC em cavidade oral durante um período de 5 a 15 anos, com taxa de transformação das lesões sem displasia de 0,012% (14/1182 pacientes) comparada com 6% (6/105), 18% (14/76)

e 39% (15/38), para displasia leve, moderada e intensa, respectivamente (Sperandio et al. 2013).

Tabela 9: Análise da transformação maligna em relação aos fatores de risco dos pacientes caso.

Variáveis	Transformação maligna					
	Ausente	Presente	Valor de p	Ratio	Ratio	
	N (%)	N (%)		RR	Odds	
Sexo	Masculino	9 (31,04)	3 (70)	0,9	1,01 (0,68-1,50)	1,05 (0,22-5,02)
	Feminino	20 (68,96)	7 (30)			
Tabagismo	Não tabagista	14 (48,27)	8 (80)	0,19	NA	NA
	Tabagista	4 (13,8)	1 (10)			
	Ex-tabagista	11 (37,93)	1 (10)			
Etilismo	Não etilista	12 (41,4)	1 (10)	0,15	1.41 (1.02, 1.95)	6.35 (0.71, 57.00)
	Etilista	17 (58,6)	9 (90)			
Displasia epitelial	Ausente	20 (69)	2 (20)	0,02*	1.72 (1.08, 2.74)	8.89 (1.56, 50.53)
	Presente	9 (31)	8 (80)			

Legenda: teste de Qui-quadrado; RR: risco relativo; NA: não se aplica; *: valor de p estatisticamente significativo; A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4.4.2 COMPOSIÇÃO BACTERIANA E ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÊNEROS EM RELAÇÃO A OCORRÊNCIA DE MALIGNIZAÇÃO

Com relação à diversidade alfa, nos dois índices métricos analisados, *Observed* ($p=0,28$) e *Shannon* ($p=0,23$), não observamos diferenças estatisticamente significativas na diversidade bacteriana entre as amostras que tiveram ou não ocorrência de malignização posteriormente (Figura 22). Da mesma maneira, ao avaliarmos a diversidade beta, também não observamos diferenças na composição bacteriana entre as amostras dos dois grupos (Figura 23).

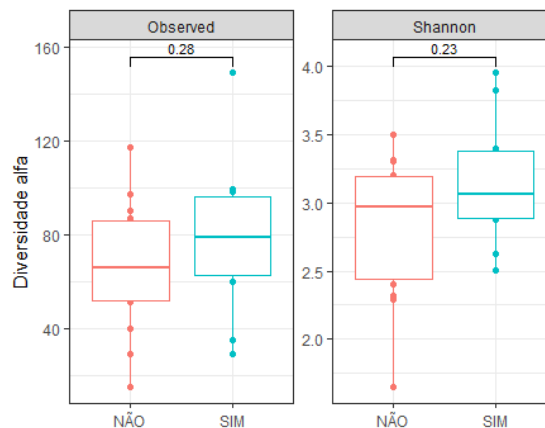


Figura 22 – Diversidade alfa em relação a ocorrência ou não de malignização. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência e diferença significativa entre a ocorrência ou não de malignização. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

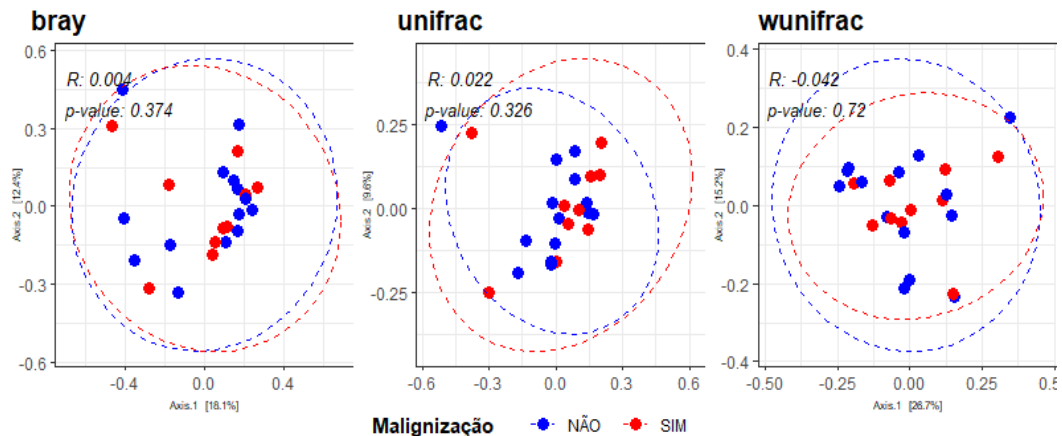


Figura 23 – Diversidade beta em relação a ocorrência ou não de malignização. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, sendo o R seu coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Realizamos ainda a comparação da composição bacteriana das LOPM ao diagnóstico, baseado na ocorrência a posterior malignização no decorrer do estudo. Conforme a figura 24, observamos uma discreta diferença na composição inicial das LOPM que malignizaram em relação às demais que permaneceram como LOPM, com uma predominância de alguns gêneros bacterianos, incluindo uma menor abundância de *Streptococcus* e maior presença de *Fusobacterium* e nas amostras de pacientes que posteriormente sofreram malignização.

Com o intuito de evitarmos possíveis vieses, na figura 25 mostramos a abundância relativa dos gêneros encontrados somente nos diagnósticos de LOPM que sofreram malignização (eritroleucoplasia, leucoplasia e LVP), comparando as amostras que malignizaram com aqueles que permaneceram como LOPM. Observamos então que os gêneros *Capnocytophaga* ($p=0,039$), *Prevotella* ($p=0,019$) e *Prevotella 2* ($p=0,037$) têm um enriquecimento estatisticamente significativo nas amostras de pacientes que viriam a sofrer malignização. Os gêneros *Porphyromonas* ($p=0,49$), *Fusobacterium* ($p=0,15$), *Granulicatella* ($p=0,12$), *Prevotella 7* ($p=0,056$) e *Rothia* ($p=0,54$), também se apresentaram mais abundantes nas amostras que malignizaram, sendo essa diferença não estatisticamente significativa.

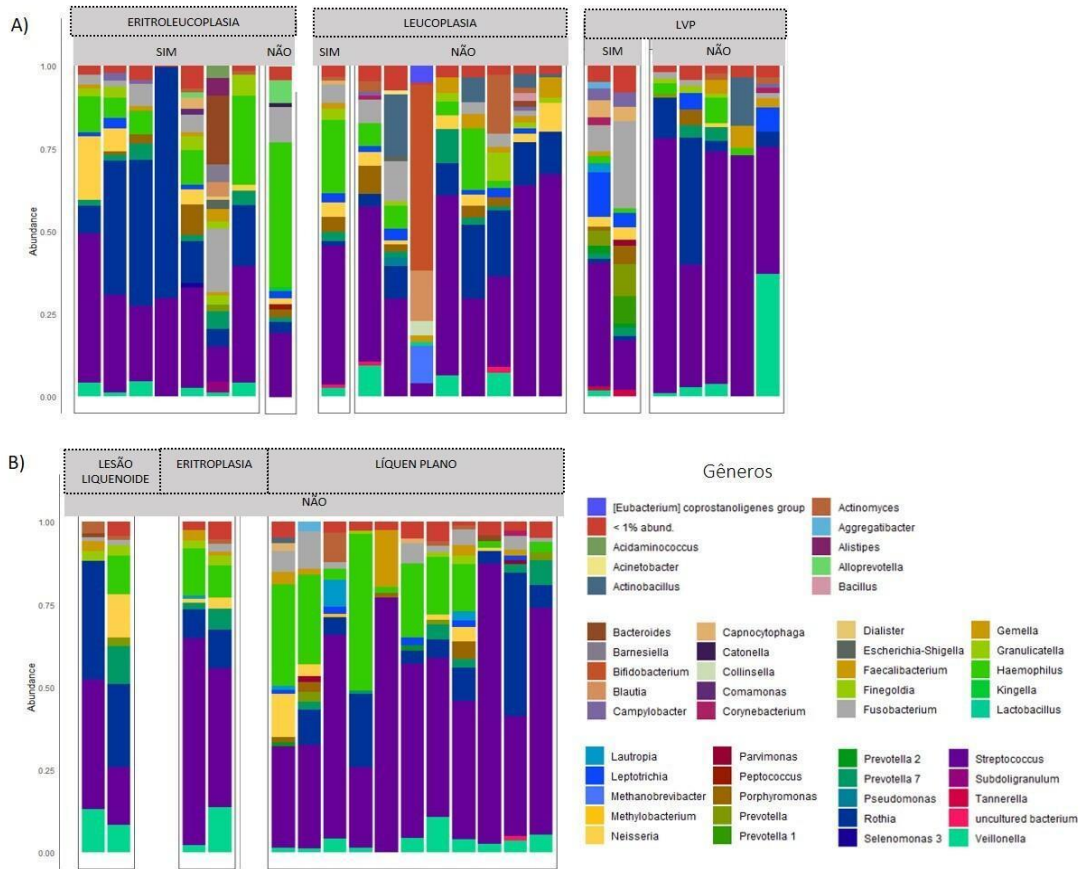


Figura 24 – Abundância relativa dos gêneros bacterianos de acordo com diagnóstico das LOPM (A, B) e ocorrência ou não de malignização. Os gêneros que representam menos de 1% da frequência relativa total foram agrupados para melhor visualização. Cada coluna representa uma amostra estudada. Somente amostras correspondentes à primeira coleta são apresentadas na figura.

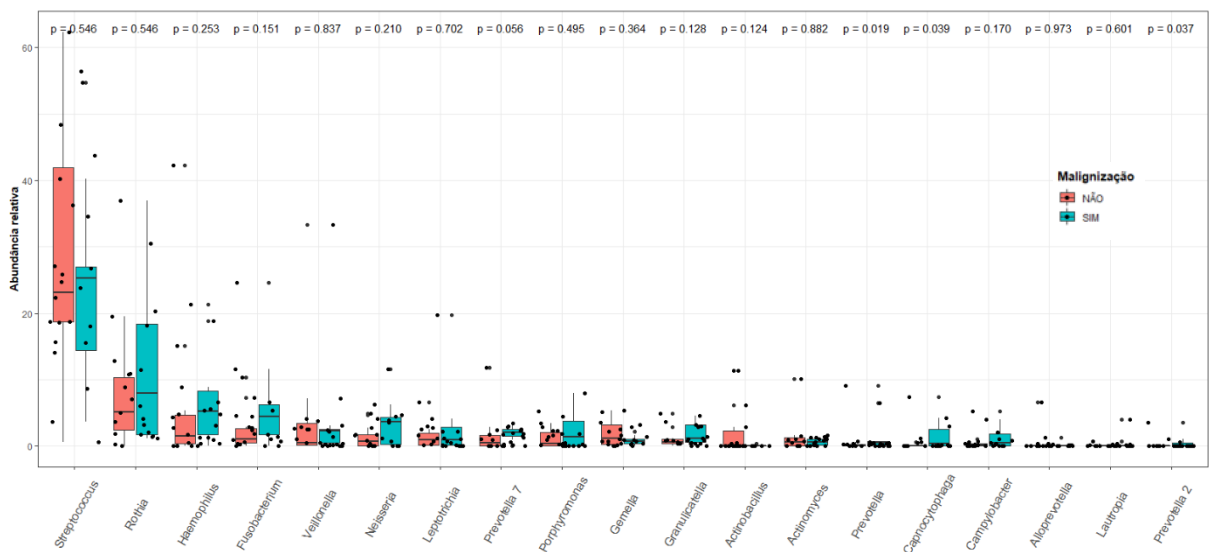


Figura 25 – Identificação dos gêneros em relação as amostras que malignizaram ou não. Foi considerado somente os mesmo diagnósticos e gêneros com frequência relativa acima de 1%. Teste não paramétrico de Wilcoxon. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

Também comparamos as amostras do grupo caso que tiveram ocorrência de malignização ou não, levando em consideração apenas os pacientes com o mesmo diagnóstico, através da análise LefSe (LDA>3) e ANCOM-BC. Apenas o gênero *Prevotella 2* foi diferencialmente abundante em ambas análises, com enriquecimento nas amostras que malignizaram. Observamos os gêneros *Captocytophaga*, *Prevotella* e *Prevotella 2* diferencialmente abundantes pela análise LefSe (Figura 26). Através da análise ANCOM-BC, os gêneros diferencialmente abundantes foram *Bacteroides*, *Finogoldia*, *Paracoccus* (média 0,0% sim e 0,07% não), *Solobacterium* (média 0,088% sim e 0,085% não) e também o gênero *Prevotella 2* (Figura 27).

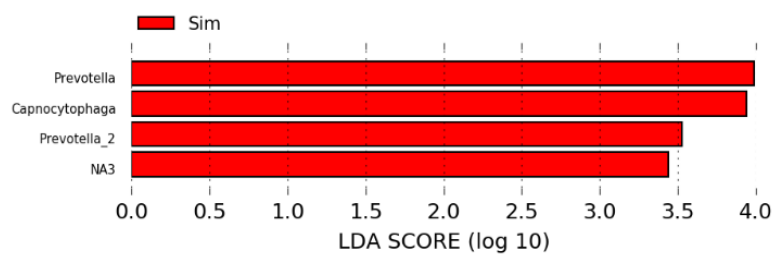


Figura 26 – Identificação de gêneros bacterianos diferencialmente abundantes pela análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; $p < 0,05$) entre amostras que sofreram ocorrência de malignização ou não.

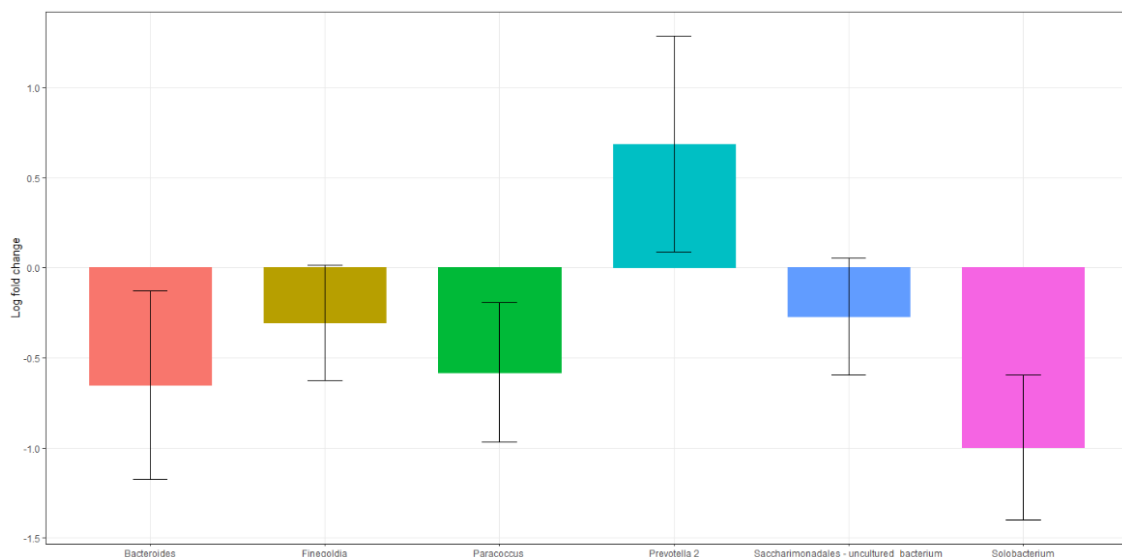


Figura 27 – Identificação de gêneros bacterianos diferencialmente abundantes pelo método ANCOM-BC entre amostras que sofreram ocorrência de malignização ou não. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo e cada coluna representa uma amostra testada.

Observamos ainda um enriquecimento dos gêneros *Bacteroides* (média 2% sim e 0,02% não), *Capnocytophaga* (média 1,4% sim e 0,008% não), *Finegoldia* (média 0,2% sim e 0,004% não), *Prevotella* (média 1,8% sim e 0,01% não) e *Prevotella 2* (média 0,41% sim e 0,0% não) nas amostras que tiveram ocorrência de malignização (Figura 28). No entanto, os gêneros *Finegoldia* e *Bacteroides* estiveram presentes em menor abundância em duas amostras que não malignizaram e em maior abundância em apenas uma amostra que teve ocorrência de malignização. Os gêneros *Paracoccus* não foi identificado nas amostras que sofreram malignização e *Prevotella 2* naquelas que não sofreram malignização.

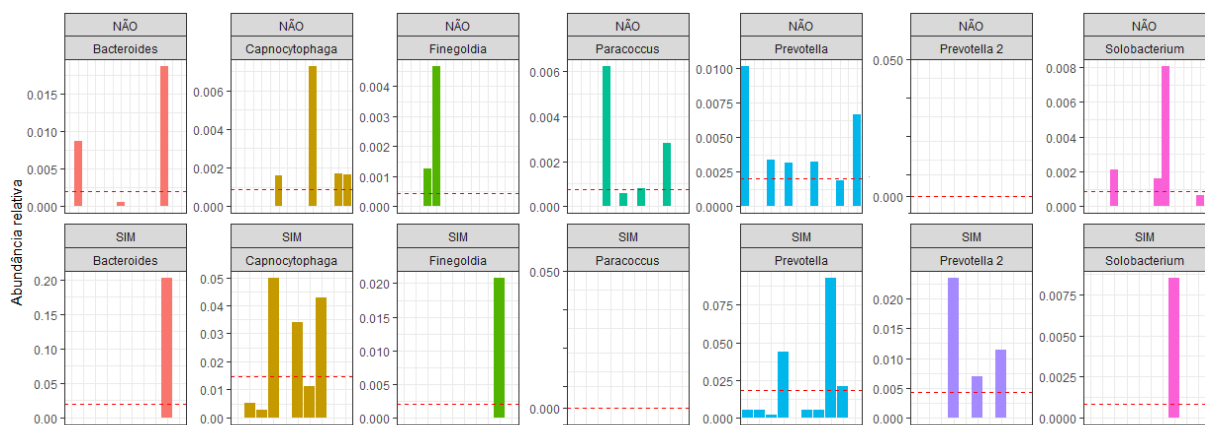


Figura 28 – Frequência relativa das bactérias diferencialmente abundantes entre a ocorrência de malignização ou não identificadas pelos métodos LefSe e ANCOM-BC. A linha pontilhada vermelha se refere à média da frequência relativa observada para o gênero em cada grupo.

Estes resultados indicam que a microbiota das LOPM nos indivíduos que sofrerão malignização apresentam alterações que podem preceder o desenvolvimento de neoplasias orais e que esta disbiose possa está relacionada com a transformação maligna das lesões. Alguns estudos de análise de microbioma de CEC também relataram que o gênero *Streptococcus* foi mais abundante em controles saudáveis (Schmidt et al. 2014; Mok et al. 2017; Decsi et al. 2018), e que os gêneros *Fusobacterium* e *Prevotella* foram mais abundantes em pacientes com CEC (Al-Hebshi et al. 2017; Hsiao et al. 2018; Perera et al. 2018). Equanto isso, o gênero *Capnocytophaga*, juntamente com os gêneros *Pseudomonas* e *Atopobium* também se mostraram enriquecidos em amostras de biopsias pacientes com CEC em estudo anterior, que sequenciou as regiões V1-V3 do 16S, entretanto os mesmos foram comparados com amostras de pólipos fibroepiteliais em outros pacientes controles (Perera et al. 2018).

4.5 COMPOSIÇÃO BACTERIANA E ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÊNEROS EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES MOMENTOS DE COLETAS

Após aproximadamente um ano de acompanhamento dos pacientes com LOPM, realizamos uma segunda coleta de *swabs*, com a finalidade de observar a ocorrência de alterações microbianas em diferentes momentos. A pandemia de COVID-19 dificultou a realização desta etapa do estudo, pois muitos pacientes não retornaram para o seguimento. Também vale ressaltar que no presente estudo 10 pacientes tiveram transformação das LOPM em CEC, dos quais em 4 pacientes a lesão teve transformação maligna antes do período de um ano de seguimento.

Dos 39 pacientes do grupo caso, a segunda coleta foi realizada em 13 pacientes. Com relação ao diagnóstico dos pacientes que tiveram momento 2 de coleta, a maior parte era LVP (5/13), seguido por leucoplasia homogênea (3/13) e eritroleucoplasia (3/13), eritroplasia (1/13) e líquen plano oral (1/13). Na tabela 10 correlacionamos o diagnóstico anatomopatológico dos pacientes, de acordo com a presença de displasia. Do qual 3/13 pacientes tiveram diagnóstico de CEC que anteriormente era displasia leve, 3/13 pacientes não realizaram biópsia neste momento 2 apenas acompanhamento.

Tabela 10: diagnóstico histopatológico com relação aos diferentes momentos da coleta.

Momento 1	Momento 2					total
	Sem biópsia	Sem displasia	leve	moderada	CEC	
Sem displasia	1	2	0	0	0	3
Leve	2	2	1	1	3	9
Intensa	0	1	0	0	0	1
Total	3	5	1	1	3	13

Legenda: (CEC): carcinoma espinocelular oral.

Também avaliamos a diversidade alfa entre os momentos de coletas, com os índices *Observed* e *Shannon*, do qual observamos uma diversidade alfa semelhante e sem diferença estatisticamente significativa entre os momentos de coletas (Figura 29).

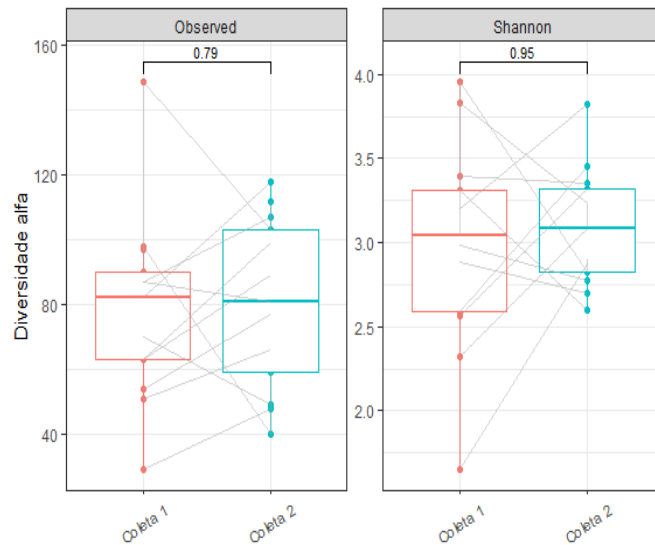


Figura 29 – Diversidade alfa em relação aos momentos de coletas 1 e 2. Teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência e diferença significativa entre os grupos. A diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. As linhas conectam os valores de diversidade alfa para cada indivíduo nos dois momentos.

Na análise de diversidade beta por meio do método de redução de dimensionalidade PCoA entre os dois momentos de coleta também não observamos diferença significativa na composição bacteriana entre os diferentes momentos das coletas, em todos os índices avaliados (Figura 30), o que sugere que as abundâncias e as distâncias filogenéticas entre as bactérias são semelhantes entre os momentos de coleta.

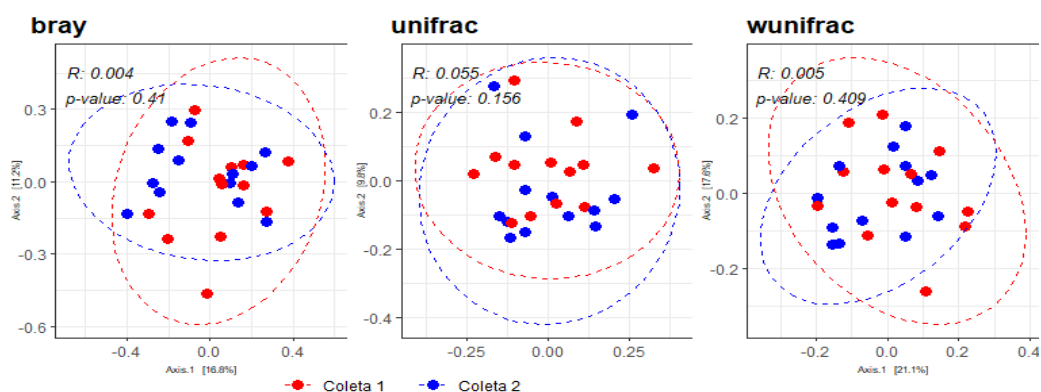


Figura 30 – Diversidade beta entre os momentos de coleta 1 e 2. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras, sendo o R seu coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Não observamos uma variabilidade significativa na composição bacteriana entre cada amostra quando comparadas individualmente nos dois momentos (Figura 31). No entanto, de

maneira geral, observamos um aumento na abundância de *Neisseria* e *Rothia* na coleta 2. O gênero *Veillonella* que aparecia em abundância maior que 5% em apenas uma amostra da coleta 1, na coleta 2 aparece em abundância em 3 amostras. O gênero *Capnocytophaga* apresenta aumento da abundância na coleta 2.

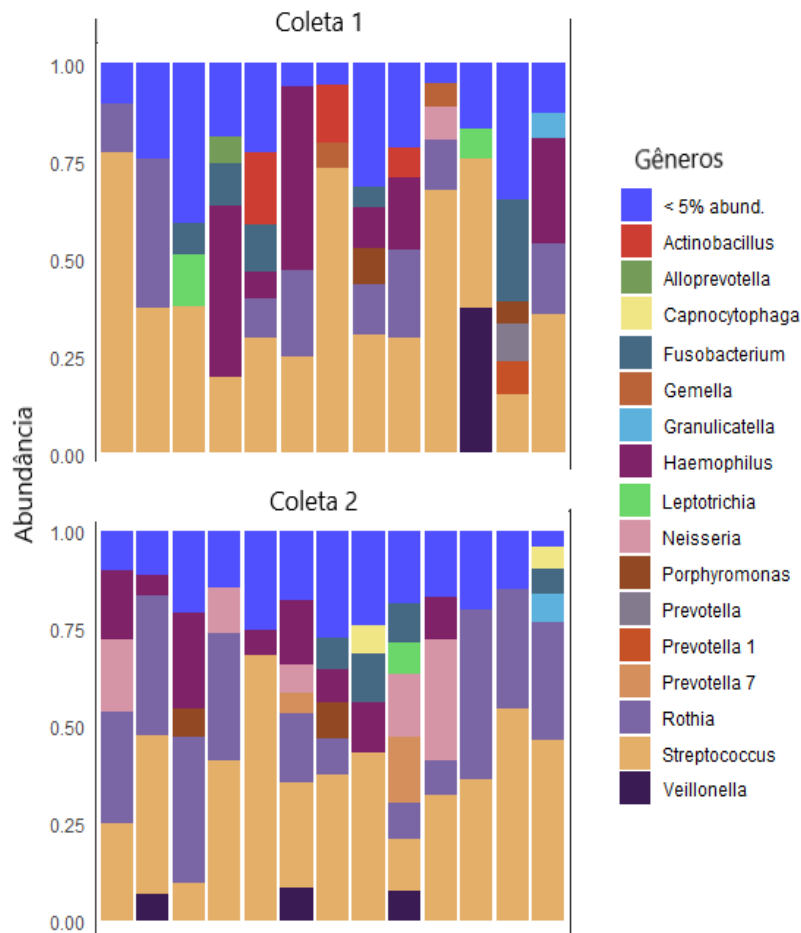


Figura 31 – Abundância relativa bacteriana, a nível de gênero, entre os momentos de coletas 1 e 2 (um ano após a primeira coleta). Cada coluna representa a composição bacteriana de um indivíduo.

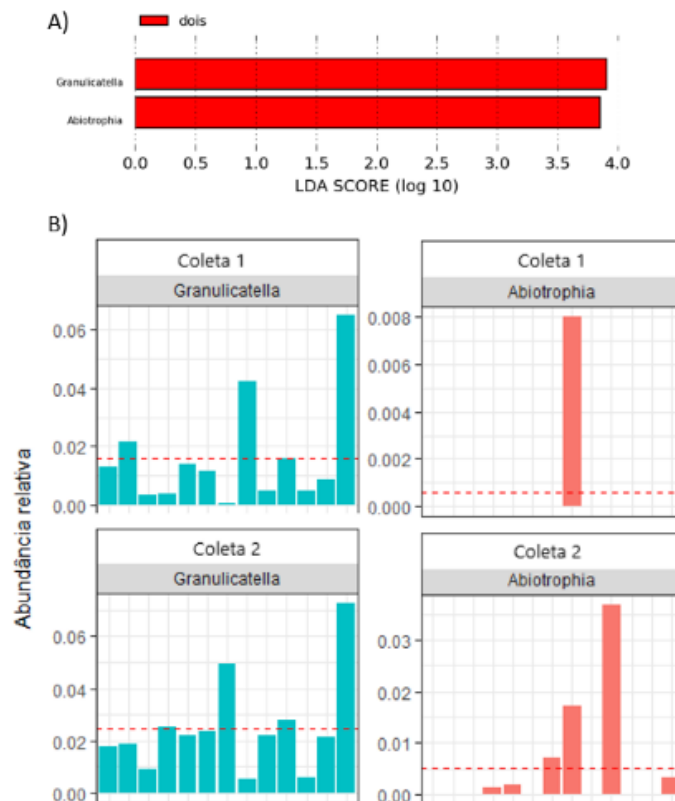


Figura 32 – Diferença da composição microbiana entre as amostras nos diferentes momentos da coleta, coleta 1 e coleta 2. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, LDA>3; $p < 0,05$). B) Comparativo das abundâncias relativas dos gêneros relevantes nos diferentes momentos da coleta.

No estudo de Amer et al (2017), foi observado um aparente aumento da abundância do gênero *Rothia* em leucoplasias orais, mas abundância reduzida em lesões de CEC, indicando um possível papel no estabelecimento precoce desta neoplasia. No nosso estudo, embora tenhamos observado maior abundância de *Rothia* no segundo momento de coleta, essa bactéria não apresentou diferença significativa pelas análises de LefSe, como mostrada na Figura 32.

Também realizamos a comparação do enriquecimento bacteriano entre os dois momentos de coleta, pelas análises LefSe e ANCOM-BC. Da qual, na análise LefSe (LDA >3) observamos uma abundância relativa maior dos gêneros *Granulicatella* (média 0,02% sim e 0,09% não) e *Abiotrophia* (média 0,02% sim e 0,09% não) na coleta 2. Já na análise ANCOM-BC nenhuma bactéria foi encontrada diferencialmente abundante. Na figura 30B é possível observar que na coleta 2 o gênero *Abiotrophia* teve um enriquecimento em abundância relativa e em números de amostras. *Granulicatella* também apresentou abundância

diferencialmente significativa entre os grupos caso e controle e enriquecida nas amostras que tiveram transformação maligna. Como já descrito, este gênero apresentou enriquecido em amostras de LOPM em outros estudos (Mok et al. 2017; Decsi et al. 2018), entretanto não sabemos qual atuação deste gênero bacteriano no processo de malignização.

4.6. ANÁLISE DA CAPACIDADE FUNCIONAL ENTRE CASOS E CONTROLES – ANÁLISE PICRUST

Realizamos análises das vias metabólicas bacterianas enriquecidas ou diminuídas nos dois grupos estudados através do algoritmo de investigação filogenética de comunidades por reconstrução de estados não observados, PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). As vias foram inferidas com base nas informações das sequências obtidas do gene 16S rRNA, e as diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas usando o método LefSe. Essa abordagem foi realizada pois o sequenciamento do gene alvo (16S rRNA) não permite inferir de modo direto a capacidade funcional da microbiota avaliada. Assim, este método infere, a partir dos táxons identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e de seus genomas disponíveis em bancos de dados públicos, quais os genes e conseqüentemente, as vias metabólicas associadas com cada um dos táxons identificados nas amostras do estudo (Langille et al. 2013), partindo do pressuposto de que o encontro de uma bactéria com um dado gene em seu genoma sugere que tal gene se encontra ativamente transcrito no tecido e nas condições avaliadas.

Um total de 430 vias metabólicas foram anotadas. Na tabela 11 observamos as 10 vias metabólicas com maior abundância relativa. De maneira geral, não encontramos diferenças significativas na abundância das vias metabólicas anotadas em ambos os grupos, com frequências similares entre eles. As vias preditas mais abundantes se mostraram envolvidas com uma série de vias de biossíntese, como aquelas para biossíntese de nucleosídeos e nucleotídeos, ácidos graxos e lipídios, compostos aromáticos, cofatores, carreadores e vitaminas, além de vias relacionadas à estrutura celular e geração de metabólitos e energia.

A seguir investigamos a ocorrência de vias diferencialmente abundantes entre os grupos pelo método LefSe. Considerando um LDA > 3, como mostrado na figura 33, observamos que as vias metabólicas preditas diferencialmente abundantes entre os grupos foram a *vitaminaB6_degradation* (degradação de vitamina B6) e *lipopolysaccharide_biosynthesis* (biossíntese de lipopolissacarídeos), sendo a primeira mais

abundante nos controles e a via *lipopolysaccharide_biosynthesis* mais abundante nas bactérias presentes nos indivíduos com LOPM, indicando um aumento na biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS) e aumento de bactérias gram-negativas neste grupo. Adicionalmente, um estudo recente relatou um aumento significativo na biossíntese de LPS em sítios orais de CEC (Zhang et al. 2020). Em estudo do microbioma de LOPM e CEC foi encontrado um padrão funcional preditivos das vias protoporfirinogênio oxidase e succinato desidrogenase/fumarato redutase, relacionadas com a absorção de ferro e vitamina K, respectivamente, reduzindo a disponibilidade dos mesmo para as células tumorais e contribuindo para o crescimento tumoral (Arthur et al. 2021). No entanto, temos que levar em consideração que este tipo de análise está sujeito a vieses uma vez que considera o DNA como material genético para inferência destas vias, e não dados de expressão gênica (metatranscriptômica) ou metabolômica, que seriam mais robustos para tal análise. Sendo assim, em nosso estudo não encontramos indicativos de vias metabólicas bacterianas relevantes enriquecidas ou diminuídas no grupo com LOPM, carecendo de mais estudos complementares para melhor compreensão do papel destas vias no processo de malignização das LOPM.

Tabela 11: Top 10 vias metabólicas mais abundantes nas amostras dos grupos caso e controle.

CASOS	AR	CONTROLES	AR
Respiração aeróbica I (citocromo c)	0,695	Biossíntese de difosfato de 6-hidroxi-metil-dihidropterina I	0,180
via das pentoses fosfato (ramo não oxidativo)	0,612	Degradação do acetileno	0,220
fermentação de piruvato para isobutanol	0,608	Resgate de adenina e adenosina III	0,222
biossíntese de adenosina desoxirribonucleotídeos II	0,579	biossíntese de adenosina desoxirribonucleotídeos II	0,272
biossíntese de guanosina desoxirribonucleotídeos II	0,579	Biossíntese ribonucleotídeos de adenosina	0,207
Biossíntese de L-isoleucina II	0,535	Respiração aeróbica I (citocromo c))	0,247
Biossíntese de CDP-diacilglicerol I	0,533	Ciclo de Calvin-Benson-Bassham	0,165
Biossíntese de L-isoleucina I (a partir de treonina)	0,522	Biossíntese de CDP-diacilglicerol I	0,222
supervia de resgate de nucleobases de pirimidina	0,515	Biossíntese de corismato a partir de 3-desidroquinato	0,179
Supervia de biossíntese nucleotídeos de adenosina I	0,514	Biossíntese de corismato I	0,191

Legenda: (AR): abundância relativa.

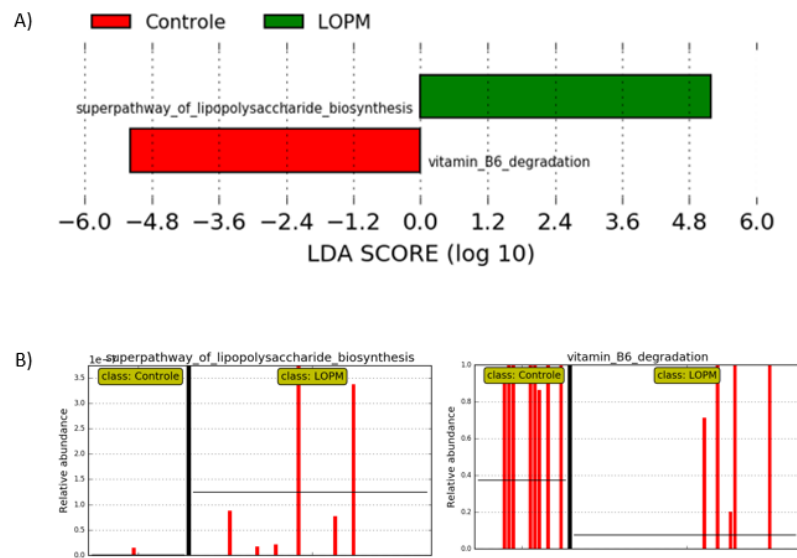


Figura 33 – Diferença das vias metabólicas previstas entre as amostras caso (LOPM) e controle. A) análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LefSe, $LDA > 3$; $p < 0,05$). B) Comparativo das abundâncias relativas das vias metabólicas relevantes nos casos (LOPM) e controles. A linha preta horizontal representa a média da abundância relativa entre os grupos.

4. CONCLUSÕES

- Identificamos maior presença de DNA bacteriano nos indivíduos com LOPM em relação aos controles. Entretanto, não observamos diferenças na quantidade de DNA bacteriano/DNA humano entre as amostras dos indivíduos com LOPM ou controles, quando comparamos o primeiro momento de coleta e segundo momento de coleta;
- A diversidade e composição bacteriana entre as LPOM e mucosas normais são semelhantes, com poucos gêneros diferencialmente abundantes entre os grupos; Há uma redução significativa na abundância dos gêneros *Lautropia*, *Methylobacterium* e *Oribacterium* nas LOPM, com aumento significativo de *Granulicatella* e *Bergeyella* nas lesões com ocorrência de displasia;
- Observamos a ocorrência de uma potencial disbiose oral associada com as LOPM e o seu processo de malignização e que a microbiota dos indivíduos com LOPM, antes da malignização, já apresentam alterações na sua composição com maior presença dos gêneros *Capnocytophaga*, *Finnegoldia* e *Prevotella*;
- Identificamos uma similaridade da composição bacteriana nos diferentes momentos da coleta, com exceção de um aumento significativo de *Granulicatella* e *Abiotrophia* no segundo momento;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidullah M, Kiran G, Gaddikeri K, Raghoji S, Ravishankar S. Leukoplakia - Review of A Potentially Malignant Disorder. *J Clin Diagn Res.* 2014 Aug;8(8):ZE01-4.

Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* 2018 Oct;6(5).

Aghbari SMH, Abushouk AI, Attia A, Elmaraezy A, Menshawy A, Ahmed MS, Elsaadany BA, Ahmed EM. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.* 2017 May;68:92-102.

Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I & Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Diseases.* 2021 27(8), 1881–1895.

Ahn J, Yang L, Paster BJ, Ganly I, Morris L, Pei Z, & Hayes RB. Oral Microbiome Profiles: 16S rRNA Pyrosequencing and Microarray Assay Comparison. *PLoS ONE.* 2011 6(7), e22788.

Aittwarapoj A, Juengsomjit R, Kitkumthorn N, Lapthanasupkul P. Oral Potentially Malignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma at the Tongue: Clinicopathological Analysis in a Thai Population. *Eur J Dent.* 2019 Jul;13(3):376-382.

Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, Axéll T, ...Warnakulasuriya S & van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2007 103, S25.e1-S25.e12.

Al-Hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM, Johnson NW. Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017 May 12;7(1):1834.

Alrashdan MS, Cirillo N & McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Archives of Dermatological Research*. 2016 308(8), 539–551.

Altayb HN, Chaieb K, Baothman O, Alzahrani FA, Zamzami MA, Almugadam BS. Study of oral microbiota diversity among groups of families originally from different countries. *Saudi J Biol Sci*. 2022 Jul;29(7):103317.

Amer A, Galvin S, Healy CM, Moran GP. The microbiome of potentially malignant oral leukoplakia exhibits enrichment for *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, and *Rothia* Species. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8, 2391.

Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, Kightley EP, Thompson LR, Hyde ER, Gonzalez A, Knight R. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems*. 2017 Mar 7;2(2):e00191-16.

Arduino PG, Surace A, Carbone M, Elia A, Massolini G, Gandolfo S, Broccoletti R. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jul;38(6):540-4.

Arthur RA, Dos Santos Bezerra R, Ximenez JPB, Merlin BL, de Andrade Morraye R, Neto JV, Fava NMN, Figueiredo DLA, de Biagi CAO Jr; Summer Course 2020 group, Montibeller MJ, Guimarães JB, Alves EG, Schreiner M, da Costa TS, da Silva CFL, Malheiros JM, da Silva LHB, Ribas GT, Achallma DO, Braga CM, Andrade KFA, do Carmo Alves Martins V, Dos Santos GVN, Granatto CF, Terin UC, Sanches IH, Ramos DE, Garay-Malpartida HM, de Souza GMP, Slavov SN, Silva WA Jr. Microbiome and oral squamous cell carcinoma: a possible interplay on iron metabolism and its impact on tumor microenvironment. *Braz J Microbiol*. 2021 Sep;52(3):1287-1302.

Bagan J, Martorell M, Cebrián JL, Rubert A, Bagán L, Mezquida C, Hervás D. Effect of clinical and histologic features on time to malignancy in 224 cases of oral leukoplakia treated by surgery. *Clin Oral Investig*. 2022 Aug;26(8):5181-5188.

Barbosa NG, Silveira ÉJ, Lima EN, Oliveira PT, Soares MS, de Medeiros AM. Factors associated with clinical characteristics and symptoms in a case series of oral lichen planus. *Int J Dermatol*. 2015 Jan;54(1):e1-6.

Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, Nelson KE, Gill SR, Fraser-Liggett CM, Relman DA. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J*. 2010 Aug;4(8):962-74.

Bikel S, Valdez-Lara A, Cornejo-Granados F, Rico K, Canizales-Quinteros S, Soberón X, Del Pozo-Yauner L, Ochoa-Leyva A. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015. 13, 390-401.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS 2nd, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. Author Correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019 Sep;37(9):1091.

Börnigen D, Ren B, Pickard R, Li J, Ozer E, Hartmann EM, Xiao W, Tickle T, Rider J, Gevers D, Franzosa EA, Davey ME, Gillison ML, Huttenhower C. Alterations in oral bacterial communities are associated with risk factors for oral and oropharyngeal cancer. *Sci Rep.* 2017 Dec 15;7(1):17686.

Bray JR & Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr.* 1957;27(4):325–49.

Carrard VC, Brouns EREA & Van der waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2013. v.18, n.3, p.411-3.

Chau L, Jabara JT, Lai W, Svider PF, Warner BM, Lin HS, Raza SN, Fribley AM. Topical agents for oral cancer chemoprevention: A systematic review of the literature. *Oral Oncol.* 2017 Apr;67:153-159.

Chen X, Winckler B, Lu M, Cheng H, Yuan Z, Yang Y, Jin L, Ye W. Oral Microbiota and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a High-Risk Area of China. *PLoS One.* 2015 Dec 7;10(12):e0143603.

Choi YS, Kim Y, Yoon HJ, Baek KJ, Alam J, Park HK, Choi Y. The presence of bacteria within tissue provides insights into the pathogenesis of oral lichen planus. *Sci Rep.* 2016 Jul 7;6:29186.

Condurache Hritcu OM, Botez AE, Olinici DT, Onofrei P, Stoica L, Grecu VB, Toader PM, Gheucă-Solovăstru L, Cotrutz EC. Molecular markers associated with potentially malignant oral lesions (Review). *Exp Ther Med.* 2021 Aug;22(2):834.

Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research.* 2012. 160(4), 246–257.

de Albuquerque GE, Moda BS, Serpa MS, Branco GP, Defelicibus A, Takenaka IKTM, de Amorim MG, Miola EC, Martins VCA, Torres KL, Bezerra SM, Claro LCL, Pelosof AG, Sztokfisz CZ, Abrantes LLS, Coimbra FJF, Kowalski LP, Alves FA, Zequi SC, Udekwu KI, Silva IT, Nunes DN,

Bartelli TF, Dias-Neto E. Evaluation of Bacteria and Fungi DNA Abundance in Human Tissues. *Genes (Basel)*. 2022 Jan 27;13(2):237.

Decsi G, Soki J, Pap B, Dobra G, Harmati M, Kormondi S, Pankotai T, Braunitzer G, Minarovits J, Sonkodi I, Urban E, Nemeth IB, Nagy K, Buzas K. Chicken or the Egg: Microbial Alterations in Biopsy Samples of Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Pathol Oncol Res*. 2019 Jul;25(3):1023-1033.

Du GH, Wang YF, Chen JJ, Deng YW, Han XZ, Tang GY. Potential association between *Fusobacterium nucleatum* enrichment on oral mucosal surface and oral lichen planus. *Oral Dis*. 2020 Jan;26(1):122-130.

Esberg A, Eriksson L, Johansson I. Site- and Time-Dependent Compositional Shifts in Oral Microbiota Communities. *Front Oral Health*. 2022 Mar 1;3:826996.

Farah CS, Woo S, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral Cancer and Oral Potentially Malignant Disorders. *International Journal of Dentistry*. 2014 1–6.

Feng JQ, Mi JG, Wu L, Ma LW, Shi LJ, Yang X, Liu W, Zhang CP, Zhou ZT. Expression of podoplanin and ABCG2 in oral erythroplakia correlate with oral cancer development. *Oral Oncology*. 2012. 48, 848-852.

Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2014 Jan;145(1):45-56.

Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol*. 2015 Oct-Dec;46(4). 1135-40.

Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & Cell*. 2018 9(5), 488–500.

Geetha KM, Leeky M, Narayan TV, Sadhana S, Saleha J. Grading of oral epithelial dysplasia: Points to ponder. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2015 19, 198-204.

Giuliani M, Troiano G, Cordaro M, Corsalini M, Gioco G, Io Muzio L, Pignatelli P, Lajolo C. Rate of malignant transformation of oral lichen planus: A systematic review. *Oral Diseases*. 2019 25(3), 693–709

González-Moles M.Á, Ruiz-Ávila I, González-Ruiz L, Ayén Á, Gil-Montoya JA, Ramos-García P. Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncology*. 2019 96, 121–130.

González-Moles, M. Á., Warnakulasuriya, S., González-Ruiz, I., González-Ruiz, L., Ayén, Á., Lenouvel, D., Ruiz-Ávila, I., & Ramos-García, P. (2021). Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*, 27(4), 813–828.

Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S, Sinitcyn P, Cox J, Mann M. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Medicine*. 2016 8, 44.

Guo LN, Li Y, Hsueh PR, Wang P, Zhao YP, Xu YC. Microbiological characteristics of a novel species most closely related to 'Bergeyella cardium' as a pathogen of infectious endocarditis. *PLoS One*. 2018 Jan 25;13(1):e0191715.

Gururaj N, Hasinidevi P, Janani V, Divynadaniel T. Diagnosis and management of oral lichen planus – Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2021 25(3), 383.

Hashimoto K, Shimizu D, Hirabayashi S, Ueda S, Miyabe S, Oh-Iwa I, Nagao T, Shimosato K, Nomoto S. Changes in oral microbial profiles associated with oral squamous cell carcinoma vs leukoplakia. *J Investig Clin Dent*. 2019 Nov;10(4):e12445.

He Y, Gong D, Shi C, Shao F, Shi J, Fei J. Dysbiosis of oral buccal mucosa microbiota in patients with oral lichen planus. *Oral Diseases*. 2017 23, 674-682.

Herreros-Pomares A, Llorens C, Soriano B, Zhang F, Gallach S, Bagan L, Murillo J, Jantus-Lewintre E, Bagan J. Oral microbiome in Proliferative Verrucous Leukoplakia exhibits loss of diversity and enrichment of pathogens. *Oral Oncol.* 2021 Sep;120:105404.

Hogan G, Eckenberger J, Narayanan N, Walker SP, Claesson MJ, Corrigan M, O'Hanlon D, Tangney M. Biopsy bacterial signature can predict patient tissue malignancy. *Sci Rep.* 2021 Sep 17;11(1):18535.

Hsiao JR, Chang CC, Lee WT, Huang CC, Ou CY, Tsai ST, Chen KC, Huang JS, Wong TY, Lai YH, Wu YH, Hsueh WT, Wu SY, Yen CJ, Chang JY, Lin CL, Weng YL, Yang HC, Chen YS, Chang JS. The interplay between oral microbiome, lifestyle factors and genetic polymorphisms in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2018 May 28;39(6):778-787.

Hu X, Zhang Q, Hua H, Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol.* 2016 May;56:e6-8.

Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, Di Maio P, Spriano G, Pardiñas López S, Shanti RM. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck.* 2020 Mar;42(3):539-555.

Karpiński, Tomasz M. "Role of Oral Microbiota in Cancer Development." *Microorganisms* vol. 7,1 20. 13 Jan. 2019.

Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciolk T, McCall LI, McDonald D, Melnik AV, Morton JT, Navas J, Quinn RA, Sanders JG, Swafford AD, Thompson LR, Tripathi A, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhu Q, Caporaso JG, Dorrestein PC. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Jul;16(7):410-422.

Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016 Nov 18;221(10):657-666.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*. 2006 42:987-93.

Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, Levasseur A, Rolain JM, Fournier PE, Raoult D. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. 2018 May 1;16:540-550.

Lai CC, Cheng A, Liu WL, Tan CK, Huang YT, Chung KP, Lee MR, Hsueh PR. Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3329-31.

Lande R. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos*. 1996 76(1):5.

Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* 2010 11, 523.

Lee YH, Chung SW, Auh QS, Hong SJ, Lee YA, Jung J, Lee GJ, Park HJ, Shin SI, Hong JY. Progress in Oral Microbiome Related to Oral and Systemic Diseases: An Update. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jul 16;11(7):1283.

Li Y, Wang B, Zheng S, He Y. Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Mar;25:17-22.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):814-21.

Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun*. 2020 Jul 14;11(1):3514.

Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, Zhao J, Zhang H, Chen W. *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1-21.

Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR, Carrassi A, MacDonald LC, Worthington HV. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2016 Jul 29;7(7):CD001829.

Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2007 73(5):1576–85.

Makarev E, Schubert AD, Kanherkar RR, London N, Teka M, Ozerov I, Lezhnina K, Bedi A, Ravi R, Mehra R, Hoque MO, Sloma I, Gaykalova DA, Csoka AB, Sidransky D, Zhavoronkov A, Izumchenko E. *In silico* analysis of pathways activation landscape in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia. Cell Death Discov. 2017 May 22;3:17022.

Mares S, Ben Slama L, Gruffaz F, Goudot P, Bertolus C. Potentially malignant character of oral lichen planus and lichenoid lesions. Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale. 2013 Nov;114(5):293-8.

Mello FW, Melo G, Meurer MI, Rivero ERC. Intraoral Potentially Malignant Disorders in a Brazilian Oral Pathology Service: Epidemiological, Clinical, and Histopathological Findings. J Oncol. 2018a Mar 1;2018:2325808.

Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, Rivero ERC. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2018b Aug;47(7):633-640.

Mello FW, Melo G, Guerra ENS, Warnakulasuriya S, Garnis C, Rivero ERC. Oral potentially malignant disorders: A scoping review of prognostic biomarkers. Crit Rev Oncol Hematol. 2020 Sep;153:102986.

Mok SF, Karuthan C, Cheah YK, Ngeow WC, Rosnah Z, Yap SF, Ong HKA. The oral microbiome community variations associated with normal, potentially malignant disorders and malignant lesions of the oral cavity. *Malays J Pathol*. 2017 Apr;39(1):1-15.

Moritani K, Takeshita T, Shibata Y, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Acetaldehyde production by major oral microbes. *Oral Dis*. 2015 21(6), 748-54.

Mortazavi H, Safi Y, Baharvand M, Jafari S, Anbari F, Rahmani S. Oral White Lesions: An Updated Clinical Diagnostic Decision Tree. *Dentistry Journal*. 2019 7(1), 15.

Mulliken JS, Langelier C, Budak JZ, Miller S, Dynerman D, Hao S, Li LM, Crawford E, Lyden A, Woodworth MH, DeRisi JL, Desmond E, Browne C, Luu A, Grandis DJ, Grossman W, Deuse T, Melcher GP. *Bergeyella cardium*: Clinical Characteristics and Draft Genome of an Emerging Pathogen in Native and Prosthetic Valve Endocarditis. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Mar 15;6(4):ofz134.

Nadeau C & Kerr AR. Evaluation and Management of Oral Potentially Malignant Disorders. *Dental Clinics of North America*. 2018 62(1), 1–27.

Nearing JT, Comeau AM, Langille MGI. Identifying biases and their potential solutions in human microbiome studies. *Microbiome*. 2021 May 18;9(1):113.

Netto JNS, Pires FR, Costa KHA, Fischer RG. Clinical features of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: an oral pathologist's perspective. *Braz Dent J*. 2022 May-Jun;33(3):67-73.

Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Diseases*. 2021 27(8), 1947–1976.

Palaia G, Bellisario A, Pampena R, Pippi R, Romeo U. Oral Proliferative Verrucous Leukoplakia: Progression to Malignancy and Clinical Implications. Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*. 2021 13(16), 4085.

Pentenero M, Meleti M, Vescovi P, Gandolfo S. Oral proliferative verrucous leucoplakia: are there particular features for such an ambiguous entity? A systematic review. *British Journal of Dermatology*. 2014 170(5), 1039–1047.

Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, Chen T, Johnson NW. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*. 2018 Jun;97(6):725-732.

Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*. 2014 Jul;16(7):1024-33.

Pires FR, Barreto ME, Nunes JG, Carneiro NS, Azevedo AB, Dos Santos TC. Oral potentially malignant disorders: clinical-pathological study of 684 cases diagnosed in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Jan 1;25(1):e84-e88.

Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, Li X, Saxena D. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology*. 2012 12, 144.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41:D590-6.

Radochová V, Koberová Ivančaková R, Heneberk O, Slezák R. The Characteristics of Patients with Oral Lichen Planus and Malignant Transformation-A Retrospective Study of 271 Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jun 17;18(12):6525

Ramos-García P, González-Moles, MÁ, Warnakulasuriya S. Oral cancer development in lichen planus and related conditions—3.0 evidence level: A systematic review of systematic reviews. *Oral Diseases*. 2021 27(8), 1919–1935.

Ranganathan K, Kavitha L, Sharada P, Bavle RM, Rao RS, Pattanshetty SM, Hazarey VK, Madhura MG, Nagaraj T, Lingappa A, Warnakulasuriya, S. Intra-observer and inter-observer variability in two grading systems for oral epithelial dysplasia: A multi-centre study in India. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2020 49(9), 948–955.

Reichart, PA & Philipsen, HP. Oral erythroplakia—a review. *Oral Oncology*. 2005 41(6), 551–561.

Reibel J, Gale N, Hille J, Hunt JL, Lingen M, Zain RB. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. 2017 In AK El-Naggar, JKC Chan, JR Grandis, T Takata, PF Slootweg (IARC, Eds.), *WHO classification of head and neck tumours* (pp. 112– 113).

Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita, RA. A Review of the Nonsurgical Treatment of Oral Leukoplakia. *International Journal of Dentistry*. 2010 1–10.

Robledo-Sierra J, Ben-Amy DP, Varoni E, Bavarian R, Simonsen JL, Paster BJ, Wade WG, Kerr R, Peterson DE, Frandsen Lau E. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders. *Oral Dis*. 2019 Jun;25 Suppl 1:28-48.

Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, Sharma N, Yerwadekar S, Patil S. Recent trends in predictive biomarkers for determining malignant potential of oral potentially malignant disorders. *Oncol Rev*. 2019 Sep 10;13(2):424.

Sarkar P, Malik S, Laha S, Das S, Bunk S, Ray JG, Chatterjee R, Saha A. Dysbiosis of Oral Microbiota During Oral Squamous Cell Carcinoma Development. *Front Oncol*. 2021 Feb 23;11:614448.

Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, Huey B, Corby PM, Queiroz EL, Nightingale K, Kerr AR, DeLacure MD, Veeramachaneni R, Olshen AB, Albertson DG. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98741.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 Jun 24;12(6):R60.

Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science.* 2014 (5), 209.

Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 13(11), 800–812.

Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontol 2000.* 2021 Oct;87(1):107-131.

Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 2018 125(6), 612–627.

Sperandio M, Brown AL, Lock C, Morgan PR, Coupland VH, Madden PB, Warnakulasuriya S, Møller H, Odell EW. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013 Aug;6(8):822-31.

Su Mun L, Wye Lum S, Kong Yuiin Sze G, et al. Association of Microbiome with Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review of the Metagenomic Studies. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 18(14):7224.

Teng F, Darveekaran Nair SS, Zhu P, Li S, Huang S, Li X, Xu J, Yang F. Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci Rep.* 2018 Nov 5;8(1):16321.

Thomas AM, Gleber-Netto FO, Fernandes G, Amorim MG, Barbosa LF, Francisco ALN, Guerra A, Kowalski LP, Nunes DN & Dias-Neto E. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BMC Microbiology* 2014. 14, 250.

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T. Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. *J Microbiol Methods*. 2017 Mar;134:21-26.

Van der Meij EH, Mast H, Van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncology*. 2007 43.8, 742–748.

Van Der Meij EH, Van Der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003 32(9), 507-12.

Van der waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa - terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009 v.45, n.4, p.317–323.

Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncology*. 2010 46, 423-425.

Van der waal I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable?. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014 Jul 1;19 (4):e386-90.

Varoni EM, Bavarian R, Robledo-Sierra J, Porat Ben-Amy D, Wade WG, Paster B, Kerr R, Peterson DE, Frandsen Lau E. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the microbiome for oral medicine specialists-Part 1. A methodological guide. *Oral Dis*. 2019 Jun;25 Suppl 1:12-27.

Verma D, Garg PK, Dubey, AK. Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*. 2018 200(4), 525–540.

Villa A, Menon RS, Kerr AR, De Abreu Alves F, Guollo A, Ojeda D, Woo SB. Proliferative leukoplakia: Proposed new clinical diagnostic criteria. *Oral Dis.* 2018 Jul;24(5):749-760.

Villa A, Villa C, Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Aust Dent J.* 2011 Sep;56(3):253-6.

Wang K, Lu W, Tu Q, Ge Y, He J, Zhou Y, Gou Y, Van Nostrand JD, Qin Y, Li J, Zhou J, Li Y, Xiao L, Zhou X. Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus. *Sci Rep.* 2016 Mar 10;6:22943.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 2007 36, 575-580.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2008 37. 3, 127-133.

Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2016 45(3), 155–166.

Warnakulasuriya S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncol.* 2020 22; 102:104550

Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, Lodi G, Mello FW, Monteiro L, Ogden GR, Sloan P, Johnson NW. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1862-1880.

Weyrich LS. The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. *Periodontol 2000.* 2021 Feb;85(1):90-100.

Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dental Clinics of North America*. 2020 64(1), 25–37.

World Health Organization. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours: Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press, 2005 283-327.

Woo SB. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head and Neck Pathology*. 2019 13(3), 423–439.

Wu H, Zhang J, Zhou B. Toothbrushing frequency and gastric and upper aerodigestive tract cancer risk: A meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2021 May;51(5):e13478.

Yan F, Reddy PD, Nguyen SA, Chi AC, Neville BW, Day TA. Grading systems of oral cavity pre-malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020 Nov;277(11):2967-2976.

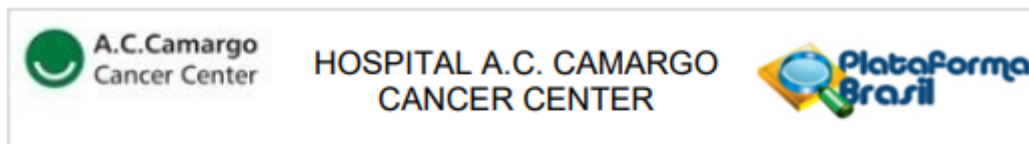
Yang SW, Lee YS, Chang LC, Hwang CC, Luo CM, Chen TA. Clinical characteristics of narrow-band imaging of oral erythroplakia and its correlation with pathology. *BMC Cancer*. 2015 May 15;15:406.

Yardimci G, Kutlubay Z, Engin B, Tuzun Y. Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases*. 2014 Dec 16;2(12):866-72.

Yu FY, Wang QQ, Li M, Cheng YH, Cheng YL, Zhou Y, Yang X, Zhang F, Ge X, Zhao B, Ren XY. Dysbiosis of saliva microbiome in patients with oral lichen planus. *BMC Microbiol*. 2020 Apr 3;20(1):75.

Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jan 15;9:476.

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL MICROBIANO DE LESÕES ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS

Pesquisador: Fábio de Abreu Alves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66865117.8.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.140.334

Apresentação do Projeto:

Lesões potencialmente malignas (LPM) da cavidade oral são alterações que exibem um maior risco de evolução maligna e podem anteceder o carcinoma epidermóide. Visto que o papel dos microorganismos na indução do câncer em neoplasias orais ainda não é conhecido, o objetivo do estudo é avaliar as populações bacterianas que compõe o microbioma oral de pacientes LPM da cavidade oral. A pesquisa trata-se de um estudo tipo caso controle de caráter longitudinal, prospectivo e quantitativo, onde os participantes do estudo serão divididos em três grupos, o grupo de estudo composto por pacientes portadores de lesão com e sem displasia epitelial e o grupo controle composto por indivíduos saudáveis pareados por idade, sexo e hábitos nocivos. Para as análises da microbiota oral será utilizada a amplificação por PCR seguida de sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA e o método de shotgun sequencing. Será avaliado e comparado em cada grupo a composição de bactérias de cada indivíduo em relação à diversidade observada, além de variações de certos táxons bacterianos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é avaliar as populações bacterianas que compõe o microbioma oral de pacientes LPM da cavidade oral.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 2.140.334

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos foram detectados para os participantes do estudo: desconforto relacionado ao tempo gasto em responder o formulário de pesquisa, bem como o tempo destinado a coleta de material biológico dos pacientes participantes, ou ao constrangimento pelo instrumento de coleta de dados do estudo conter variáveis clínicas e pessoais. Há ainda riscos mínimos de perda de confidencialidade. Os pesquisadores se comprometem a realizar esforços serão feitos no sentido de preservar a anonimidade dos participantes do estudo. Não haverá benefícios diretos aos participantes do estudo. Benefícios indiretos podem surgir da melhor compreensão do papel das comunidades microbianas residentes nas lesões potencialmente malignas, com potencial de auxiliar em condutas terapêuticas futuras.

 Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foi encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa uma nova versão do projeto e do TCLE seguindo às recomendações do CEP emitidas no parecer 2.064.939. Todas as pendências e inadequações foram corrigidas adequadamente nesta nova versão, não restando pendências adicionais.

 Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados devidamente todos os termos de apresentação obrigatória.

 Recomendações:

Não há.

 Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações na documentação apresentada, de forma que recomendamos pela aprovação do projeto.

 Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

 Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_859663.pdf	02/06/2017 15:51:05		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	02/06/2017 15:50:35	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep_hcancer@eccamargo.org.br

Continuação do Parecer: 2.140.334

Outros	CARTARESPOSTA.pdf	02/06/2017 15:50:35	CARVALHO	Aceito
Outros	COLETADADOS.pdf	02/06/2017 15:49:14	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGRUPOESTUDO.pdf	02/06/2017 15:46:28	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGRUPOCONTROLE.pdf	02/06/2017 15:45:39	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOMETAGENOMICA.pdf	02/06/2017 15:42:51	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	FORMULARIOSUBMISSAO.pdf	05/04/2017 20:15:53	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_plataforma_Brasil.pdf	30/03/2017 00:12:29	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	INFRAPATOLOGIA4.pdf	17/03/2017 16:32:14	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	INFRAPATOLOGIA3.pdf	17/03/2017 16:31:41	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	INFRAPATOLOGIA2.pdf	17/03/2017 16:31:21	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	INFRAPATOLOGIA1.pdf	17/03/2017 16:30:47	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	ANATOMIAPATOLOGICA.pdf	17/03/2017 16:29:44	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	acProjectsfinalizado.pdf	17/03/2017 16:28:17	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAESTUDO.pdf	16/03/2017 23:50:07	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	IDCURRICULOS.pdf	14/03/2017 19:41:16	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Outros	RECRUTAMENTOPARTICIPANTES.pdf	14/03/2017 19:40:14	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 2.140.334

Outros	RECRUTAMENTOPARTICIPANTES.pdf	14/03/2017 19:40:14	CARVALHO	Aceito
Outros	DADOSCOLETADOS.pdf	14/03/2017 19:30:28	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Orçamento	FINANCEIRO.pdf	14/03/2017 19:24:18	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ESTOMATOLOGIA.pdf	14/03/2017 19:23:26	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	COMPESQUISADORCNS.pdf	14/03/2017 19:21:19	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CIP.pdf	14/03/2017 19:20:53	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	MATBIOLOGICO.pdf	14/03/2017 19:19:33	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRAESTOMATO.pdf	14/03/2017 19:18:32	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRACIPE2.pdf	14/03/2017 19:18:13	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRACIPE1.pdf	14/03/2017 19:17:56	SÉRGIO HENRIQUE GONÇALVE SDE CARVALHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Junho de 2017

Assinado por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o grupo caso



A.C. Camargo
Cancer Center
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
A.C.CAMARGO CANCER CENTER

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

GRUPO ESTUDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : ()M ()F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : ()M ()F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
-

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise do Perfil Microbiano de Lesões Orais Potencialmente Malignas**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Prof. Fábio de Abreu Alves, PhD –Líder do Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center**
3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
4. **Emmanuel Dias Neto, PhD – Departamento de Genômica Médica do A.C.Camargo Cancer Center.**
 5. **Sérgio Henrique Gonçalves de Carvalho – Pesquisador Colaborador - Universidade Estadual da Paraíba**
 6. **Teresa Paula de Lima Gusmão – Pesquisador Colaborador – A.C.Camargo Cancer Center**

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa **Análise do Perfil Microbiano de Lesões Orais Potencialmente Malignas**, que será realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

Os potenciais participantes da pesquisa inicialmente serão abordados na sala de espera ou recepção para a apresentação e explicação detalhada do estudo com posterior convite para a sua participação, e aos que aceitarem será solicitada assinatura ao Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), deixando claro o total sigilo das informações e anonimato dos sujeitos e que a desistência pode ocorrer em qualquer fase do estudo.

Posteriormente será realizado o diagnóstico clínico das lesões, além de registro fotográfico. Com a confirmação clínica das lesões será realizada a coleta de material biológico da mucosa oral na forma de biópsia para o diagnóstico histopatológico das lesões e coleta de material com auxílio de *swab* estéril após recomendação de jejum de 30 minutos e higienização com água destilada, incluindo em solução de estabilização para posterior realização de estudo metagenômico por meio de extração, amplificação e sequenciamento do DNA microbiano.

O microbioma oral é caracterizado como o conjunto dos microrganismos presentes na cavidade oral e inclui todos os microrganismos comensais como bactérias, vírus, fungos e protozoários, sendo estes isoláveis em cultura ou não (Khanna & Tosh, 2014).

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Avaliar as populações bacterianas que compõe o microbioma oral de pacientes com lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O papel dos microrganismos na indução do câncer é reconhecido em neoplasias de estômago e cólon, porém a escassez de estudos relacionando os microbiomas orais e as neoplasias orais (populações de microrganismos presentes na cavidade oral), representa uma lacuna no conhecimento destas comunidades microbianas especificamente no intervalo que compreende a transição entre o tecido normal e o surgimento da lesão neoplásica propriamente dita. A falta de informações sobre as comunidades microbianas e como estas podem se modificar neste grupo de alterações, especificando as lesões orais com potencial de

malignização, pode nos mostrar de forma particular para cada tipo de lesão como se compõe e se há variações microbianas em seus meios.

Portanto, o presente estudo torna-se extremamente relevante pois possibilitará o entendimento dos microbiomas orais presentes em LPM, especialmente por especificar em cada grupo lesional sua composição e possíveis variações relacionadas a desordem em dois intervalos de tempos distintos.

VI – DESENHO DA PESQUISA

A pesquisa trata-se de um estudo caso controle de caráter longitudinal, prospectivo e quantitativo, com procedimento estatístico-descritivo, junto a pacientes portadores de lesões orais com potencial de malignização.

O estudo será executado em duas etapas: Inicialmente ocorrerá a seleção de pacientes atendidos no Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center, onde será feita a coleta de material biológico (biópsia e *swab*). As biópsias serão avaliadas no Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center e as extrações de DNA, sequenciamento e análises serão conduzidas no Laboratório de Genômica Médica do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) da mesma Instituição.

O universo do estudo corresponderá aos pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center no período destinado a coleta de dados. O tipo de amostragem a ser realizado será não probabilístico, com amostra por conveniência e corresponderá aos pacientes portadores de LOPM. A amostra será distribuída em dois grupos distintos: A) Pacientes portadores de lesão oral potencialmente maligna; B) Pacientes grupo controle (pacientes com mucosa saudável).

Os grupos de estudo serão submetidos a coleta de material biológico na mucosa lesional. O grupo controle será constituído por indivíduos saudáveis pareados por idade, sexo, e hábitos nocivos (tabagismo e etilismo). Amostras serão coletadas por *swab* nos mesmos sítios de localização anatômica, afim de ser comparado com demais grupos.

Devido à amostra ser composta por dois grupos, grupo de estudo caso e grupo controle, será atribuído aos grupos de estudo, bem como ao grupo controle, termos de consentimento livre e esclarecido independentes.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes participantes da pesquisa após explicação e assinatura do TCLE serão submetidos a exame clínico minucioso para o diagnóstico das lesões orais com potencial de malignização e em caso de confirmação clínica o mesmo será convidado a responder o questionário (Instrumento de coleta de dados) na forma de perguntas e respostas que com o auxílio do pesquisador o tempo de preenchimento girará em torno dos 20 a 30 minutos. Em seguida será realizada a coleta de material biológico por meio de *swab* estéril e em seguida biópsia para o diagnóstico definitivo da lesão. A realização de biópsia para o diagnóstico histopatológico faz parte da rotina de atendimento para qualquer paciente que apresente lesão em cavidade bucal que seja encaminhado e atendido no Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center.

Como parte essencial para o estudo a coleta de material biológico por meio de *swab* será adicionado a rotina dos pacientes participantes da pesquisa que farão parte do Grupo de

Estudo e ao Grupo Controle. Tais coletas serão repetidas após 12 meses, apenas nos pacientes do grupo de estudo, a contar a partir da primeira coleta, para posterior avaliação comparativa, sendo estes realizados por marcação prévia ou nos dias de retorno ao hospital para procedimentos de rotina.

Todas as amostras coletadas com *swab* serão armazenadas no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) e serão utilizadas para as análises metagenômica necessárias para cumprir os objetivos do estudo. A coleta de material por meio de biópsia será encaminhada ao Departamento de Anatomia Patológica para realização de exame histopatológico com o objetivo de diagnóstico histopatológico da lesão.

O participante em qualquer momento da pesquisa pode deixar de responder a qualquer pergunta do questionário se assim o convier.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

O referido estudo poderá, eventualmente, expor os participantes da pesquisa a danos imediatos, mesmo que estes sejam mínimos. Especificamente, podem ser citados: o desconforto relacionado ao tempo gasto em responder o formulário de pesquisa, bem como o tempo destinado a coleta de material biológico dos pacientes participantes, ou ao constrangimento pelo instrumento de coleta de dados do estudo conter variáveis clínicas. Durante a pesquisa não será realizada nenhuma intervenção nos indivíduos participantes que não esteja incluída na conduta clínica e terapêutica de rotina estabelecida pelo serviço para as LOPM, com exceção apenas da inclusão de coleta de material biológico por meio de *swab*, para posterior análise metagenômica. Do mesmo modo, todos os esforços serão feitos no sentido de preservar a anonimidade dos sujeitos do estudo, mas há uma possibilidade pequena de que a mesma não seja preservada para todos os envolvidos durante todo o estudo.

Em qualquer momento, qualquer participante do estudo terá pleno direito de retirar seu consentimento em participar da pesquisa incluindo a solicitação de descarte de qualquer amostra ou dado que tenham sido coletados.

O(s) questionário(s) poderá (ão) causar um sentimento de desconforto ou ansiedade frente às perguntas realizadas. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a estas situações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Essa pesquisa destaca os quatros referenciais da bioética (autonomia, não maleficência, beneficência e justiça). Dessa forma os benefícios do presente estudo serão potencialmente explorados e superiores aos riscos, resultando, pela exploração dos resultados, em integridade e bem-estar aos sujeitos da pesquisa.

A pesquisa utilizará o termo de consentimento livre e esclarecido a ser aplicado por profissional treinado, que de forma clara e com linguagem acessível o explicará a todos os indivíduos potencialmente elegíveis. Durante este processo, ao potencial participante do estudo serão esclarecidos: i) os objetos do estudo e os procedimentos de coleta e análise das informações; ii) o respeito à autonomia dos mesmos, que podem se recusar a participar do estudo, ou mesmo desistir quando o convier; iii) será ainda explicado que uma eventual não-participação no estudo não acarretará em nenhum prejuízo de seu tratamento; iv) será explicado que o paciente não terá nenhum benefício próprio, que afete seu tratamento, e que seja decorrente do estudo; v) será esclarecido que o paciente pode ter acesso a todos os dados gerados com suas amostras.

A relevância do estudo se dá pela falta de pesquisas que envolvam a composição microbiana em lesões potencialmente malignas que acometem a cavidade oral, além disso, nossos resultados contribuirão para novas pesquisas que ajudarão a compreender o papel das comunidades microbianas residentes nestas desordens, com potencial de auxiliar em condutas terapêuticas futuras.

X – CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – Ramal 5129 - Departamento de Estomatologia, entrar em contato com Dr. Fábio de Abreu Alves e Teresa Gusmão.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas. Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão

realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA;

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa pôr em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr(a). Fábio de Abreu Alves e Teresa Paula de Lima Gusmão
Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 - Ramal 5129

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Na impossibilidade de contato com as referências acima, o senhor (a) pode solicitar informações do estudo para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do telefone (61) 3315-2951 / fax (61) 3226-6453 / ou e-mail conep@saude.gov.br.

(ESTA INFORMAÇÃO DEVERÁ CONSTAR APENAS PARA PROJETOS QUE SE ENQUADREM EM UMA DAS ÁREAS TEMÁTICAS ESPECIAIS QUE A CONEP AVALIA)

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____
declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Fábio de Abreu Alves)

_____/_____/_____
Data

Apêndice 2 Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o grupo controle



A.C. Camargo
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
A.C.CAMARGO CANCER CENTER

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

GRUPO CONTROLE

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : ()M ()F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : ()M ()F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
-

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise do Perfil Microbiano de Lesões Orais Potencialmente Malignas**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Prof. Fábio de Abreu Alves, PhD –Líder do Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center**
3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
- 7. **Emmanuel Dias Neto, PhD – Departamento de Genômica Médica do A.C.Camargo Cancer Center.**
 - 8. **Sérgio Henrique Gonçalves de Carvalho – Pesquisador Colaborador - Universidade Estadual da Paraíba**
 - 9. **Teresa Paula de Lima Gusmão – Pesquisador Colaborador – A.C.Camargo Cancer Center**

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa **Análise do Perfil Microbiano de Lesões Orais Potencialmente Malignas**, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

Os potenciais participantes da pesquisa que farão parte do grupo controle, inicialmente serão abordados na sala de espera ou recepção para a apresentação e explicação detalhada do estudo com posterior convite para a sua participação, e aos que aceitarem será solicitada assinatura ao Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), deixando claro o total sigilo das informações e anonimato dos sujeitos e que a desistência pode ocorrer em qualquer fase do estudo.

Posteriormente será realizado exame clínico para descartar diagnóstico clínico de lesões na cavidade oral. Com a confirmação clínica da ausência de lesões será realizada a coleta de material biológico da mucosa oral saudável com auxílio de *swab* estéril após recomendação de jejum de 30 mim e higienização com água destilada, incluindo em solução de estabilização para posterior realização de estudo metagenômico por meio de extração, amplificação e sequenciamento do DNA microbiano, objetivando-se uma comparação com o microbioma dos participantes do grupo de estudo.

O microbioma oral é caracterizado como o conjunto dos microrganismos presentes na cavidade oral e inclui todos os microrganismos comensais como bactérias, vírus, fungos e protozoários, sendo estes isoláveis em cultura ou não (Khanna & Tosh, 2014).

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Avaliar as populações bacterianas que compõe o microbioma oral de pacientes com lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O papel dos microrganismos na indução do câncer é reconhecido em neoplasias de estômago e cólon, porém a escassez de estudos relacionando os microbiomas orais e as neoplasias orais (populações de microrganismos presentes na cavidade oral), representa uma lacuna no conhecimento destas comunidades microbianas especificamente no intervalo que compreende a transição entre o tecido normal e o surgimento da lesão neoplásica

propriamente dita. A falta de informações sobre as comunidades microbianas e como estas podem se modificar neste grupo de alterações, especificando as lesões orais com potencial de malignização, pode nos mostrar de forma particular para cada tipo de lesão como se compõe e se há variações microbianas em seus meios.

Portanto, o presente estudo torna-se extremamente relevante pois possibilitará o entendimento dos microbiomas orais presentes em LOPM, especialmente por especificar em cada grupo lesional sua composição e possíveis variações relacionadas a desordem em dois intervalos de tempos distintos.

VI – DESENHO DA PESQUISA

A pesquisa trata-se de um estudo caso controle de caráter longitudinal, prospectivo e quantitativo, com procedimento estatístico-descritivo, junto a pacientes portadores de lesões orais com potencial de malignização.

O estudo será executado em duas etapas: Inicialmente ocorrerá a seleção de pacientes atendidos no Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center, onde será feita a coleta de material biológico (biópsia e *swab*). As biópsias serão avaliadas no Departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center e as extrações de DNA, sequenciamento e análises serão conduzidas no Laboratório de Genômica Médica do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) da mesma Instituição.

O universo do estudo corresponderá aos pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center no período destinado a coleta de dados. O tipo de amostragem a ser realizado será não probabilístico, com amostra por conveniência e corresponderá aos pacientes portadores de LOPM. A amostra será distribuída em dois grupos distintos: A) Pacientes portadores de lesão oral potencialmente maligna; B) Pacientes grupo controle (pacientes com mucosa saudável).

Os grupos de estudo serão submetidos a coleta de material biológico na mucosa lesional. O grupo controle será constituído por indivíduos saudáveis pareados por idade, sexo, e hábitos nocivos (tabagismo e etilismo). Amostras serão coletadas por *swab* nos mesmos sítios de localização anatômica, afim de ser comparado com demais grupos.

Devido à amostra ser composta por dois grupos, grupo de estudo caso e grupo controle, será atribuído aos grupos de estudo, bem como ao grupo controle, termos de consentimento livre e esclarecido independentes.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes participantes da pesquisa após explicação e assinatura do TCLE serão submetidos a exame clínico minucioso para o possível diagnóstico das lesões orais com potencial de malignização e em caso de confirmação clínica o mesmo será convidado a responder o questionário (Instrumento de coleta de dados) na forma de perguntas e respostas que com o auxílio do pesquisador o tempo de preenchimento girará em torno dos 20 a 30 minutos. Para os pacientes que farão parte do grupo controle (indivíduos saudáveis) também serão convidados a preencher o questionário para que sirva de parâmetro de comparação com os grupos de estudo.

Em seguida será realizada a coleta de material biológico por meio de *swab* estéril para a caracterização metagenômica dos microbiomas orais.

Para os participantes do grupo controle não será realizada coleta de material biológico por meio de biópsia devido à ausência de lesão para diagnóstico histopatológico.

Todas as amostras coletadas com *swab* serão armazenadas no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) e serão utilizadas para as análises metagenômica necessárias para cumprir os objetivos do estudo.

O participante em qualquer momento da pesquisa pode deixar de responder a qualquer pergunta do questionário se assim o convier.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

O referido estudo poderá, eventualmente, expor os participantes da pesquisa a danos imediatos, mesmo que estes sejam mínimos. Especificamente, podem ser citados: o desconforto relacionado ao tempo gasto em responder o formulário de pesquisa, bem como o tempo destinado a coleta de material biológico dos pacientes participantes, ou ao constrangimento pelo instrumento de coleta de dados do estudo conter variáveis clínicas. Durante a pesquisa não será realizada nenhuma intervenção nos indivíduos participantes que não esteja incluída na conduta clínica e terapêutica de rotina estabelecida pelo serviço para as LOPM, com exceção apenas da inclusão de coleta de material biológico por meio de *swab*, para posterior análise metagenômica. Para os participantes do grupo controle será realizada apenas coleta de material biológico por meio de *swab*, não sendo necessária à coleta por meio de biópsia.

Do mesmo modo, todos os esforços serão feitos no sentido de preservar a anonimidade dos sujeitos do estudo, mas há uma possibilidade pequena de que a mesma não seja preservada para todos os envolvidos durante todo o estudo.

Em qualquer momento, qualquer participante do estudo terá pleno direito de retirar seu consentimento em participar da pesquisa incluindo a solicitação de descarte de qualquer amostra ou dado que tenham sido coletados.

O(s) questionário(s) poderá (ão) causar um sentimento de desconforto ou ansiedade frente às perguntas realizadas. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a estas situações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Essa pesquisa destaca os quatro referenciais da bioética (autonomia, não maleficência, beneficência e justiça). Dessa forma os benefícios do presente estudo serão potencialmente explorados e superiores aos riscos, resultando, pela exploração dos resultados, em integridade e bem-estar aos sujeitos da pesquisa.

A pesquisa utilizará o termo de consentimento livre e esclarecido a ser aplicado por profissional treinado, que de forma clara e com linguagem acessível o explicará a todos os indivíduos potencialmente elegíveis. Durante este processo, ao potencial participante do estudo serão esclarecidos: i) os objetos do estudo e os procedimentos de coleta e análise das informações; ii) o respeito à autonomia dos mesmos, que podem se recusar a participar do estudo, ou mesmo desistir quando o convier; iii) será ainda explicado que uma eventual não-participação no estudo não acarretará em nenhum prejuízo de seu tratamento; iv) será explicado que o paciente não terá nenhum benefício próprio, que afete seu tratamento, e que seja decorrente do estudo; v) será esclarecido que o paciente pode ter acesso a todos os dados gerados com suas amostras.

A relevância do estudo se dá pela falta de pesquisas que envolvam a composição microbiana em lesões potencialmente malignas que acometem a cavidade oral, além disso, nossos resultados contribuirão para novas pesquisas que ajudarão a compreender o papel das comunidades microbianas residentes nestas desordens, com potencial de auxiliar em condutas terapêuticas futuras.

X – CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – Ramal 5129 - Departamento de Estomatologia, entrar em contato com Dr Fábio de Abreu Alves e Teresa Paula de Lima Gusmão.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

() Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

() Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

() Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas. Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA;

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa pôr em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr(a). Fábio de Abreu Alves e Teresa Paula de Lima Gusmão
Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2189-5000 - Ramal 5129
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Na impossibilidade de contato com as referências acima, o senhor (a) pode solicitar informações do estudo para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do telefone (61) 3315-2951 / fax (61) 3226-6453 / ou e-mail conep@saude.gov.br.

(ESTA INFORMAÇÃO DEVERÁ CONSTAR APENAS PARA PROJETOS QUE SE ENQUADREM EM UMA DAS ÁREAS TEMÁTICAS ESPECIAIS QUE A CONEP AVALIA)

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____
declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Fábio de Abreu Alves)

_____/_____/_____
Data

Apêndice 3 Instrumento de Coleta de Dados



FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
AC CAMARGO CANCER CENTER

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Questionário de Estilo de Vida

1. Identificação do participante da pesquisa

1.1. Número de identificação EEAG |__||__||__||__||__|

1.2. Nome completo:.....

1.3. Local da entrevista: |__||__|

(1) AC Camargo (2) Outro

Data da entrevista: |__||__||__||__||__||__|

1.4. Endereço pessoal: Rua:No.....Apto.....

Complemento:..... Cidade:CEP.....Estado:

1.5 Telefone fixo: Código de Área:

Telefone celular:

Outros telefones (qq. membro da família):

Email:.....@.....

1.7. Nome do chefe da família:

1.8. Endereço 2 (parente ou amigo):

Cidade : Estado: Cidade ou fazenda:

Rua: No: CEP:

Telefone fixo: Código de área:

Telefone celular:

[Note: Em qualquer lugar do questionário, use 9 ou 99 ou 999 ou 9999 quando um campo não for preenchido. No final da entrevista, certifique que não há campo em branco]

[**Atenção:** Esta página deve ser removida e colocada separadamente. Antes de removê-la, verifique se há concordância entre o nome, o número de identificação (ID) e se o ID foi colocado em todas as páginas do questionário]

1.9 Sexo: (1) M (2) F |__|

1.10 Data de nascimento |__||__||__||__||__||__|

1.11 Etnia auto-atribuída |__|

(1) Caucasóide (2) Negróide (3) Pardo (4) Asiático (5) Outras

1.12. Estado civil: |__|

(1) Solteiro (2) Casado/ (“Morando junto”) (3) Viúvo (4) Divorciado/separado (5) Outros

1.13. Grau de instrução:

(1) Nulo (2) Menor do que 5 anos (3) 6 a 8 anos (4) 9 a 12 anos

(5) Colégio (6) Graduação (7) Pós-graduação

|_|

2. Lista das residências e/ou lugares

2.1. Listar todos os lugares e residências que o sujeito da pesquisa já viveu por pelo menos 01 ano, iniciando pelo local de nascimento.

N	Da idade de	À idade de	Local de residência (1) Cidade	Estado	Cidade	País	Tipo de casa
1	_ _	_ _ _				_
2	_ _	_ _ _				_
3	_ _	_ _ _				_
4	_ _	_ _ _				_
5	_ _	_ _ _				_
6	_ _	_ _ _				_

Tipos de casa: (1) Madeira; (2) Madeira e tijolo; (3) Adobe; (4) Alvernaria; (5) Outras; (7) Não sabe

2.1.1 Houve mudança de residência da zona rural para a zona urbana?

Sim Não

2.2. Listar os principais tipos de “combustível” utilizado para cozinhar e aquecer alimentos

Métodos de aquecer e cozinhar

- 1=Gás
- 2=Madeira
- 3=Querosene, Diesel
- 4=Eletricidade
- 5=Outros (especificar)
- 6=Não sei

N	Da idade de	À idade de	Métodos de aquecimento	Métodos de cozimento
1	_ _ _	_ _ _	_	_
2	_ _ _	_ _ _	_	_
3	_ _ _	_ _ _	_	_
4	_ _ _	_ _ _	_	_
5	_ _ _	_ _ _	_	_

3. História Ocupacional

3.1 Você já trabalhou tempo integral por pelo menos 1 ano?

(1) Sim (2) Não |_|

3.2 Com qual idade começou a trabalhar?(Se nunca trabalhou em tempo integral, use 98)

|_|_|_|

3.3 Listar todos os empregos nos quais o sujeito da pesquisa trabalhou por pelo menos 01 ano, iniciando do primeiro emprego. Incluir múltiplos trabalhos, quando ocorreram ao mesmo tempo, se esse for o caso. Incluir também trabalhos feitos em casa (ex. Costurar, cozinhar,..):

N	Da idade de	À idade de	Emprego, ocupação	Código	Horas/dia	***Intensidad e da atividade (1,2,3,4)
1	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_
2	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_
3	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_
4	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_
5	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_
6	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _	_ _ _	_

*** Intensidade da atividade: 1= trabalhos que podem ser realizados com a pessoa sentada; 2= trabalhos que requerem um esforço mínimo, tais como: ficar em pé, sentado ou andar devagar, que não requer esforço físico (ex: assistente de lojas, cabeleireiros, guardas, etc..) 3=trabalhos que requerem o carregamento de cargas leves, trabalho contínuo, principalmente atividades internas e

que ocasionalmente aumentam a frequência cardíaca e causam uma transpiração leve (faxineiras, enfermeiras, eletricitas, etc.); 4= empregos que requerem o carregamento de cargas pesadas, caminhadas rápidas, principalmente atividades externas, que aumentam a frequência cardíaca substancialmente e levam à sudorese intensa (e.g., minerador, pedreiro, mestre de obras, etc.)

3.4 Você ainda está trabalhando?

(1) Sim (2) Não |__|

Para as mulheres (Coloque 998 para os homens):

3.5 Se for casada, qual a ocupação atual do marido? (Se não for casada, qual a ocupação do “chefe” da casa?)..... |__||__||__|

4. Informações sobre a família e SES

4.1 O lugar que mora: |__|

(1) próprio (2) alugado (3) fornecido pelo governo ou empresa que trabalha
 (4) pertence a seus pais (5) Emprestado/favor (6) Outros (especificar)

4.2 Qual a área aproximada da sua residência (metros quadrados), excluindo jardim, sacada, área dos animais, etc..? |__||__||__||__|

4.3 Quantas pessoas da família vivem na sua casa? |__||__|

4.4 Qual o grau de instrução do chefe da casa? |__|

(1) Nulo (2) Menor que 5 anos (3) 6-8 anos.
 (4) 9-12 anos . (5) Colégio (6) Graduação (7) Pós-graduação

4.5. Quais facilidades estão presentes na sua casa?

	(1) Sim (2) Não	Em caso afirmativo, por quanto tempo você o possui (em anos) ? (No =98)
Automóvel próprio	__	__ __
Moto própria	__	__ __
TV	__	__ __
Banheiro dentro da casa	__	__ __
Aspirador de pó	__	__ __
Máquina de lavar	__	__ __
Refrigerador	__	__ __
Freezer	__	__ __
Computador	__	__ __

Mulheres (Colocar 98 para homens):

4.6 Quantas gestações teve?

4.7 Quantas crianças nasceram vivas?

5. História de doenças pessoais

5.1 Possui ou já teve alguma doença listada abaixo, confirmada pelo médico?

Doença	(1) Sim (2) Não	Idade ao primeiro diagnóstico (No = 98)
Doença reumática (dizer reumatismo)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Angina/ infarto/falha cardíaca (problema do coração)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Derrame	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Hipertensão (pressão alta)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Diabetes	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
COPD (Asma, bronquite crônica, enfizema)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Problemas renais crônicos (problemas nos rins)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Diarréia ou sangue nas fezes (por mais de um mês)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Anemia	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Doença hepática crônica (doença do fígado)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Tuberculose	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Malária	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Dengue	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Zica	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Chikungunya	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Febre Amarela	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
HIV Positivo (AIDS)	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Hepatite B,C		

5.2 Já fez alguma cirurgia? (1) Sim (2) Não

5.2.1 Em caso afirmativo, especificar o tipo de cirurgia e a idade (aproximada) na época do procedimento.

	Tipo de cirurgia	Idade
1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

_ _ _	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _ _ _ _
_ _ _	_ _ _	_ _ _	_ _ _ _ _ _ _

7. Tabagismo

7.1 Já fumou cigarros regularmente (pelo menos semanalmente por mais de 6 meses)?
(se não, vá para 8.4)

(1) Sim (2) Não |_|

7.2 Ainda fuma? (1) Sim (2) Não (8) Nunca fumou |_|

7.3 Listar o consumo de cigarro iniciando quando começou a fumar regularmente:

Da idade de	À idade	*Tipo	Qtde por dia
_ _ _ 	_ _ _	_	_ _ _
_ _ _ 	_ _ _	_	_ _ _
_ _ _ 	_ _ _	_	_ _ _
_ _ _ 	_ _ _	_	_ _ _

***Tipo: 1=Fabricado e com filtro; 2=Fabricado sem filtro; 3=Não fabricado (de palha); 4=Fumo de masc**

7.4 Já fumou charuto regularmente? (Se não, vá para o item 8.5)
(Semanalmente ou por mais de seis meses)

(1) Sim (2) Não |_|

7.4.1 Se sim, listar o consumo:

<i>Produto</i>	Já usou (1)Sim (2) Não			
Charuto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Idade de início	Idade de término	Dias/semana
		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

8. Consumo de álcool

8.1 Já consumiu bebidas alcoólicas regularmente? (Por pelo menos uma vez por semana por mais de 6 meses)

(1) Sim

(2) Não

8.2 Se sim, por favor especifique:

<i>Produto</i>	Utilizou (1)Sim (2) Não	Se já utilizou			
Cerveja	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Idade de início	Idade de término	Qtde média utilizada por drinque.	Qtde por dia/mês que bebia (cc)
		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Bebida destilada (ex. Vodka, Whisky, Gim, etc.)	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
Cachaça	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
Outras	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _
	_	_ _ _	_ _ _	_	_ _ _

9. Histórico de uso de medicamentos

9.1 Já usou medicamentos regularmente?

(1) Sim

(2) Não

|_|

9.2 Se sim, listar os nomes dos medicamentos e a frequência de uso (todos os tipos incluindo contraceptivos e vitaminas).

Nome	Uso atual (1) Sim (2) Não	Duração (anos)	Frequência*	Dose
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_
.....	_	_ _ _	_

* Frequência: (1) Diária ou mais que 20 dias por mês

(2) Semanalmente

(3) Mensalmente ou em menor frequência (por tratamentos prolongados, por exemplo, 3-4 semanas)

9.3 Uso anti-inflamatórios (Exemplos: Flotac, Toragesic, Ponstan, Ibuprofeno) ?

(1) Sim (2) Não |__|

Se sim, especifique abaixo,

Idade de início	Idade de término	Dias/semana
_ _ _	_ _ _	_ _ _
_ _ _	_ _ _	_ _ _
_ _ _	_ _ _	_ _ _

9.4 Qual a última vez que usou antibióticos? |__||__|

(1) Faz uso atual (2) Usou pela última vez a uma semana (3) Usou a cerca de um mês

(4) entre um e seis meses (5) a pelo menos um ano (6) Mais de um ano

(7) Nunca usou (8) Não se lembra

10. Saúde bucal

10.1 Perdeu algum dente permanente?

(1) Sim (2) Não |__|

10.1.1. Se Sim, com qual idade (aproximada) ? (Não =98)? |__||__|

10.2 Faz uso de Próteses/dentaduras parcialmente ou totalmente?

10.2.1 Superior: (1) Sim (2) Não |__|

10.2.2 Inferior (1) Sim (2) Não |__|

10.3 Utiliza a Próteses/dentadura durante o dia?

10.3.1 Superior: (1) Sim (2) Não (8) Não tem |__|

10.3.2 Inferior (1) Sim (2) Não (8) Não tem |__|

10.4 Com qual idade começou a utilizar Prótese/dentadura ou ponte? (Não= colocar 98).

10.4.1 Superior |__||__|

10.4.2 Inferior |__||__|

10.5 Quantas vezes por dia escova os dentes? |__|

(1) 1 vez (2) 2 vezes (3) 3 vezes (4) Não escova os dentes

(5) Outros |__|

10.6 Faz uso de fio dental?

(1) Diário (2) Algumas vezes na semana (3) Raramente (4) Não usa

|__|

10.7 Faz uso regular de enxaguante bucal?

(1) Diário (2) Algumas vezes na semana (3) Raramente (4) Não usa

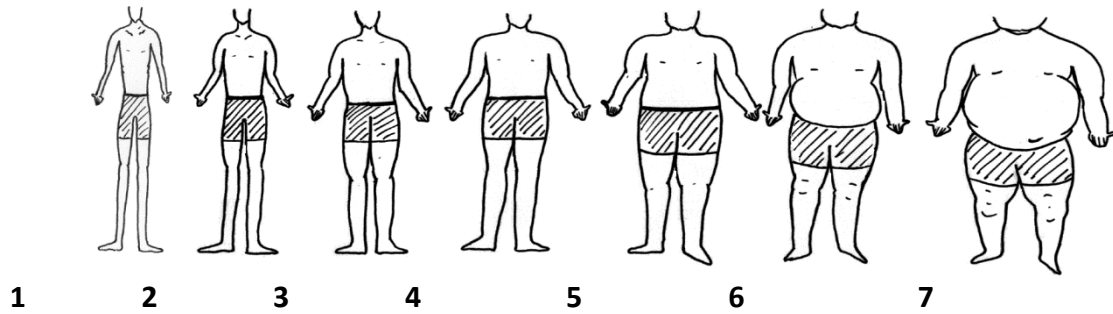
|__|

Caso se lembre, qual a marca mais usada?

11. Índices antropométricos

11.1 Peso corporal em diferentes períodos de tempo: marque como se vê em diferentes idades:

Homens



11.1.1 Por volta dos 15

|_ |

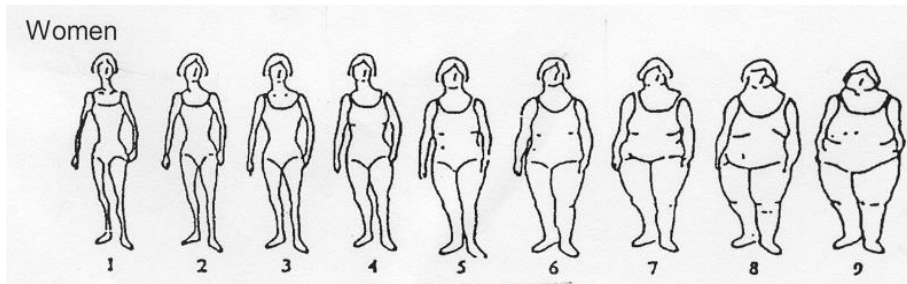
11.1.2 Por volta dos 30

|_ |

11.1.3 Agora

|_ |

Mulheres



11.1.4 Por volta dos 15

|_ |

11.1.5 Por volta dos 30

|_ |

11.1.6 Agora

|_ |

Medidas antropométricas

Altura e peso devem ser medidos sem sapatos e sem roupas largas

11.2 Altura em cm:

|_ ||_ ||_ |

11.3 Peso em kg:

|_ ||_ ||_ |

11.4 Cintura abdominal (em cm)

|_ ||_ ||_ |

11.5 Circunferência do quadril (em cm)

|_ ||_ ||_ |

12. Contato com animais

12.1 Relatar história de contato com animais desde a infância.

N	Da idade de	À idade de	Grau de contato	Animal	Animal	Animal
1	_ _ _	_ _ _	_	_	_	_
2	_ _ _	_ _ _	_	_	_	_
3	_ _ _	_ _ _	_	_	_	_
4	_ _ _	_ _ _	_	_	_	_
5	_ _ _	_ _ _	_	_	_	_

Nível de contato:

- (1) Nenhum contato
(2) Contato ocasional com os animais (ex: animais a 200 metros da residência ou do local de trabalho da pessoa);
(3) Pelo menos 01 contato animal a cada 2 semanas, mas não diário (animais são guardados na vizinhança da residência ou do local de trabalho da pessoa);
(4) Contato diário com animais (e.g., animais são deixados na residência ou no local de trabalho)
(5) Contato diário e próximo com os animais (A pessoa trabalha com animais seja na alimentação, limpeza ou abate)
(6) Contato pessoal com animal doméstico

Animais:

- (1) Equinos (e.g., cavalos, mulas, burros) (2) Ruminantes (e.g., ovelhas, cabras, gado)
(3) Cachorros (4) Gatos (5) Outros (indicar qual: _____).

Obs – Se houve contato com mais do que um do grupo de animais, indicar quais nas diferentes colunas.

13. Atividade física

13.1 Você trabalha o período todo? (todo mês)? |_|_|

(1) Sim (2) Não

13.1.1 Se não, quantos meses por ano? (Se Sim, colocar 98) |_|_|_|_|

13.2. Atividade física extenuante (como capinar) é parte da sua atividade física diária?

|_|

(1) Sim (2) Não

13.2.1. Quantas vezes por semana?

|_|

(1) Menos que dois dias por semana (2) 2-4 dias por semana (3) Diariamente (4) Nunca

13.2.3 Por quantos anos? (Colocar 98 se for não)

|_|_|_|

13.3 Faz trabalho doméstico?

|_|

(1) Sim (2) Não

13.3.1 Quantas vezes por semana?

|_|

- (1) Menos que 2 dias por semana (2) 2-4 dias por semana (3) Diariamente
 (4) Nunca

13.3.2 Quantas horas por semana? (Colocar 98 se 16.3 for não) |__||__|

13.3.3 Por quantos anos? (Colocar 98 se 16.3 for não) |__||__|

13.4 Quais os tipos de atividade físicas você faz em sua rotina (trabalho ou lazer)?

Atividade	Minutos/dia durante trabalho	Minutos/dia durante lazer ou fora do trabalho
Trabalho de casa		
Exercício suave (exemplo, caminhada)		
Exercício moderado (exemplo, voleibol)		
Exercício extenuante (exemplo, correr)		
Assistir TV, internet, ler		

14. Coleta de amostras biológicas

14.1 Swab bucal foi coletado ? (1=Sim, 2=Não) |__|

14.2 Biópsia? (1=Sim, 2=Não) |__|

14.2.1 Tipo? (1= Incisional, 2= Excisional) |__|

14.3 Dados clínico-histopatológicos

Presença clínica da lesão: () Sim () Não

Localização anatômica	<input type="checkbox"/> Palato <input type="checkbox"/> Mucosa labial superior <input type="checkbox"/> Mucosa labial inferior <input type="checkbox"/> Vermelhão do lábio <input type="checkbox"/> Rebordo alveolar <input type="checkbox"/> Mucosa jugal D/E <input type="checkbox"/> Assoalho bucal <input type="checkbox"/> Língua (dorso/ventre/bordos laterais) <input type="checkbox"/> Região retromolar.
Diagnóstico clínico das lesões orais potencialmente malignas OBS. Realizar registro fotográfico	<input type="checkbox"/> Leucoplasia <input type="checkbox"/> Leucoplasia Verrucosa Proliferativa <input type="checkbox"/> Eritroleucoplasia <input type="checkbox"/> Eritroplasia <input type="checkbox"/> Queilite actínica <input type="checkbox"/> Líquem plano/Reação liquenoide
Característica da lesão oral	<ul style="list-style-type: none"> ● Lesão fundamental <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Mácula <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Erosão <input type="checkbox"/> Crosta

	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: <input type="checkbox"/> Leucoplásico <input type="checkbox"/> Eritroleucoplásico <input type="checkbox"/> Eritroplásico <input type="checkbox"/> Verrucoso <input type="checkbox"/> Outro
	<ul style="list-style-type: none"> • Sítios: <input type="checkbox"/> Único <input type="checkbox"/> múltiplos.
Tratamento antineoplásico	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <ul style="list-style-type: none"> • Qual: <input type="checkbox"/> Radioterapia <input type="checkbox"/> Quimioterapia <input type="checkbox"/> Associação RT/QT <input type="checkbox"/> Outros
Tipo de biópsia	<input type="checkbox"/> Incisional: <input type="checkbox"/> Excisional:
Diagnóstico Histopatológico (Anexar Laudo)	
Presença de Displasia Epitelial	<ul style="list-style-type: none"> • Classificação - OMS (2005) <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Intensa
GRUPO: _____	

15. Alimentos e água

- 15.1 Qual a fonte de sua água atual ? ||
(1) Encanada Poço (2) Poço (3) Água corrente (4) Outras
- 15.2 Se for água encanada, há quanto tempo a utilize como fonte? (98 para os que não utilizarem) ||||
- 15.3 Se atualmente for água encanada, qual era a fonte de água utilizada antes ?
(1) Encanada (2) Poço (2) Água corrente (3) Outras..... ||
- 15.4 Como preserva sua comida? ||
(1) Em refrigerador, em recipientes fechados (2) Em refrigerador, em recipientes abertos
(3) Fora do refrigerador, em caixas fechadas (4) Fora do refrigerador, em caixas abertas
(5) No sal (6) Outros modos
- 15.5 Onde faz as suas refeições? (1= Casa, 2= Fora de casa) ||
- 15.6. Como prepara sua comida?
(0) Nunca (1) Raramente (2) Geralmente (3) Maioria das vezes

<i>Tipo de cozimento</i>	<i>Vegetais</i>	<i>Carnes</i>	<i>Peixe</i>
Fritura "rasa"	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Fritura com muito óleo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Churrasco	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Grelhado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cozido	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Outros.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

- 15.7 Nos últimos 10 anos, seu consumo dos itens abaixo
(1) aumentou (2) diminuiu (3) não houve alteração
- 15.7.1 Frutas frescas ||
- 15.7.3 Vegetais frescos ||

15.7.4 Carne fresca

|__|

16. Avaliação do entrevistador

16.1 Nome e código do entrevistador:

|__| |__|

16.2 Integralidade da entrevista: (1) Completa (2) Parcialmente completa

|__|

16.3 Qualidade da entrevista

(1) Boa (2) Mediana (3) Ruim

|__|

16.4 Se a entrevista não estiver completa, forneça as razões para a falta de dados.

|_

(1) Impedimento físico

(2) Recusa

(3) Impedimento

mental

(4) Falta de tempo

(5) Outros (especificar) _____

16.5 Identidade do entrevistado:

|__|

(1) Sujeito do estudo

(2) Cônjuge

(3) Outro parente, especificar

(4) Outra pessoa (especificar)

.....