



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JAMILE DE OLIVEIRA SÁ

**POTENCIAIS MARCADORES EM FIBROBLASTOS E VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE LEUCOPLASIA ORAL PODEM ANTECIPAR A
TRANSFORMAÇÃO MALIGNA PARA CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Piracicaba
2021

JAMILE DE OLIVEIRA SÁ

**POTENCIAIS MARCADORES EM FIBROBLASTOS E VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE LEUCOPLASIA ORAL PODEM ANTECIPAR A
TRANSFORMAÇÃO MALIGNA PARA CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dra.^a Adriana Franco Paes Leme

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA POR JAMILE DE OLIVEIRA SÁ E ORIENTADA PELA
PROF.^a DRA.^a ADRIANA FRANCO PAES LEME.

Piracicaba
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Sá, Jamile de Oliveira, 1987-
Sa11p Potenciais marcadores em fibroblastos e vesículas extracelulares de leucoplasia oral podem antecipar a transformação maligna para carcinoma espinocelular oral / Jamile de Oliveira Sá. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriana Franco Paes Leme.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Neoplasias bucais. 2. Carcinoma de células escamosas oral. 3. Leucoplasia bucal. 4. Fibroblastos associados a câncer. 5. Proteômica. 6. Vesículas extracelulares. I. Leme, Adriana Franco Paes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Potential markers in fibroblasts and extracellular vesicles of oral leukoplakia can anticipate malignant transformation to oral squamous cell carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Mouth neoplasms

Oral squamous cell carcinoma

Leukoplakia, oral

Cancer-associated fibroblasts

Proteomics

Extracellular vesicles

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Adriana Franco Paes Leme [Orientador]

André Zelanis Palitot Pereira

Vanessa Moraes Freitas

Patricia Pintor dos Reis

Márcio Ajudarte Lopes

Data de defesa: 26-11-2021

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5807-4403>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9137055848481104>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de novembro de 2021, considerou a candidata JAMILE DE OLIVEIRA SÁ aprovada.

PROF^a. DR^a. ADRIANA FRANCO PAES LEME

PROF. DR. ANDRÉ ZELANIS PALITOT PEREIRA

PROF^a. DR^a. VANESSA MORAIS FREITAS

PROF^a. DR^a. PATRICIA PINTOR DOS REIS

PROF. DR. MÁRCIO AJUDARTE LOPES

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Para meus avós maternos, **Maria José e Coriolando Rocha de Oliveira** (*em memória*), raízes frondosas que sempre sustentaram toda a família, verdadeiros significados de amor e esperança. Para minha amada mãe, **Célia Rocha**, que sempre dedicou sua vida em prol das necessidades e sonhos dos seus filhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Antônio José de Almeida Meirelles**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

À **Profª. Drª. Karina Gonzales Silvério Ruiz**, Coordenadora Geral da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**.

Aos Professores das áreas de Patologia Oral e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, **Drs. Alan Roger dos Santos-Silva, Edgar Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas e Ricardo Della Coletta**, pela dedicada atenção e valiosos ensinamentos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), na pessoa do seu diretor **Dr. Kleber Gomes Franchini**, pela privilegiada infraestrutura que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP) “Octavio Frias de Oliveira”, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Giovanni Guido Cerri**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** pela concessão de bolsa de doutorado nos primeiros anos do curso (Código de Financiamento 001).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo imprescindível apoio financeiro através da concessão de bolsa de doutorado (Processo nº 18/15728-3) com reserva técnica.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Esses quatro anos de doutorado têm sido marcados por coragem e amadurecimento. O único pensamento de quem conseguiu sair da interiorana e pacata Lençóis/Ba para estudar foi acreditar que iria dar certo. A força afetiva da família me impulsiona em absolutamente todos os momentos e, apesar de estar longe de casa, das pessoas que tanto amo, das cachoeiras que me faziam sentir paz e idealizar o futuro, dos sabores da comida de vovó e de Mainha, das indescritíveis vivências do interior, eu nunca estive sozinha.

Aos meus pais, **Célia Rocha** e **Alberto Sá**, que sempre primaram pela educação. Obrigada por todos os cuidados, incentivo constante e amor incondicional, por confiarem em mim nessa trajetória de estudos.

Agradeço aos meus avós maternos, **Maria José** e **Coriolando Rocha**, com os quais sempre tive uma indescritível ligação amorosa e imensa admiração. Apesar de nunca terem estudado e de pouco saberem ler e escrever, sempre acreditaram no valor e na importância do conhecimento e incentivaram seus filhos e netos a estudar.

Aos meus irmãos, **Laís** e **Acácio**, por me permitirem seguir adiante com os meus sonhos, mesmo quando o tempo não era propício para sonhar.

Agradeço a todos os meus queridos da Família Rocha de Oliveira, especialmente aos meus tios **Silvina**, **Silvano**, **Carmélia**, **Silvandira**, **Sílvio** e **Valéria** por me incentivarem e por se alegrarem com as minhas conquistas.

À minha tia **Valéria Rocha**, que sempre foi uma inspiração e influência para minha vida. Obrigada por contar um pouco da trajetória do doutorado em forma de cordel, que ilustra de forma leve essa caminhada.

A **Antônio Menezes** e **Shirley Schram**, que me acolheram em Salvador/Ba quando eu ainda sonhava em cursar o ensino superior. Obrigada por todo incentivo, cuidados e todo amor que me fizeram chegar até aqui.

À Prof.^a **Dr.^a Adriana Franco Paes Leme**, minha orientadora, exemplo de vivacidade, entusiasmo, comprometimento e paixão pela pesquisa. Sempre atenciosa, prestativa e compreensiva, sou muito grata por ter me auxiliado durante todo esse período. Agradeço pelo tempo que me dedicou para transmitir os ensinamentos com generosidade e paciência, pela oportunidade de aprender com a senhora e poder desfrutar de um ambiente de excelência em pesquisa e intensa interação científica e profissional. Obrigada por confiar no meu trabalho e por cada oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Ao Prof. **Dr. Márcio Ajudarte Lopes**, minha admiração pelo cuidado com que trata e conduz os seus alunos e especialmente cada um dos pacientes. Agradeço a inestimável acolhida à FOP-UNICAMP, por contribuir em minha formação, por sua permanente solicitude em todas as fases do projeto, bem como pelo cuidado e diligência na busca das informações clínicas dos pacientes atendidos no Orocentro que aceitaram participar desta pesquisa.

À Prof.^a **Dr.^a Silva Regina de Almeida Reis**, um exemplo admirável de dedicação ao ensino e à pesquisa, obrigada por me apresentar a patologia oral, por sempre ter me incentivado a adentrar na vida acadêmica. Sou imensamente grata por sua confiança e especialmente pelo carinho maternal.

Ao Grupo de Espectrometria de Massas do LNBio, que me acompanhou nesta jornada de desenvolvimento profissional e pessoal. Que benção fazer parte de um grupo em que todos se ajudam e estão dispostos a fazer ciência. É muito gratificante conviver e aprender com vocês!

À **Ana Karina**, minha Mainha paulistana! Todos os agradecimentos aqui seriam insuficientes para corresponder o acolhimento e suporte durante esses anos. Muito obrigada por ter conduzido o cultivo das amostras enquanto eu ainda morava em Piracicaba, por cada minuto dedicado em me ensinar sobre cultura de células e por ter acreditado em mim antes mesmo que eu acreditasse. Agradeço por me guiar no mundo da biologia molecular e especialmente por sua maestria em tornar meus argumentos mais claros e precisos. Sua parceria e amizade foram primordiais no desenvolvimento desta tese de doutorado e sem dúvidas no meu amadurecimento pessoal. E claro, muito obrigada por me abrigar em sua casa nos últimos meses de experimento.

Ao **Leandro Xavier**, exemplo de excelência, prestatividade e comprometimento à ciência. Muito obrigada pelo primor com que me auxiliou nesse trabalho, por sua disponibilidade e atenção em explicar os mais incríveis detalhes em espectrometria de massas e por todos os ensinamentos proteômicos compartilhados com maestria.

À **Ariane Lopes**, por me apresentar ao mundo da expressão gênica, por todo o auxílio e ensinamentos desde quando cheguei ao LNBio até as mais complexas análises de bioinformática. Agradeço por toda paciência, por sua sincera amizade e por todos os nossos momentos de prosa com café.

Ao **Guilherme Câmara**, que de forma tão organizada e prestativa me ajudou em todo planejamento e execução dos experimentos de RT-qPCR e por nossas conversas descontraídas e animadas.

À **Tatiane De Rossi** pela sincera amizade, acolhimento e maravilhosa convivência desde quando cheguei ao LNBio.

À minha querida amiga **Aline Santana** por dividir comigo as alegrias e dificuldades durante o doutorado, transpassando o cotidiano profissional

À pessoa mais fofa que possa existir, **Luciana Trino**! Agradeço pela sensível escuta, pela sincera amizade e pelas palavras de suporte e conforto que sempre me amparavam nos melhores e nos mais difíceis momentos. Obrigada por seu incentivo, pela paz de espírito que você transmite, por sua alegria com as minhas conquistas. E claro, muito obrigada por toda ajuda e paciência.

À **Ana Gabriela Normando e Erison Santos**, especialmente pela prontidão e cuidado nas coletas das amostras teciduais, por toda colaboração durante esse projeto e pelo feliz convívio durante este período.

À **Elyara Safra** por toda ajuda prestada neste trabalho durante o seu estágio de iniciação científica, por ter concretizado as minhas ideias de figuras para o artigo. Obrigada por nossos momentos de diálogos divertidos.

À **Bianca Pauletti e Romênia Domingues**, pela atenção às análises de espectrometria de massas e pela convivência maravilhosa.

À **Sami Yokoo**, lindinha – *oxente!* - por toda ajuda carinhosamente prestada, pela amizade e feliz convívio durante esse período. Agradeço por toda paciência desde os ensinamentos de pipetagem até os mais valiosos conselhos. Obrigada por sempre se fazer presente, especialmente nos momentos decisivos.

À **Carolina Carnielli e Daniela Granato** pela amizade e por estarem sempre dispostas a dividir o que sabem, pela cuidadosa paciência em ouvir minhas histórias e pelos momentos alegres durante esse período.

À **João Ormonde e Larissa Tinô** pelo conhecimento compartilhado e pelo feliz convívio.

Ao Prof. **Dr. César Andrés Rivera Martinez** pelas relevantes e instigantes discussões sobre a patologia e pela convivência durante o seu doutorado no LNBio.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação em Estomatopatologia, com os quais tive o prazer de conviver e aprender. Agradeço em especial a **Felipe Martins, Amanda Leite, Carla Rodrigues, Reydson Alcides, Eduarda Perez, Gleyson Amaral**, e à agregada especial da patologia, **Daniele Ferreira**.

À **Thayná Moraes, Anna Luíza Damasceno e Erison Santos**, agradeço a primorosa colaboração nas análises histopatológicas das leucoplasia orais utilizadas neste trabalho.

Em especial, agradeço à **Anna Luíza Damasceno**, que sempre esteve presente, compartilhando a dores e as delícias da jornada acadêmica desde o dia em que realizamos a prova de seleção. Obrigada por todos os incentivos, pelo zelo e pela calorosa generosidade da qual jamais me esquecerei.

Ao meu inesquecível amigo **Pedro Augusto Bulhões Curioso** (*em memória*), o qual tive a oportunidade de conhecer no primeiro dia que também conheci Piracicaba. Obrigada pela feliz convivência que apesar de breve, guardo no coração a saudade e as melhores lembranças em sua companhia. Se você estivesse hoje aqui, com certeza estaríamos rindo juntos.

À minha grande amiga **Ana Carolina Laurindo**, que mesmo antes de me conhecer já havia disponibilizado sua casa para minha estadia durante a seleção do doutorado. Obrigada por me acolher em Piracicaba, por me amparar e ajudar sempre! Obrigada por nossas risadas, por todos os momentos alegres que compartilhamos juntas. Você sabe que o seu apoio foi fundamental em muitos momentos ao longo desses anos.

À minha querida e especial amiga **Joana Daniele Brandão**, que me acompanha desde os tempos da faculdade e que sempre está ao meu lado, que me socorre e sempre escuta todas as minhas histórias. Obrigada por sua sincera e divertida amizade, desde sempre.

À equipe do Orocentro da FOP-Unicamp, **Daniele Morelli, Maria Aparecida** (*em memória*), **Dr. Rogério, Dra. Elisabete, Dra. Karina, Dra. Érika** e aos **Prof. Dr. Márcio e Alan**. Agradeço também os colegas da pós-graduação que cuidadosamente coletaram as amostras teciduais para esta pesquisa durante o atendimento aos pacientes: **Isabel, Patrícia, Jéssica, Marisol, Natália, Bruno, Mariana, Diego, Raísa, Leonardo, João, Paola, Carla, Isadora, Juliana e Ana Gabriela**.

Ao Biobanco do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, ICESP, especialmente a **Miyuki Uno, Maria José e Liliane** por toda colaboração e prestatividade durante as coletas das amostras teciduais.

À **Ana Carolina Prado Ribeiro**, por sua gentileza e eficiência em confirmar os dados clínico-patológicos dos participantes desta pesquisa no ICESP.

Aos **pacientes**, que confiaram na ciência e permitiram a coleta das amostras e dos seus dados clínico-patológicos para a realização deste estudo.

À querida Família Cunha, por ter me recebido com tanto amor e carinho. Não tenho palavras para agradecer a preocupação diária e todo apoio de vocês nesse pouco tempo de convivência. Agradeço especialmente aos meus sogros, **Rosângela e Eduardo** pela calorosa acolhida, pelos cuidados e todo incentivo.

Ao amor da minha vida, meu companheiro, meu melhor amigo, parceiro de todos os momentos, **Matheus Cunha**. Impossível conseguir te agradecer por tudo nesse pouco espaço e encontrar palavras que possam traduzir toda a felicidade que você me proporciona. Obrigada pelo sorriso leve, pela compreensão, pelo zelo com que conduz todas as coisas, por toda preocupação e cuidados diários e por seu apoio incondicional em todos os momentos, especialmente durante a finalização desta tese. Que feliz é dividir a vida com você!

Por fim, agradeço a todas as demais pessoas que encontrei ao longo dessa jornada, seja em Piracicaba, Campinas ou São Paulo, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste projeto, que me acolheram, me ajudaram e se fizeram presentes nos momentos mais difíceis e também nos mais alegres.

Cordel Jamile e o Doutorado

Na cidade de Lençóis
Viveu aquela menina
Cidade pequena e linda
Da Chapada Diamantina
Morava com seus avós
E deles era o xodó
Naquela simples rotina

De manhã, logo cedinho
Seu avô lhe acordava
Lhe puxava o dedão
Ou então assoviava...
Era seu despertador!
Mas sempre com muito amor.
Ela logo despertava.

Tomavam aquele café
Ela com seus dois irmãos
Vovô fazia beijú
Cuscuz, café, leite e pão.
Depois iam para escola
Com um suco de acerola
Pra hora da diversão.

Cresceu muito estudiosa
Também muito responsável
Sua mãe então lhes dava
Uma vida confortável
Sem excesso ou exageros...
Trabalhava o ano inteiro
Mulher muito admirável!

Jamile bem decidida
Sobre o que ia fazer
Passou no vestibular
Com barreiras por vencer...
Deixando a família e o lar
Saindo para estudar
E na capital viver.

Foi pra casa de amigos
Apoio fundamental
Tonho e Schrley lhe acolheram
De um modo especial.
Cursou Odontologia
Concluiu com maestria
O seu sonho inicial.

Seu avô todo orgulhoso
No Rancho do Garimpeiro
Falava pra todo povo
Do Brasil e do estrangeiro
Afirmando ao turista:
- Minha neta é dentista!
Contando o seu paradeiro.

Atuou em sua área
Servindo na sua cidade
Cativou o povo todo
De pouca ou muita idade
Mas, seu desejo crescia
De voltar pra academia
Sonho em continuidade...

Foi assim que dedicou
Muito esforço pro Mestrado
E ganhou experiência
Lidando com alunado
No ensino superior
Professora de valor
De saber mais ampliado.

Naquilo que se dispõe
Sempre é bem competente
Fica imersa nos estudos
Na pesquisa segue em frente!
Mudou-se então de Estado
Pra fazer seu Doutorado
Se afastando dos parentes.

Alguns anos de estudo
De pesquisa e escrita
Produzindo sua tese
Numa jornada bonita.
Título, capelo e capa
Concluindo nova etapa
O seu coração palpita!!!

A família inteira vibra
Por seu bem e seu sucesso
Tá de longe, mas, tá perto.
Acompanhando o processo.
Na mente tá bem no seio:
A sua vinda à Passeio
Mesmo num breve regresso.

Autora: Valéria Rocha

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, com 377.713 novos casos estimados em 2020 (Globocan, 2020). Apesar dos avanços em pesquisas e terapias não houve melhora significativa nas taxas de sobrevida, estimando-se que apenas 50% dos pacientes sobrevivem após cinco anos do diagnóstico. Portanto, o diagnóstico precoce e o tratamento das condições que apresentam risco de se transformar em câncer, como a leucoplasia oral (LO), é fundamental para aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, é urgente a necessidade de identificar marcadores indicativos de transformação maligna para auxiliar no diagnóstico e prognóstico, bem como na orientação sobre as decisões de tratamento. A comunicação entre as células no microambiente pré- e tumoral (MT) é decisiva para efetivar a progressão do tumor e os fibroblastos são uma das principais células envolvidas nesse processo, chamados fibroblastos associados ao câncer (do inglês CAF - *carcinoma-associated fibroblasts*). As vesículas extracelulares (VEs) liberadas por CAFs são capazes de modular um MT fibrótico e imunossupressor, favorável ao crescimento, invasão e metástase. Entretanto, pouco se sabe sobre a sinalização promovida por meio das VEs liberadas pelos fibroblastos durante o processo de malignização. Dessa forma, para identificar proteínas associadas à transição da LO para CEC oral, esse estudo caracterizou as populações de fibroblastos isolados de tecido controle não maligno (NAFs), leucoplasia oral (LAFs) e CEC oral (CAFs) e comparou o perfil proteômico das células e das suas VEs empregando a proteômica baseada em espectrometria de massas. Inicialmente foi realizada caracterização das células por marcadores de fenótipo por RT-qPCR, revelando que os LAFs mostraram expressão diminuída do marcador apCAF *SLPI* e os CAFs apresentam assinatura miofibroblástica, com expressão diferencial de *ACTA2*⁺, *POSTN*⁺, *TAGLN*⁺, *PDPN*⁺, *THY1*⁺, *CXCL12*⁺ e *SLPI*⁺. As VEs foram analisadas por tamanho e número por análise de rastreamento de nanopartículas indicando um tamanho médio de 116,0 (±18,1) nm. Foram identificadas 1.529 proteínas no conjunto de células e 756 no conjunto de VEs, sendo 19 e 46 estatisticamente significantes, respectivamente. O agrupamento de pacientes, baseando-se no padrão de abundância das proteínas de células e VEs, revelou características clínicas associadas com a malignização e progressão tumoral. Além disso, o agrupamento da abundância proteica permitiu o reconhecimento de três padrões distintos, caracterizados principalmente por vias que modulam o sistema imune e regulam o citoesqueleto de actina e a migração celular. Três proteínas em células e uma proteína em VEs foram diferenciais entre LAF e CAF em relação a NAF. Particularmente, o aumento de abundância de AK1 em LAF-cel e CAF-cel apresenta correlação significativa com o tamanho das lesões de LO e a diminuição de abundância de TNFRSF11B em LAF-ve e CAF-ve apresenta associação com a ausência de variação anormal do tamanho do núcleo dos casos de LO e ausência de invasão angiolinfática dos casos de CEC oral. Dessa forma, essas proteínas são candidatas potenciais para antecipar a transição para malignização, podendo auxiliar no prognóstico das LO, bem como contribuir na orientação sobre as decisões individuais de tratamento.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Carcinoma de células escamosas oral. Leucoplasia bucal. Fibroblastos associados a câncer. Proteômica. Vesículas extracelulares.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the head and neck region with 377,713 new cases estimated in 2020 (Globocan, 2020). Despite advances in research and local and systemic therapies, no significant improvement in survival rates has been achieved, with an overall 5-year survival rate of around 40-50%. Therefore, early diagnosis and treatment of lesions at risk of developing into cancer, such as oral leukoplakia (OL), are essential to increase the patient survival. In this context, there is an urgent need to identify markers of malignant transformation to aid in diagnosis and prognosis, as well as, in guiding treatment decisions. The communication between cells in the pre-and tumoral microenvironment (TM) is decisive for the progression of the tumor. The main cells involved in this process are the fibroblasts, known as carcinoma-associated fibroblasts (CAFs). Especially, the extracellular vesicles (EVs) released by CAFs can modulate a fibrotic and immunosuppressive TM, favoring the cell growth, invasion, and metastasis. However, little is known about the signaling processes promoted by fibroblast-derived EVs during the oral malignant transformation. Thus, to identify proteins associated with malignancy, this study characterized populations of fibroblasts isolated from control tissue (NAFs), oral leukoplakia (LAFs), and CAFs and compared the proteomic profile of the cells and their EVs using mass spectrometry-based proteomics. Initially, the characterization of the cell phenotypes was performed by RT-qPCR, revealing decreased expression of *SLP1*-, associated with antigen presentation, in LAFs and CAFs when compared to NAFs. CAFs showed a myofibroblastic signature, with differential expression of *ACTA2*+, *POSTN*+, *TAGLN*+, *PDPN*+, *THY1*-, *CXCL12*- and *SLP1*- in comparison with NAFs and/or LAFs. The EVs had similar mean size and number between groups, 116.0 ± 18.1 nm, and $1.09E+12 \pm 4.14E+11$ particles, respectively. A total of 1,529 proteins in cells and 756 in EVs were identified, being 19 and 46 statistically significant proteins, respectively. The protein abundance profile of cells and EVs determined the patients' clusters, which indicated clinical characteristics associated with malignancy and tumor progression. Furthermore, it also led to the recognition of three distinct patterns between NAFs, LAFs, and CAFs, mainly characterized by pathways that modulate the immune system and regulate the cytoskeleton and cell migration. Among the significant proteins that showed clinical correlation, three proteins in cells and one protein in VEs showed differential abundance in LAFs and CAFs relative to NAFs. Particularly, the increased abundance of AK1 in LAF-cells and CAF-cells correlated with the size of OLs lesions, and the decreased abundance of TNFRSF11B in LAF-ev and CAF-ev was associated with the absence of abnormal size variation of cell nuclei in OLs and absence of angiolymphatic invasion in OSCC. Therefore, AK1 and TNFRSF11B are potential candidates for anticipating the transition to malignancy, being able to assist in the diagnosis and prognosis of OLs, as well as to guide individual treatment decisions.

Keywords: Mouth neoplasms. Oral squamous cell carcinoma. Leukoplakia, oral. Cancer-associated fibroblasts. Proteomics. Extracellular vesicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delineamento experimental. **A.** Culturas celulares primárias de fibroblastos orais humanos foram estabelecidas a partir de fragmentos teciduais de tecido controle não maligno, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral. Os tecidos foram coletados imediatamente após excisão cirúrgica. Todas as amostras foram cultivadas em meio DMEM completo por aproximadamente 3 semanas até o isolamento de VEs e coleta das células para os experimentos subsequentes. **B.** As VEs foram isoladas por centrifugação e ultracentrifugação diferencial e caracterizadas por rastreamento de nanopartículas (NTA). O fenótipo celular foi caracterizado por RT-qPCR para identificar populações de fenótipo myCAF, iCAFs e apCAF. **C.** As células e suas VEs foram submetidas a extração de proteínas e digestão com tripsina. A mistura de peptídeos foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* por proteômica baseada em descoberta (LCMS/MS). Os dados foram analisados software MaxQuant e Perseus e os alvos proteicos das células e VEs foram selecionados após correlação aos dados clínico-patológicos dos pacientes.....46

Figura 2 - Fotomicrografias de contraste de fase mostrando fibroblastos primários isolados a partir da técnica do explante, crescidos em diferentes densidades celulares. Morfologicamente essas células apresentaram aspecto típico fusiforme ou estrelado. **A-B.** NAFs migrando do explante de tecido controle não maligno na passagem 0 (barras de escala em 400µm). **C.** Linhagem de NAFs estabelecida na passagem 3 (barras de escala em 400 µm). **D.** LAFs migrando do explante de LO (passagem 0, barras de escala em 400µm). **E-F.** LAFs na passagem 2 e 3, respectivamente (barras de escala em 200µm). **G.** CAFs migrando do explante de CEC oral na passagem 0 (barras de escala em 200µm) **H.** CAFs na passagem 2 (barras de escala em 400µm). **I.** Detalhes da morfologia de uma linhagem de CAF oral na passagem 3 (barras de escala em 400µm).....74

Figura 3 - Caracterização de marcadores de fenótipos dos NAFs-cel, LAFs-cel e CAF-cel por RT-qPCR. **A.** Painel completo dos marcadores avaliados mostra o agrupamento hierárquico das amostras (12 NAFs, 9 LAFs e 22 CAFs) de acordo com o perfil panF, myCAF, iCAF e apCAF. Os valores de expressão gênica relativa foram transformados em *z-score*, usando a correlação de Pearson com o método Ward. **B.** Expressão relativa dos genes estatisticamente diferenciais entre os grupos ($p\text{-valor} \leq 0,05$). A diferença estatística significativa entre dois grupos foi representada por barra e asteriscos, onde * representa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **C.** Painel dos marcadores diferenciais mostra o agrupamento hierárquico das amostras (12 NAFs, 9 LAFs e 22 CAFs) de acordo com o perfil panF, myCAF, iCAF e apCAF. Os valores de expressão gênica relativa de cada marcador foram transformados em *z-score*, usando a correlação de Pearson com o método Ward.....77

Figura 4 - Caracterização das 14 NAFs-ve, 11 LAFs-ve e 22 CAF-ve. **A.** Gráficos mostram os tamanhos (nm) e concentrações (partículas/mL) de NAF-ve, LAF-ve e CAFs-ve. **B.** Agrupamento hierárquico mostra abundância ($\log_2$ LFQ *intensity*) das proteínas marcadoras de VEs transformadas em *z-score*. **C.** Proteínas únicas e compartilhadas entre NAF-ve, LAF-ve e CAFs-ve entre os bancos de dados públicos Vesiclepedia e ExoCarta.....79

Figura 5 - Análise quantitativa do proteoma de células e VEs das amostras de NAF (n=14), LAF (n=11) e CAF (n=22). A. Proteínas comuns e compartilhadas identificadas nas análises de células. B. Proteínas comuns e compartilhadas identificadas nas análises de VEs. C. Gráfico da intensidade e número de proteínas das células e VEs. D. Diagrama de Venn mostra o número de proteínas identificadas unicamente em células e VEs e o número de proteínas compartilhadas entre esses proteomas (análise baseada no número de acesso do protein groups). E. Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes (Benjamini e Hochberg, $FDR \leq 0,05$) avaliados do proteoma das células, VEs e das proteínas compartilhadas entre células e VEs (Top 15).....82

Figura 6 - A. Agrupamento hierárquico do perfil proteômico de células (TN=14, LO=11, CEC=22). A primeira barra colorida mostrada no topo do heat map indica as amostras de NAF-cel (azul), LAF-cel (laranja) e CAF-cel. (vermelha). Análise de agrupamento hierárquico foi realizada em ambiente R utilizando a combinação do método e métrica Complete Euclidian (1.529 protein groups). Os pares de barras intermediárias rosa e roxo / amarelo indicam o agrupamento das amostras no dendrograma dividido em 2 e 3 clusters para as análises estatísticas dos dados clínico-patológicos dos casos. B. Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 2 clusters. C. Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 3 clusters (teste Quiquadrado de Pearson, $p \leq 0,05$).....84

Figura 7 - Agrupamento hierárquico do perfil proteômico das VEs (TN=14, LO=11, CEC=22). A primeira barra colorida mostrada no topo do heat map indica as amostras de NAF-cel (azul), LAF-cel (laranja) e CAF-cel. (vermelha). Análise de agrupamento hierárquico foi realizada em ambiente R utilizando a combinação do método e métrica Complete Braycurtis (756 protein groups). Os pares de barras intermediárias rosa e roxo / azul e verde indicam o agrupamento das amostras no dendrograma dividido em 2 e 3 clusters para as análises estatísticas dos dados clínico-patológicos dos casos. B. Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 2 clusters. C. Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 3 clusters (teste Quiquadrado de Pearson, $p \leq 0,05$).....85

Figura 8 - Estimativa do número ideal de *clusters* para o conjunto de dados proteômicos de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel, de acordo com as abundâncias de proteínas logaritmizadas na base 2, realizada na plataforma online VSClust. O número ideal foi definido pela distância mínima centróide, indicada pelo quadrado preto na imagem. O número ideal foi usado para realizar as análises de agrupamento subsequentes89

Figura 9 - Estimativa do número ideal de *clusters* para o conjunto de dados proteômicos de NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve, de acordo com as abundâncias de proteínas logaritmizadas na base 2, realizada na plataforma online VSClust. O número ideal foi definido pela distância mínima centroide, indicada pelo quadrado preto na imagem. O número ideal foi usado para realizar as análises de agrupamento subsequentes89

Figura 10 - Agrupamento do repertório proteômico de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel (primeiro gráfico, cor laranja) e análises de vias biológicas (segundo gráfico, cor azul) e componentes

celulares enriquecidos (terceiro gráfico, cor preto). As cores representadas nos clusters correspondem aos chamados valores de Membership e apresentam o grau do quanto uma proteína pertence ao cluster mais próximo entre as amostras de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel. Apenas as proteínas que apresentaram Membership >0,5 são mostradas nos clusters. As vias e os componentes celulares significativamente enriquecidos estão listadas ao lado e os resultados são mostrados em Log10 (p-valor $\leq 0,05$). Os valores de Membership são indicados no canto inferior esquerdo da figura. A. Cluster-1 mostra as proteínas mais abundante em CAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e NAFs. B. Cluster-2 mostra as proteínas mais abundante em LAFs e simultaneamente menos abundantes em NAFs e CAFs. C. Cluster-3 mostra as proteínas mais abundante em NAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e CAFs.....90

Figura 11 - Agrupamento do repertório proteômico de NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve (primeiro gráfico, cor laranja) e análises de vias biológicas (segundo gráfico, cor azul) e componentes celulares enriquecidos (terceiro gráfico, cor preto). As cores representadas nos clusters correspondem aos chamados valores de Membership e apresentam o grau do quanto uma proteína pertence ao cluster mais próximo entre as amostras de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel. Apenas as proteínas que apresentaram Membership >0,5 são mostradas nos clusters. As vias e os componentes celulares significativamente enriquecidos estão listadas ao lado e os resultados são mostrados em Log10 (p-valor $\leq 0,05$). Os valores de Membership são indicados no canto inferior esquerdo da figura. A. Cluster-1 mostra as proteínas mais abundante em CAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e NAFs. B. Cluster-2 mostra as proteínas menos abundante em LAFs e simultaneamente mais abundantes em NAFs e CAFs. C. Cluster-3 mostra as proteínas mais abundante em LAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e CAFs.....91

Figura 12 - Proteínas diferenciais entre NAFs, LAFs e CAFs por LC-MS/MS do conjunto de dados de Células (19 proteínas após *one-way* ANOVA, p-valor $\leq 0,05$) e Teste de Storey, (q-valor $\leq 0,05$) e VEs (47 proteínas após *one-way* ANOVA p-valor $\leq 0,05$) em conjunto com o pós-teste de Tukey p $\leq 0,05$93

Figura 13 - Perfil das proteínas estatisticamente significantes em relação as suas abundâncias entre NAF LAF e CAF, do conjunto de dados das Células e das VEs, que apresentaram correlação com os dados clínico-patológicos dos casos de LO e CEC oral por análises estatísticas não paramétricas. Os gráficos apresentam as associações com p-valor $\leq 0,05$ do teste U de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. A diferença estatística significativa entre dois grupos está representada por barra e asteriscos, onde * representa p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. A identidade da proteína está representada pelo respectivo nome do gene98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes alvo e referência selecionados para verificação da expressão diferencial em amostras de fibroblastos primários isolados de tecido normal, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral, de acordo com a classificação de subpopulação CAF.....	54
Tabela 2 - Dados clínicos, demográficos e de estilo de vida dos casos controle e leucoplasia oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.....	67
Tabela 3 - Dados clínico-patológicos dos casos de leucoplasia oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.....	68
Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos casos de CEC oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.....	70
Tabela 5 - Proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel por LC-MS/MS a partir do teste <i>one-way</i> ANOVA e correção de Storey ($p \leq 0,05$).....	94
Tabela 6 - Proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve por LC-MS/MS a partir do teste <i>one-way</i> ANOVA ($p \leq 0,05$).....	96

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
μ g	Microgramas
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
ACTA2	<i>Actin Alpha 2, Smooth Muscle</i>
AJCC	<i>American Joint Committee for Cancer</i>
ANOVA	Análise de Variância
apCAF	Fibroblasto Apresentador de Antígeno Associado ao Carcinoma Espinocelular Oral
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAF	<i>Carcinoma-Associated Fibroblasts</i>
CAF-ve	Vesícula Extracelular Isolada de Fibroblasto Associado ao Carcinoma Espinocelular Oral
CEC	Carcinoma Espinocelular
CANX	<i>Calnexin</i>
CAV1	<i>Caveolin-1</i>
CCL2	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CCN2	<i>Cellular Communication Network Factor 2</i>
CD47	<i>Leukocyte Surface Antigen CD47</i>
CD63	<i>CD63 Antigen</i>
CD81	<i>CD81 Antigen</i>
CD9	<i>CD9 Antigen</i>
c-DNA	DNA Complementar
CEC	Carcinoma Espinocelular
CFD	<i>Complement factor D</i>
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
COL1A1	<i>Collagen type I alpha 1 chain</i>
cTNM	<i>Clinical Tumor-Node-Metastasis</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
CXCL2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 2</i>
CXCL8	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
CYC1	<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>
DCN	<i>Decorin</i>
DDA	<i>Data-dependent acquisition</i>
DEPC	Detilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DOI	<i>Depth of invasion</i>
DOPM	Desordens Orais Potencialmente Malignas
DPT	<i>Dermatopontin</i>

DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine</i>
EMT	<i>Epitelial mesenchymal transition</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein alpha</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GUSB	Glucuronidase Beta
HBV	<i>Human hepatitis B virus</i>
HCD	<i>High-Energy Collisional Dissociation</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HF	Hiperplasia Fibrosa
HIST1H	<i>Histone H4</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSP90AB1	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>
HSP90B1	<i>Endoplasmin</i>
iCAF	Fibroblasto Inflamatório Associado ao Carcinoma Espinocelular Oral
IL6	<i>Interleukin 6</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kv	Quilovolt
LAFs	Fibroblastos-associados a Leucoplasia Oral
LAF-ve	Vesícula Extracelular Isolada de Fibroblasto-associado a Leucoplasia Oral
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas <i>in tandem</i>
LFQ	<i>Label-free Quantification</i>
LIF	<i>LIF interleukin 6 family cytokine</i>
LMNA	<i>Lamin A/C</i>
LO	Leucoplasia Oral
LVP	Leucoplasia Verrucosa Proliferativa
M	Metástase à distância
M	Molar
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
MMP11	<i>Matrix metalloproteinase 11</i>
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de Massas
MT	Microambiente Tumoral

myCAF	Fibroblasto Miofibroblástico Associado ao Carcinoma Espinocelular Oral
MYL9	<i>Myosin light chain 9</i>
N	Metástase Linfonodal
NAFs	Fibroblastos Associados ao Tecido Normal
NAF-ve	Vesícula Extracelular Isolada de Fibroblasto–associado ao Tecido Normal
ng	Nanograma
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
panF	Conjunto de Marcadores para Fibroblasto
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDCD6IP	<i>Programmed cell death 6–interacting protein</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PDGFRA	<i>Platelet derived growth factor receptor alpha</i>
PDPN	<i>Podoplanin</i>
POSTN	<i>Periostin</i>
pTNM	<i>Pathological Tumor-Node-Metastasis</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
SDCBP	<i>Syntenin–1</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor</i>
TAGLN	<i>Transgelin</i>
THY1	<i>Thy–1 Cell Surface Antigen</i>
TN	Tecido Normal
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
Tris–HCl	<i>Tris hydrochloride</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
Uniprot	<i>Universal Protein Resource</i>
VEs	Vesículas Extracelulares
VIM	<i>Vimentin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL.....	26
2.2 LEUCOPLASIA ORAL.....	31
2.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER.....	36
2.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	40
2.5 PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA.....	43
3 OBJETIVO.....	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	47
4.2 CASUÍSTICA E COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	47
4.3 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS ORAIS.....	49
4.4 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	49
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS VES POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	51
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA DOS NAFs, LAFs E CAFs.....	51
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR).....	52
4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIGESTÃO ENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS E VES PARA PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA.....	56
4.8.1 Preparação dos lisados celulares e digestão em solução.....	56
4.8.2 Preparação das VEs e digestão em gel de SDS-PAGE.....	57
4.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS) E ANÁLISE DOS DADOS BRUTOS.....	58
4.9.1 Análise das proteínas extraídas das células por LC-MS/MS.....	58
4.9.2 Análise das proteínas extraídas das VEs por LC-MS/MS.....	59
4.10 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA DE CÉLULAS E VES.....	59
4.11 CORRELAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS E EXPRESSÃO GÊNICA COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	63
5 RESULTADOS.....	65
5.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	65
5.2 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE NAFs, LAFs E CAFs ORAIS.....	72

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE FENÓTIPO CELULAR POR RT-QPCR.....	75
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS VES	78
5.5 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS A PARTIR DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA DAS CÉLULAS E VESÍCULAS EXTRACELULARES	80
5.5.1 Análise quantitativa do proteoma de células e VEs das amostras de NAF, LAF e CAF	80
5.6 OS PROTEOMAS DAS CÉLULAS E SUAS VES AGRUPAM OS CASOS DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES	83
5.7. O AGRUPAMENTO DO REPERTÓRIO PROTEÔMICO DE CÉLULAS E VES DOS NAFs, LAFs E CAFs IDENTIFICA UM PERFIL MOLECULAR DISTINTO ENTRE OS CASOS DE LO E CEC ORAL.	86
5.8 PRIORIZAÇÃO DE PROTEÍNAS-ALVO	92
5.9 PROTEÍNAS-ALVO E CORRELAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS DE LO E CEC ORAL	97
6 DISCUSSÃO.....	99
6.1 OS CAFs ORAIS APRESENTAM ASSINATURA MIOFIBROBLÁSTICA.....	99
6.2 VES ISOLADAS DE NAF, LAF E CAF SÃO ENRIQUECIDAS DE TETRASPANINAS.....	106
6.3 O REPERTÓRIO PROTEÔMICO DOS LAF-VE E CAF-VE ESTÃO ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	107
6.4 AS PROTEÍNAS PRIORIZADAS EM CÉLULAS E VES DOS NAF, LAF E CAF DESEMPENHAM PAPÉIS BIOLÓGICOS RELEVANTES	113
7 CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS	121
APÊNDICE 1 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas células (Top 15).	143
APÊNDICE 2 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas VEs (Top 15).....	146
APÊNDICE 3 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas compartilhadas entre células e VEs (Top 15).	147
ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	148
ANEXO 2 – Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio.....	170

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral é uma neoplasia maligna derivada da camada espinhosa do epitélio pavimentoso estratificado e representa aproximadamente 90%-95% do tipo histológico das neoplasias malignas que acometem a cavidade oral (Rivera & Venegas, 2014; Virgone et al., 2021). Dados atuais do *Global Cancer Observatory*, vinculado à Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde, estimam 377.713 novos casos e 177.757 mortes em decorrência do câncer de cavidade oral e lábio para o ano de 2020 (Sung et al., 2020). No cenário brasileiro, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima a ocorrência de mais de 15.000 novos casos de câncer da cavidade oral para o triênio 2020-2022, sendo o quinto tumor maligno mais incidente entre os homens (INCA, 2020). O CEC oral é considerado um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (*World Cancer Report*, 2014).

Esta neoplasia maligna se origina a partir do acúmulo de mutações e alterações epigenéticas no DNA dos queratinócitos que revestem a cavidade oral, especificamente em genes cujas proteínas codificadas atuam em uma variedade de vias de sinalização e no controle do ciclo celular, angiogênese, sobrevivência e motilidade celular (Leemans et al., 2018). Os mecanismos moleculares que desencadeiam a transformação maligna da mucosa oral ainda não foram completamente elucidados e são motivos de incessantes pesquisas (Zhang et al., 2012; Campo-Trapero et al., 2008), no entanto, resumidamente, o mecanismo genético envolvido é a superexpressão de oncogenes e o silenciamento dos genes supressores de tumor (Scully, 2011; Solomon et al., 2018; Alsahafi et al., 2019). O consumo excessivo e crônico de tabaco e álcool são os principais fatores de risco para o CEC oral, tendo juntos um efeito sinérgico (Solomon et al., 2018; Alsahafi et al., 2019; Karunakaran et al., 2020).

Sabe-se que o caminho da malignização envolve diferentes estágios de alterações teciduais bem definidos como hiperplasia, diferentes graus de displasia epitelial até o desenvolvimento do carcinoma *in situ* e deste para o carcinoma francamente invasivo (Warnakulasuriya et al., 2007; Bagan & Scully, 2009). Nesta transição, o CEC oral pode ser precedido de alterações clinicamente visíveis na mucosa oral, denominadas desordens orais potencialmente malignas (DOPM) (Warnakulasuriya et al., 2007; Maymone et al., 2019). Tais desordens são definidas como “um tecido morfollogicamente alterado”, o qual apresenta maior risco de desenvolver um carcinoma quando comparado a um tecido normal e consistem

principalmente de machas brancas (leucoplasia) ou vermelhas (eritroplasia) (van der Waal, 2014). O diagnóstico e o tratamento destas lesões são essenciais para minimizar o risco de CEC oral, no entanto, nem todas as lesões são passíveis de tratamento curativo e a transformação maligna depende de vários fatores, tais como o sítio anatômico acometido, apresentação clínica da lesão, hábitos como tabagismo e etilismo e, principalmente, a presença e a gravidade da displasia epitelial (Scully, 2014). Desse grupo, a leucoplasia oral (LO) é mundialmente a entidade mais encontrada na prática clínica e a mais estudada, com prevalência global de 4,1% (Mello et al., 2018) e índices de transformação maligna em cerca de 10%, apesar da grande variabilidade nos valores reportados na literatura (Aguirre-Urizar et al., 2021).

Muitos marcadores moleculares já foram descritos por demonstrarem capacidade estatisticamente significativa de prever a transformação maligna da displasia oral, tanto ao nível do tecido quanto em biofluidos como a saliva, entretanto, até o momento ainda não existe um marcador ou uma assinatura molecular claramente definida que possa ser usada de maneira confiável para antecipar este acontecimento (Wu et al., 2015; Monteiro et al., 2021; Sá, et al., 2021). Ademais, embora seja amplamente reconhecido que a transformação maligna das lesões potencialmente malignas seja um passo clinicamente importante na tumorigênese oral, a sua patogênese, bem como os mecanismos celulares e moleculares envolvidos ainda são pouco compreendidos (Warnakulasuriya et al., 2007; Odell et al., 2021).

A progressão tumoral envolve uma sequência de eventos que depende de muitas interações entre células tumorais e seu microambiente (Hanahan & Coussens, 2012; MacCarthy-Morrogh & Martin, 2020). Nas últimas décadas, o microambiente tumoral (MT) tem recebido crescente atenção devido aos seus papéis cruciais na supressão imunológica do tumor e nos resultados terapêuticos dos carcinomas (Chen et al., 2015; Chen et al., 2019; Paluskievicz et al., 2019; Liu et al., 2019). O MT compreende um sistema altamente heterogêneo, composto por células de origem endotelial, hematopoiética e mesenquimal e por componentes extracelulares que estão presentes dentro ou imediatamente adjacentes a massa tumoral. O fibroblasto é um dos componentes mais importantes e abundante do MT. Neste local eles se transdiferenciam e são denominados fibroblastos associados ao câncer (FAC; ou do inglês CAF, *Cancer-Associated Fibroblast*), também conhecidos como fibroblastos peritumorais, fibroblastos ativados ou miofibroblastos ativados (Kalluri et al., 2006; Hanahan & Coussens, 2012; D’Arcangelo et al., 2020). A presença de CAFs no MT tem sido correlacionada à progressão de vários tipos de carcinomas, como o de próstata (Franco e

Hayward, 2012), pâncreas (Öhlund et al., 2017; Elyada et al., 2019), mama (Sebastian et al., 2020) e também CEC oral (Kellermann et al., 2007; Bello et al., 2011; Marsh et al., 2011; Bagordakis et al., 2016; Dourado et al., 2018a; Durado et al., 2018b).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no contexto do CEC oral e os resultados demonstram que os CAFs promovem a migração e invasão de células tumorais (Sobral et al., 2011), proliferação (Kellermann et al., 2008), adesão (Cirillo et al., 2017), imunossupressão (Takahashi et al., 2017), angiogênese (Kayamori et al., 2016) e, sobretudo, piora o prognóstico dos pacientes (Kellermann et al., 2007; Kellermann et al., 2008; Kawashiri et al., 2009; Bello et al., 2011; Marsh et al., 2011; Dayan et al., 2012; Li et al., 2015; Luksic et al., 2015; Kelner et al., 2015; Bagordakis et al., 2016).

Evidências recentes têm constatado que os CAFs apresentam heterogeneidade biológica em muitos aspectos, incluindo a célula de origem, fenótipo e função, com implicações clínicas relevantes. Diferenças no transcriptoma, proteoma, secretoma e metaboloma são fatores críticos que se desenvolvem durante a ativação do fenótipo CAF e que lhes concede habilidades de promover ou restringir o crescimento do câncer (Öhlund et al., 2017; Liu et al., 2019; Elyada et al., 2019). Muitas pesquisas demonstraram que os CAFs promovem a progressão do câncer por meio de múltiplos mecanismos, incluindo o remodelamento da MEC (matriz extracelular) e a produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que promovem a proliferação e o metabolismo das células cancerígenas, bem como a angiogênese tumoral (Mezawa et al., 2016; Kalluri, 2016; Öhlund et al., 2014).

Considerando a importância dos CAFs no microambiente tumoral, na presente pesquisa esse tipo celular foi escolhido para revelar marcadores ou assinaturas biológicas que possam ser usados para ajudar na identificação de LOs que possuam um risco aumentado de transformação maligna. Nesse contexto, em conjunto com essas células, as vesículas extracelulares (VEs), estruturas nanométricas consideradas mediadores críticos da comunicação entre as células epiteliais malignas e o estroma (Kalluri et al., 2020), também foram exploradas.

As VEs são veículos de comunicação intercelulares que modificam o comportamento das células-alvo em locais próximos ou distantes e desempenham um papel determinante na progressão do câncer (Kalluri et al., 2020; Hoshino et al., 2020). As VEs são capazes de influenciar o crescimento e a disseminação do câncer e possuem a capacidade de drenagem pelos linfonodos sentinelas para preparação de sítios de metástase, favorecendo a invasão e

colonização bem-sucedida de órgãos por células tumorais (Raposo e Stoorvogel, 2013; Bebelman et al., 2018). Estas estruturas têm ganhado considerável atenção nos últimos anos, tanto como mediadores da sinalização intercelular como fonte potencial para a descoberta de marcadores em câncer (Becker et al., 2016; Hoshino et al., 2020). Ademais, as VEs são uma fonte promissora para revelar novas moléculas direcionadas em biópsia líquida que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico, monitorar a progressão do tumor, a resposta do paciente e também revelar candidatos para terapia direcionada (Heitzer et al., 2019; Hoshino et al., 2020).

Considerando que a leucoplasia oral é a lesão potencialmente maligna mais comum e que, aliado ao exame clínico do paciente as análises das alterações arquiteturais e citológicas avaliadas pelo estudo histopatológico do tecido, podem ser interpretadas para indicar o risco de malignização da displasia epitelial, a busca de marcadores biológicos associados ao prognóstico desta patologia é uma estratégia relevante, visto que podem ser utilizados como ferramentas mais robustas para a predição da transformação maligna. Nesse contexto, o desenvolvimento de planos de tratamento individualizados, o rastreamento dos casos de alto risco, a previsão do curso da doença e principalmente o diagnóstico precoce poderiam melhorar significativamente a sobrevivência dos pacientes com CEC oral.

Assim, este estudo busca investigar marcadores que possam auxiliar na detecção precoce das leucoplasias orais antes que ocorra transformação maligna por meio do estudo da proteômica de fibroblastos e suas vesículas extracelulares, isolados de tecidos não maligno, potencialmente maligno e CEC oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

Dados mundiais recentes indicam que em 2020 cerca de 377.713 indivíduos foram diagnosticados com câncer de cavidade oral e lábio e 177.757 pacientes morreram desta doença. Os índices epidemiológicos referentes à previsão para o ano de 2040 apontam para um aumento de 41% na incidência e de aproximadamente 47% nas taxas de mortalidade em todo o mundo (IARC, 2021). No Brasil, o câncer oral equivale a quinta neoplasia maligna mais comum em homens e a 13ª mais comum em mulheres entre todos os cânceres, com estimativas de 15.000 novos casos para o triênio 2020-2022, sendo 11.200 em homens e 4.010 em mulheres, quando excluído o câncer de pele não-melanoma (INCA, 2020).

O Carcinoma Espinocelular (CEC) corresponde a variante histopatológica mais frequente e representa mais de noventa por cento de todas as neoplasias malignas que acometem região de cabeça e pescoço (Rivera & Venegas, 2014; Bray et al., 2018). O consumo excessivo e crônico de tabaco e álcool são os principais fatores de risco para esta patologia, tendo juntos um efeito sinérgico. Além disso, o risco de desenvolver CEC oral aumenta de acordo com a quantidade de tabaco e álcool consumida, (Karaca and Ozturk, 2019), existindo uma forte relação entre dose e tempo de exposição (Di Credico et al., 2020).

O perfil epidemiológico dos pacientes com CEC oral refere-se a homens entre a quinta a oitava décadas de vida, tabagistas e etilistas de longa duração (Bagan & Scully, 2009; Karunakaran et al., 2020). No entanto, tem sido observado o aumento da incidência de câncer oral em adultos jovens (18-44 anos), em especial mulheres, e com associação limitada aos fatores de risco tradicionais, possivelmente associado a fatores como predisposição genética e infecção pelo papilomavírus humano (HPV), além da mudança do hábito tabagista entre as mulheres (Hussein et al., 2017; Lee et al., 2020). Embora o papilomavírus humano, particularmente o tipo 16, seja mencionado como um fator etiológico no desenvolvimento do CEC oral, ele é responsável por uma porcentagem muito pequena dos casos (1-10%) (Müller, 2017). Em contrapartida, os tumores de orofaringe estão associados à infecção anterior com cepas oncogênicas do HPV, principalmente HPV-16 e, em menor extensão, HPV-18. Assim, por esta razão os tumores nesta localização anatômica foram reconhecidos como uma entidade distinta e separados em um novo capítulo na 4ª Edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial de Saúde, devido às diferenças entre a orofaringe e a cavidade oral (Reibel, 2017).

O CEC oral se origina dos queratinócitos que revestem a cavidade oral e é causado por mutações e alterações no perfil epigenético do DNA, muitas vezes espontâneas, induzidas pela exposição a diferentes agentes mutagênicos (Leemans et al., 2011). Esse processo ocorre de forma cumulativa, em etapas progressivas que inicialmente transformam o queratinócito normal em potencialmente maligno, que apresenta proliferação menos controlada do que a fisiológica. As alterações subclínicas podem se acumular o suficiente para se tornarem clinicamente e/ou microscopicamente aparentes como fenotipicamente distintas do resto da mucosa oral (Awadallah et al., 2018). Progressivamente, os queratinócitos tornam-se autônomos e o processo culmina na invasão dessas células pela membrana basal e, em estágios mais avançados, as células tumorais invadem os linfonodos e órgãos distantes como ossos, cérebro,

fígado dentre outros (Bagan & Scully, 2009). O mecanismo genético do CEC oral geralmente envolve tanto a superexpressão de oncogenes que estimulam o crescimento, quanto o silenciamento ou inativação de genes supressores de tumor, cujo produto normalmente inibe a proliferação celular (Leemans et al., 2011).

Vários genes supressores de tumor são inativados por mutação, deleção e metilação. Está bem estabelecido que o *TP53* é um guardião do genoma e desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular, diferenciação celular, reparo de DNA e apoptose. Mutações somáticas em *TP53* são detectadas em 60–80% dos CECs orais e em 10% das displasias orais iniciais (Sasahira & Kirita, 2018). Recentemente, os dados do *Genome Wide Association Study* mostraram que este gene geralmente sofre mutação em casos de CEC oral negativo para HPV e subgrupos com mutações de alto risco neste gene estão associados à diminuição da sensibilidade à cisplatina, metástases à distância, extensão extranodal e mau prognóstico (Sandulache et al., 2018). Claramente, a doença se desenvolve ao longo de muitos anos e, durante esse período, existem vários locais na cavidade oral onde o CEC pode ocorrer. A teoria da “cancerização de campo” descreve que a tumorigênese começa muito antes do crescimento de uma lesão clinicamente detectável e mesmo antes que as alterações morfológicas usuais de pré-malignidade seja reconhecível. Antes do crescimento de uma lesão maligna, uma linhagem celular normal pode adquirir mutações genéticas pró-tumorigênicas que são selecionadas positivamente no microambiente de um órgão saudável (Curtius et al., 2018). Consequentemente, a linhagem mutante, também referida como um 'clone mutante', pode crescer para produzir grandes campos de células que estão predispostas a eventualmente progredir para uma neoplasia. Assim, a cancerização de campo é definida como a substituição da população de células normais por uma população de células preparadas para o câncer, que pode não apresentar alterações morfológicas (Curtius et al., 2018). Dessa forma, a exposição a carcinógenos resulta em um campo alterado no qual o epitélio tem múltiplos focos independentes de tecido anormal que podem subsequentemente dar origem a lesões potencialmente malignas e malignas (Tanaka & Ishigamori, 2011; Curtius et al., 2018).

Clinicamente, a característica mais encontrada no momento do diagnóstico do CEC oral concerne em uma massa exofítica, com ou sem ulceração, com bordas comumente irregulares, endurecidas e elevadas, em alguns casos com sangramento, que provoca dificuldades na fala, mastigação e deglutição, geralmente presente na cavidade oral por um longo período de tempo. Outras apresentações clínicas incluem uma lesão endofítica, que é descrita como lesão invasiva,

escavada e ulcerada; pode ainda surgir como lesão leucoplásica (mancha branca), eritroplásica (mancha vermelha) e/ou eritroleucoplásica, que é a combinação de áreas vermelhas e brancas (Scully e Bagan, 2009).

Na maioria dos casos o CEC oral é diagnosticado em estágios avançados, quando a lesão é destrutiva e infiltrativa, com presença de metástase linfonodal e prognóstico invariavelmente sombrio o que contribui para redução da sobrevida (Alzahrani et al., 2020). A língua é o sítio mais afetado, especialmente as margens póstero-laterais e a base. Outras localizações acometidas incluem o lábio inferior e o assoalho bucal, mas também pode surgir na mucosa de revestimento do trígono retromolar, mucosa jugal, mucosas alveolares e palato duro (Scully & Bagan, 2009). Em termos gerais, o diagnóstico clínico é realizado através da investigação de uma lesão com suspeita de malignidade, levando-se em consideração o histórico médico do paciente, a realização do exame físico de cabeça e pescoço, a biópsia incisional e o exame anatomopatológico. Na maioria dos casos a microscopia é suficiente para o diagnóstico histológico (Rivera, 2015). Microscopicamente, o CEC oral é caracterizado por proliferação epitelial de células pleomórficas, que apresentam núcleos hipercromáticos e nucléolos evidentes, com figuras de mitoses atípicas. O tecido epitelial em proliferação invade o estroma circundante, formando ilhas ou cordões de células escamosas epiteliais malignas que infiltram os tecidos subjacentes (Reibel et al., 2017). Consequentemente, a disseminação ocorre por invasão das células malignas na musculatura profunda da língua, musculatura pterigóidea, mandíbula, maxila, laringe, hipofaringe, nasofaringe e por via linfática (Noguti et al., 2012).

O manejo multimodal padrão e o prognóstico do CEC oral são baseados no sistema de Classificação dos Tumores Malignos, desenvolvido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). O sistema TNM reflete a extensão do crescimento do tumor sistemicamente e é baseado na avaliação do tamanho do tumor primário e sua profundidade de invasão (T), envolvimento de linfonodos loco-regionais (N) e presença de metástases à distância (M). Esta classificação envolve a estratificação dos pacientes em grupos semelhantes com base em critérios anatômicos e não anatômicos para auxiliar na estimativa do prognóstico e no planejamento do tratamento. Porém, essa classificação não considera os demais fatores prognósticos, como por exemplo comorbidades, tratamento e peculiaridades moleculares. Na prática, o processo de estadiamento é dinâmico e modificável à medida que as informações clínicas e patológicas são coletadas durante o processo de avaliação e tratamento. O paciente que está sendo estadiado antes da cirurgia, ou aquele cujo tratamento instituído não é cirúrgico,

será estadiado aplicando-se o sistema clínico cTNM. No entanto, o paciente tratado cirurgicamente será estadiado com base nos dados patológicos cirúrgicos finais e terá o estadiamento TNM patológico separado (pTNM) (Lydiatt et al., 2017).

Recentemente, a 8ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) incorporou o DOI (DOI, do Inglês *depth of invasion*), significado de profundidade de invasão, e a extensão extranodal aos parâmetros de classificação T e N, respectivamente (Amin et al., 2017; Dirven et al., 2017). O DOI é um modificador da categoria T, medida empregada para melhorar a precisão prognóstica da classificação (Amin et al., 2017; Dirven et al., 2017), visto que se associa a recorrência e sobrevivência do CEC oral (Lydiatt et al., 2017). Conceitualmente, O DOI representa o crescimento invasivo profundo do tumor, medido a partir do nível da membrana basal da mucosa normal adjacente mais próxima. Uma linha perpendicular é estabelecida a partir desse plano para o ponto mais profundo da invasão do tumor (Lydiatt et al., 2017). É, portanto, distinto da espessura do tumor, que inclui tanto o componente endofítico quanto o exofítico da lesão. O DOI acentua a distinção entre tumores superficiais ou exofíticos daqueles que são mais invasivos. A medida desse parâmetro dá-se da seguinte forma: para cada aumento de 5 mm no DOI, a categoria T aumentará um nível de acordo com o seguinte: ≤ 5 mm; > 5 mm ≤ 10 mm e > 10 mm (Amin et al., 2017; Lydiatt et al., 2017), assim o ponto de referência de até 5mm é considerado para tumores T1; > 5 mm e < 10 mm para os tumores T2 e > 10 mm categoriza os tumores T3 (Lydiatt et al., 2017; Dirven et al., 2012; Marchiano et al., 2020). A profundidade da invasão e a espessura do tumor são dimensões do tamanho do tumor que refletem a proximidade de uma estrutura vascular linfática subjacente (Amin et al., 2017).

Quando o CEC oral é detectado em um estágio inicial (T1 ou T2 precoce), a taxa de sobrevivência pode ser aumentada em até 90% por tratamentos radicais como cirurgia ou radioterapia e a redução da disfunção oral é observada após o tratamento. Nos casos diagnosticados com doença localmente avançada, há um limite para preservar a função oral e manter a qualidade de vida dos pacientes, pois a disfagia, a disartria, o sofrimento psicológico e os distúrbios estéticos são frequentemente causados pela extensa ressecção e reconstrução cirúrgica (Gupta et al., 2020).

Devido ao alto potencial de invasão local e disseminação da doença para os linfonodos, a taxa de sobrevida geral de 5 anos permanece quase inalterada nas últimas três décadas. Infere-se que apenas 40-50% dos pacientes com CEC oral sobreviverão após cinco anos do diagnóstico

(Leemans et al., 2011; van Der Waal, 2013). Apesar dos avanços em pesquisas ao longo das décadas, nas técnicas cirúrgicas, no atendimento geral ao paciente e nas terapias adjuvantes locais e sistêmicas, não houve melhora significativa em critérios de prognóstico, uma vez que os pacientes ainda desenvolvem com frequência recidiva loco-regional, metástases à distância e segundos tumores primários (Rivera, 2015). Assim, esta doença ainda representa importante causa de morbidade, sendo considerada uma patologia de curso fatal, fato justificado, visto que rotineiramente é diagnosticada em estágios avançados, o que implica maior agressividade da doença e tratamentos mutiladores e pela recorrência do tumor primário (Leemans et al., 2011; Sasahira & Kirita, 2018).

2.2 LEUCOPLASIA ORAL

As desordens orais potencialmente malignas (DOPM) são condições caracterizadas por alteração do tecido epitelial que apresentam potencial de transformação maligna aumentado em comparação com a mucosa oral normal (Warnakulasuriya et al., 2007; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016). Desse grupo, a leucoplasia oral (LO) é mundialmente a entidade mais comumente encontrada na prática clínica, representando cerca de 4,11% de todos os casos das DOPM (Mello et al., 2018), sendo definida como “uma placa predominantemente branca de risco questionável, diagnosticada após exclusão de (outras) doenças ou desordens conhecidas que não possuem risco aumentado para o desenvolvimento de câncer” (Warnakulasuriya et al., 2007; Reibel et al., 2017).

A definição da LO trata-se de um termo clínico usado temporariamente como hipótese diagnóstica, que implica na exclusão de outras lesões de aspecto similar (Warnakulasuriya et al., 2007; Scully, 2009; van der Waal, 2018). Portanto, o diagnóstico definitivo de LO é dado quando a lesão persiste após a identificação e eliminação de um fator etiológico suspeito e posterior exame histopatológico. Assim, a análise histopatológica de uma leucoplasia diagnosticada clinicamente tem por objetivos excluir qualquer outra lesão definida, por exemplo, líquen plano, e estabelecer o grau de displasia epitelial, se presente (Arduino et al., 2013). Desta forma, caso seja identificado na análise histopatológica um carcinoma *in situ* ou um carcinoma invasivo, o diagnóstico clínico de leucoplasia é substituído pelo diagnóstico observado histologicamente, sendo recomendado o mesmo conceito para outros achados microscópicos, particularmente com relação à presença ou ausência de displasia epitelial (Scully, 2014; Mello et al., 2018). Até o momento, nenhuma técnica auxiliar ou adjuvante é

superior em sensibilidade e especificidade do que o exame clínico e a biópsia incisional, seguidos pelo exame histopatológico e este manejo segue como padrão ouro para o diagnóstico e tratamento das LOs (Awadallah et al., 2018, Odell et al., 2020).

As LOs são geralmente diagnosticadas após a quarta década de vida, sendo mais comum em homens, entretanto tem sido reportado um aumento de incidência em mulheres fumantes e etilistas. No entanto, a LO também pode ocorrer em não fumantes e a interrupção do hábito tabagista pode resultar na regressão ou mesmo no desaparecimento da lesão (Scully, 2014; van der Waal, 2018; Warnakulasuriya et al., 2021).

As lesões de LO podem variar em tamanho, desde áreas circunscritas pequenas até lesões extensas envolvendo a mucosa oral (Porter et al., 2018). O sítio anatômico mais afetado é a língua e o assoalho bucal. Clinicamente, duas variantes são reconhecidas, com base nas características distintas de cor e textura da superfície: LOs homogêneas e LOs não-homogêneas (Scully, 2014; van der Waal, 2018; Warnakulasuriya et al., 2021). A LO homogênea compreende as lesões tipicamente assintomáticas e predominantemente brancas, com superfície plana e uniforme e consistência normal. A maioria das LOs homogêneas afeta uma área circunscrita e apresenta bordas bem demarcadas. Um grupo menor pode apresentar bordas difusas. As leucoplasias não-homogêneas são mais comumente associadas a dor localizada e/ou leve desconforto; se apresentam predominantemente como lesões brancas ou de coloração branco-avermelhada, também conhecida como eritroleucoplasia. Apresentam superfície irregular, nodular ou exofítica. Pode ser difícil definir objetivamente o subtipo clínico homogêneo, pois este adjetivo tem sido considerado em caso de lesões finas, lisas e homogeneamente brancas, mas também tem sido empregado para lesões homogeneamente brancas e verrucosas (van der Waal, 2009; Scully, 2014; van der Waal, 2018; Warnakulasuriya et al., 2021).

Outro subtipo distinto de LO é denominado de leucoplasia verrucosa proliferativa - LVP, que inicialmente se apresenta como LO homogênea ou não-homogênea, entretanto seu curso clínico é progressivo, mudando as características clínicas para um aspecto verrucoso e multifocal (van der Waal, 2009). Uma alta proporção de pacientes com diagnóstico de LVP desenvolvem carcinomas de células escamosas convencionais ou carcinomas verrucosos. Uma revisão sistemática recente estimou a proporção em 49,5% (Iocca et al., 2020).

Alguns aspectos são comumente reconhecidos por carregar estatisticamente um risco aumentado de transformação maligna da LO. Dentre eles, a literatura atual destaca lesões

leucoplásicas >2cm de diâmetro, textura não homogênea, coloração avermelhada, lesões localizadas na língua e assoalho bucal, longo tempo de duração da lesão, LOs em mulheres, em não-fumantes e presença e gravidade da displasia epitelial (van der Waal, 2009; Odell et al., 2020). Destes fatores de risco, a presença de displasia epitelial - frequentemente correlacionada com um subtipo clínico não homogêneo, eritroleucoplásico – geralmente é o mais importante indicador potencial de malignização. No entanto, deve-se reconhecer que algumas lesões displásicas podem permanecer clinicamente inalteradas ou mesmo apresentar regressão completa. Além disso, a transformação maligna também pode ocorrer na LO não displásica (van der Waal, 2009).

Normalmente, a escolha do tratamento para a LO depende do risco estimado de transformação maligna e muitas vezes difere entre os serviços de saúde; por exemplo, lesões de baixo risco podem ser tratadas pela cessação do hábito e acompanhamento clínico rigoroso, enquanto o tratamento para lesões de alto risco geralmente envolve métodos mais invasivos, como por exemplo, excisão cirúrgica ou ablação a laser (Mello et al., 2018).

O termo mais adequado e reconhecido para indicar as alterações histopatológicas no epitélio oral com risco de transformação maligna é displasia epitelial. Esse termo descreve as alterações histológicas e não tem equivalente morfológico clínico. Em outras localizações anatômicas, como no colo do útero, a denominação usada é neoplasia intraepitelial cervical/escamosa e o termo neoplasia intraepitelial oral tem sido discutido e proposto, no entanto há evidências clínicas e moleculares de que tais alterações não são neoplásicas, mas sim precursoras de neoplasia, conforme evidenciado pelo fato de que a displasia epitelial tem alterações moleculares distintas das do carcinoma, muitas vezes persiste por décadas sem progressão e às vezes resolve com tratamento conservador ou espontaneamente (Odell et al., 2021).

De acordo com a classificação da OMS (Organização Mundial da Saúde) proposta em 2005 (Barnes et al), as displasias epiteliais são caracterizadas por mudanças arquiteturais e na distribuição da atipia dentro do epitélio. Dessa forma, as alterações citológicas incluem: variação no tamanho e forma nucleares (anisonucleose e pleomorfismo nuclear), variação no tamanho e forma celulares (anisocitose e pleomorfismo celular), aumento da proporção núcleo/citoplasma, aumento do número e no tamanho dos nucléolos, além de hipercromasia. As alterações arquiteturais compreendem: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, cristas epiteliais “em gota”, aumento no número de mitoses, mitoses na

superfície do epitélio, queratinização prematura em células individuais (disqueratose), pérolas de queratina nas cristas epiteliais, e perda de coesão das células epiteliais (Reibel et al., 2017). No sistema de graduação proposto pela OMS, a displasia epitelial é classicamente subdividida em 3 categorias: displasia leve, moderada e severa. A displasia leve demonstra proliferação do terço inferior do epitélio, localizadas na camada basal, com alterações citológicas e arquiteturais mínimas. Na displasia moderada, as alterações são mais proeminentes e se estendem da camada basal até o terço médio do epitélio. Entretanto, é importante enfatizar que apesar destas alterações se estenderem até o terço médio do epitélio, a presença de alterações citológicas e/ou arquiteturais muito proeminentes podem indicar uma displasia grave mesmo sem ultrapassar este terço médio, que é o limite definido na transição classificatória entre a displasia moderada e a grave. Na sequência, a displasia é classificada como grave quando há alteração citológica e/ou arquitetural acima dos dois terços inferiores do epitélio. Quando todo o epitélio está alterado, a displasia grave é considerada como sinônimo de carcinoma *in situ* (Reibel et al., 2017).

Apesar do uso frequente dessa classificação, a graduação das displasias epiteliais pela OMS tem sido considerada subjetiva, visto que é dificultada pela divisão arbitrária de um processo biológico considerado contínuo, em categorias distintas. Ademais, o diagnóstico final depende da ênfase dada a cada uma dessas características pelos observadores, o que aumenta a variabilidade entre os mesmos. Em alguns casos, esse sistema não é capaz de prever corretamente o potencial de transformação maligna (Odell et al., 2021; Yan et al., 2020).

Com o objetivo de criar um sistema reprodutível e menos subjetivo ao proposto inicialmente pela OMS 2005, Kujan et al., (2006), propuseram um esquema baseado nos mesmos critérios citológicos e arquiteturais usados pela OMS, porém, classificando as lesões em baixo risco e alto risco para a transformação maligna. Este sistema é denominado Binário e é baseado na quantificação destes critérios, em que as lesões classificadas como de baixo risco exibem menos de 4 alterações arquiteturais ou menos de 5 alterações citológicas e as lesões classificadas como de alto risco exibem pelo menos 4 alterações arquiteturais e 5 citológicas (Kujan et al., 2006). O sistema binário tem sensibilidade de 85%, especificidade de 80% e precisão de 82%. Além disso, esse novo sistema apresenta valor prognóstico ao avaliar a sobrevida livre de progressão ($p=0,004$) e os autores puderam prever desfechos em 28/33 pacientes (84,9%). O grande avanço do sistema binário foi a atribuição de casos com displasia moderada como casos de progressão de alto risco. No estudo, esses casos efetivamente

progrediram para CEC oral. O sistema proposto por Kujan e colaboradores avalia como critérios arquiteturais: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, cristas epiteliais em forma de gota, número aumentado de figuras mitóticas, mitoses anormalmente superficiais, queratinização prematura em células individuais e presença de pérolas de queratina; (b) critérios citológicos: variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal na forma do núcleo, variação anormal no tamanho da célula, variação anormal na forma da célula, aumento da relação núcleo-citoplasma, presença de mitose atípica, aumento do número e tamanho dos nucléolos e hiperchromatismo (Kujan et al., 2006). A nova recomendação da OMS de 2017 incluiu a perda de coesão da célula epitelial nas mudanças arquiteturais e removeu o aumento do tamanho do núcleo. O sistema binário agora é recomendado junto com o sistema de três níveis pela OMS, apesar da conhecida variabilidade interobservador deste último método.

Com o objetivo de validar a capacidade prognóstica do sistema binário proposto por Kujan et al. em comparação com o sistema da OMS e refinar essa classificação binária para melhorar ainda mais a variabilidade entre os avaliadores, Nankivell et al., 2013 demonstraram que o sistema binário pode ser melhorado, alterando o limiar de diagnóstico na classificação das displasias. Crucialmente, essa capacidade prognóstica melhorada pode levar a uma melhor seleção de pacientes com maior risco de transformação maligna. Os autores propuseram um novo ponto de corte para definição das lesões e consideraram que a proporção de 4 características arquiteturais e 4 citológicas tinha uma capacidade prognóstica geral ligeiramente melhor do que a definição de 4 e 5, respectivamente, proposta por Kujan et al., 2006.

É importante ressaltar que todos os sistemas de graduação de displasia impõem limites arbitrários que são formulados sem a compreensão da biologia da doença e não refletem os processos subjacentes. Mesmo que essas classificações arbitrárias possam ser avaliadas com alta reprodutibilidade, isso não indica que o sistema seja preditivo (Odell et al., 2021). Consequentemente, os graus de displasia não são categorias de diagnóstico definidas que podem ser atribuídas com precisão; são estimativas subjetivas de um espectro de mudanças. Mesmo se a classificação da displasia fosse um processo perfeito, o grau nem sempre poderia estimar o risco com precisão devido ao erro de amostragem e às intervenções de tratamento. No entanto, a graduação da displasia tem grande utilidade clínica e continua sendo o padrão de tratamento para orientar o manejo das DOPM (Odell et al., 2021).

Esses achados reforçam a urgência e a importância de investigações direcionadas aos eventos moleculares das LO para descoberta de biomarcadores ou assinaturas biológicas que possam ser usados para ajudar na identificação de lesões que possuam um risco aumentado de transformação maligna.

2.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

A maioria dos fibroblastos tem origem embrionária do mesênquima primitivo, que se desenvolve a partir do mesoderma após a gastrulação, mas um subconjunto menor de fibroblastos também derivada da crista neural, que faz parte do ectoderma. Esta origem embrionária é compartilhada por outras linhagens mesenquimais, incluindo adipócitos, condrócitos e osteoblastos (Sahai et al., 2020).

Embora a definição precisa de termo “fibroblasto” permaneça em constante debate, essas células foram descritas pela primeira vez no final do século 19 com base na sua localização no tecido e aparência microscópica (Tomasek et al., 2002; Parsonage et al., 2005). Descritas como células não vasculares, não epiteliais e não inflamatórias do tecido conjuntivo, os fibroblastos representam o seu principal componente celular e encontram-se embutidos na matriz extracelular fibrilar, sendo, em grande parte, responsáveis por sua síntese (Chang et al., 2002). Atualmente o termo fibroblasto tem sido empregado para descrever um grupo heterogêneo de células com morfologia fusiforme, de origem mesenquimal e que apresenta um espectro de fenótipos caracterizados por vários graus de contratilidade, que vão desde o fibroblasto em repouso até o miofibroblasto ativado observado na cicatrização de feridas (Chen et al., 2018; Nurmik et al., 2019; D’Arcangelo et al., 2020; Mao et al., 2021). Em termos práticos, os fibroblastos são frequentemente definidos por uma combinação de sua morfologia, posição do tecido e falta de marcadores de linhagem para células epiteliais, células endoteliais e leucócitos (Sahai et al., 2020). Assim, há um consenso na literatura em descrever os fibroblastos que foram ativados durante a cicatrização de feridas como 'miofibroblastos', enquanto aqueles ativados no contexto do câncer são denominados CAFs, fibroblastos peritumorais ou fibroblastos estromais reativos (Chen et al., 2018; Nurmik et al., 2019; D’Arcangelo et al., 2020; Mao et al., 2021).

A noção de que os fibroblastos do estroma tumoral adquirem um fenótipo ativado, semelhante aos fibroblastos encontrados na cicatrização de feridas, vem sendo estudada desde

a década de 1970 (Li et al., 2012). Apesar da diferença na nomenclatura, os fibroblastos ativados expressam marcadores análogos e apresentam fenótipos muito semelhantes, entretanto, com a importante exceção de que, diferente da inflamação aguda, os fibroblastos na inflamação crônica e no tecido tumoral não conseguem inativar (D’Arcangelo et al., 2020). Uma das grandes limitações no estudo dos CAFs é a ausência de marcadores que possam ser usados para identificar especificamente todas as suas subpopulações. No entanto, estas células têm sido comumente caracterizadas pela expressão da isoforma alfa da actina de músculo liso (α -SMA), visto que morfollogicamente apresentam um intenso aparato contrátil, contendo um empacotamento de microfilamentos de actina, principalmente α -SMA, associado a proteínas como miosina e fibras do estresse (Hinz et al., 2001). Os CAFs também têm sido diferenciados dos fibroblastos quiescentes, estes últimos presentes em tecidos homeostáticos, pela expressão da proteína de ativação de fibroblastos (FAP), proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) α/β e vimentina, proteína de ativação de fibroblastos (FAP), paladina e podoplanina, dentre outros (Nurmik et al., 2019; Puram et al., 2017). Apesar dos inúmeros marcadores relacionados na literatura, nenhuma das atuais moléculas são expressas exclusivamente por CAF, sendo também encontradas em outras células do estroma (Kalluri et al., 2006; Elyada et al., 2019).

Nos últimos anos, as pesquisas sobre CAFs têm se concentrado em compreender as diferenças entre as várias subpopulações destas células em vários tipos de tumor, especialmente para obter benefícios clínicos. No adenocarcinoma ductal pancreático, dois subtipos diferentes de CAF foram identificados com diferentes localizações intratumorais e diferentes perfis transcriptômicos. Os CAFs miofibroblásticos (myCAFs) têm uma interação direta com células neoplásicas e alta expressão de alfa-actina de músculo liso (α SMA), enquanto os CAFs inflamatórios (iCAFs) estão localizados distalmente às células tumorais e secretam altos níveis de IL-6 e outras citocinas (Elyada et al., 2019). Da mesma forma, no câncer de mama, duas subpopulações principais de CAFs foram relatadas: pCAFs e sCAFs, caracterizadas pela expressão de podoplanina (PDPN) e S100A, respectivamente. A função e a composição desses CAFs mudam durante a progressão do tumor e a proporção entre essas populações tem sido correlacionada com o desfecho clínico dos pacientes (Friedman et al., 2020).

Embora o formato fusiforme seja semelhante à de sua contraparte normal, os CAFs são células maiores, abrigam vários ramos do citoplasma e têm nucléolos proeminentes à microscopia de luz. Estruturas mais complexas dos CAFs que podem ser vistas sob microscopia

eletrônica incluem retículo endoplasmático rugoso aumentado, abundantes ribossomos livres, um complexo de Golgi bem desenvolvido e ricas fibras de estresse (Chen et al., 2019). Ativados por diversas vias de sinalização, os CAFs apresentam uma variedade de origens incluindo fibroblastos residentes do tecido, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, células-tronco hematopoéticas, células epiteliais que sofreram transição epitelial-mesenquimal e células endoteliais que sofreram transição endotelial-mesenquimal (Öhlund, 2017; Huelken & Hanahan, 2018).

Atualmente está estabelecido na literatura que os CAFs desempenham um papel no desenvolvimento, progressão e metástase tumoral (Kalluri & Zeisberg, 2006; Orimo & Weinberg; Calvo et al., 2013; Goetz et al., 2011; Attieh et al., 2016). Por exemplo, um modelo *in vitro* de invasão de células cancerosas no estroma mostra que os CAFs lideram a invasão das células cancerígenas ao promover passagens através de géis de colágeno I /Matrigel (Gaggioli et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que os CAFs exercem uma força física sobre as células cancerosas por meio de interações heterotípicas célula-célula que estimulam sua invasão. Nesse contexto, a interação entre N-caderina (expressa em CAF) e E-caderina (expressa nas células cancerígenas) atua para orquestrar coortes de células epiteliais malignas a invadir coletivamente o estroma (Labernadie et al., 2017). No entanto, ainda tem sido investigado se os CAFs cooperam com as células cancerosas em uma etapa anterior para violar a membrana basal e desencadear a transição do carcinoma *in situ* para um estágio invasivo (Kalluri & Zeisberg, 2006).

Durante a invasão através da membrana basal, as células neoplásicas se incorporam no estroma circundante e ativam fibroblastos quiescentes, residentes do tecido através de sinais parácrinos, sendo os membros da superfamília do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) as moléculas mais conhecidas por serem as principais indutoras da ativação dos CAFs (Kalluri, 2016). Digno de nota, os CAFs secretam grandes quantidades de isoformas 1, 2 e 3 de TGF-beta. Por sua vez, o TGF-beta secretado mantém um estado ativo autossustentado - tipicamente considerado como miofibroblasto - caracterizado pela expressão de alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) (Kojima et al., 2010). Fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), fator-1 derivado do estroma (SDF-1) e espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão envolvidos neste processo. A ativação dos CAFs também pode ocorrer por meio de sinalização parácrina com células não malignas. Por exemplo, as citocinas produzidas por

células imunes durante o processo inflamatório podem instruir a função dos CAFs. Entre elas, a IL-1 β produzida por células imunes em lesões hiperplásicas iniciais ativa fibroblastos normais em CAFs através da via NF- κ B (Erez et al., 2010). Alternativamente, a secreção de granulina por macrófagos ativa os fibroblastos residentes em miofibroblastos promotores de tumor que sustentam o crescimento metastático no adenocarcinoma pancreático (Nielsen et al., 2016).

Na literatura recente tem sido discutido que os CAFs apresentam substancial heterogeneidade fenotípica e funcional, o que acarreta a falta de biomarcadores definitivos para estas células (Öhlund et al., 2014; (Elyada et al., 2019; Mao et al., 2021). Foi mostrado que no adenocarcinoma ductal pancreático, dois subtipos de CAFs são capazes de se interconverter: os iCAFs (CAFs inflamatórios) são capazes de se transformar em myCAFs (CAFs miofibroblásticos) após a ativação da sinalização de TGF- β ou a inibição da via de sinalização JAK/STAT induzida por IL-1, sugerindo plasticidade potencial entre esses dois subtipos celulares (Elyada et al., 2019).

É importante ressaltar que muitos estudos têm destacado o papel pró-tumorigênico dos CAFs via secreção de vários fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e por meio da degradação das proteínas da matriz extracelular (MEC) (Glentis et al., 2017). Além de fatores inflamatórios e mitogênicos, os CAFs também secretam ROS, especificamente H₂O₂, e medeiam a cancerização de campo, promovendo a proliferação dos queratinócitos primários (Chan et al., 2017). Com base nas evidências atuais, os CAFs desempenham papéis importantes na regulação das atividades antitumorais das células imunes que se infiltram no tumor, incluindo células imunes inatas e adaptativas, no microambiente imunológico tumoral (MIT). Além disso, promovem a expressão de moléculas do ponto de verificação imunológico e remodelamento de MEC, que influenciam indiretamente o recrutamento e na atividade das células imunológicas (Harper et al., 2014).

Por meio da secreção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas efetoras, incluindo TGF- β , CXCL2, colágenos, MMPs e laminina, os CAFs podem estimular as células imunes a participarem do desenvolvimento do tumor, além de facilitar a degradação e remodelação da MEC (Ziani et al., 2018; Kim et al., 2006). Até o momento, muitos estudos têm mostrado que as interações entre CAFs e células imunes são capazes de modular o MIT e, assim, inibir a resposta imune antitumoral (Ueshima et al., 2019; Sun et al., 2018; Shiga et al., 2015). Em 2004 os CAFs foram reportados pela primeira vez no estroma do CEC oral (Barth et al., 2004) e, desde então, vários estudos têm enfatizado sua importância. Em geral, os estudos

clínicopatológicos demonstraram que a presença dessas células, particularmente no fronte de invasão dos CECs orais, se correlaciona significativamente com tamanhos maiores do tumor, presença de metástase linfonodal oculta, recidiva da doença, metástases à distância e sobretudo com o mau prognóstico dos pacientes (Bello et al., 2011; Kellermann et al., 2008; Li et al., 2015; Marsh et al., 2011; Vered et al., 2010; Kawashiri et al., 2009).

2.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As células podem se comunicar com células vizinhas ou com células distantes, localmente e entre órgãos, por meio da secreção de vesículas extracelulares (VEs) (Kalluri & Lebleu, 2020). As VEs compreendem principalmente estruturas nanométricas, que, semelhantes às células, são compostas de uma bicamada lipídica e podem conter todos os constituintes moleculares conhecidos de uma célula, incluindo proteínas, RNA e DNA, E refletem o estado fenotípico celular de origem (Raposo e Stoorvogel, 2013; Kalluri et al., 2016; Keshtkar et al., 2018). Todas as vesículas expressam moléculas de adesão em sua superfície, o que pode favorecer sua captura pelas células receptoras. Além disso, a dupla camada de membrana protege o conteúdo das VEs e permite que estas estruturas se movam por longas distâncias nos tecidos, impedindo a degradação por nucleases e proteases exógenas, e facilita ainda o transporte de sua carga a longo prazo. Portanto, as VEs permitem que as células expandam seu transcriptoma, proteoma e lipidoma intracelular para o espaço extracelular que alcançam, comunicando seu '*status*' a outras células (Simons & Raposo, 2009; Kalluri & Lebleu, 2020).

As VEs são encontradas em todos os fluidos biológicos e são secretadas por todas as células, o que as torna interessantes para biópsias líquidas minimamente invasivas, com potencial para amostragem longitudinal de acompanhamento da progressão das doenças (van der Pol et al., 2012; Kalluri & Lebleu, 2020). Embora as biópsias de tecidos continuem sendo o padrão-ouro para avaliação molecular, sua invasividade e amostragem limitada desafiam o manejo clínico, especialmente diante da heterogeneidade espacial do tumor e da sua evolução temporal. As VEs, por outro lado, oferecem uma via minimamente invasiva para acessar informações moleculares do tumor, representam parâmetros coletivos de células tumorais e podem ser utilizadas repetidamente para monitoramento longitudinal (Shao et al., 2018).

Embora a classificação das VEs esteja em constante evolução, elas geralmente se enquadram em duas categorias principais, com base na sua biogênese: vesículas liberadas pela

via endossômica (exossomos) e por brotamento da membrana plasmática (microvesículas) (Simons & Raposo, 2009; Kalluri et al., 2016; Keshtkar et al., 2018). Os exossomos compreendem uma das principais subclasses de VEs, com diâmetro de ~40 a 160 nm (~100 nm em média), que se originam da fusão de corpos multivesiculares (CMV) contendo vesículas intraluminais. Os CMV são transportados para degradação lisossomal ou fusão com a membrana plasmática. Quando os CMV se fundem à membrana celular e são liberados no ambiente extracelular, neste ponto as vesículas são comumente denominadas exossomos. Essa exocitose é regulada por p53, sob o controle da via de ativação do citoesqueleto, mas não é afetada pelo cálcio. Os exossomos contêm grandes quantidades de anexinas, tetraspaninas, como CD63, CD81 e CD9, e proteínas de choque térmico, incluindo Hsp60, Hsp70 e Hsp90. Eles também expressam Alix, gene de susceptibilidade ao tumor 101 (Tsg101) e clatrina. A membrana possui pequenas quantidades de fosfatidilserina, mas grandes quantidades de colesterol, ceramida e esfingolípido (Keshtkar et al., 2018; Kalluri & Lebleu, 2020).

Quando os exossomos são liberados no ambiente extracelular, eles podem interagir com as células receptoras por meio de mecanismos principais: entrar nas células por captação endocítica ou por fusão direta das vesículas à membrana celular; também podem transmitir seu conteúdo por meio da adesão à superfície celular, mediada pela interação de um receptor de ligante de lipídio. Essas interações indicam que os exossomos possuem papéis essenciais na comunicação célula-célula e na modulação imunológica em diferentes condições fisiológicas e patológicas (Konala et al., 2016).

Em contraste, as microvesículas (MVs) são grandes VEs, que variam de 100 a 1000 nm de diâmetro, e são formadas por brotamento externo da membrana plasmática, em diferentes tipos de células, que envolvem a reorganização do citoesqueleto de actina dependente de Arf6- e RhoA, um processo que também requer aumento do cálcio intracelular (Konala et al., 2016). Os MVs contêm grandes quantidades de proteínas contendo fosfatidilserina associadas às jangadas lipídicas e são ricas no marcador de superfície CD40, bem como colesterol, esfingomielina e ceramida. Elas carregam uma carga de proteínas, RNA e DNA que interagem com as células receptoras por meio de interações receptor-ligante específicos (Simons & Raposo, 2009; Raposo & Stoorvogel, 2013).

Embora exossomos/VEs e as MVs pareçam ser secretados por meio de mecanismos diferentes, não se sabe se esses dois tipos principais de VEs são capazes de mediar resultados biológicos distintos. No entanto, um estudo descobriu que as MVs entregam DNA de plasmídeo

funcional e proteínas para células receptoras de forma mais eficiente do que os exossomos (Kanada et al., 2015; French et al., 2017), sugerindo que diferentes classes de VEs podem ser funcionalmente distintas. Devido à falta de consenso sobre as terminologias e visando uma padronização da nomenclatura, a International Society for Extracellular Vesicles tem encorajado os autores a empregar o termo “Extracellular Vesicles” como um termo genérico que representa todas as vesículas secretadas (Théry et al., 2018).

Evidências crescentes mostram que as VEs são cruciais na comunicação intercelular no câncer. Tanto o conteúdo interno das VEs atuam como fatores parácrinos e/ou autócrinos, quanto as moléculas específicas que estão expostas na superfície das VEs, como por exemplo o TGF- β (Shelke et al., 2019; Dai et al., 2020), influenciam nesse processo. VEs liberadas por CAFs podem ser internalizadas por células tumorais e contribuir na progressão e metástase por meio da transferência de vários tipos de substâncias. De forma correspondente, as VEs liberadas por células malignas também podem promover a ativação dos CAFs (Yang et al., 2017; Webber et al., 2010).

As VEs derivadas do câncer podem induzir a diferenciação das células endoteliais em CAFs, dos quais os exossomos, por sua vez, podem auxiliar na invasão das células malignas (Yang et al., 2019). Tem sido demonstrado que o TGF β expresso na superfície de VEs derivadas de carcinomas de próstata, colorretal, bexiga e mama, induzem a ativação de fibroblastos por ganho de expressão de α SMA (α -actina de músculo liso) e FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos 2) (Webber et al., 2010). Em contrapartida, VEs de CAF são enriquecidas com TGF- β , que induz a fosforilação de SMAD2/3 em células de câncer de ovário e promovem a TEM e invasão (Li et al., 2017; Dai et al., 2020). Os CAFs também secretam Wnt10b nas VEs, que ativa a via Wnt/ β -catenina e promove a metástase no câncer de mama. Em particular, fibroblastos que apresentam baixa expressão de p85 α secretam mais Wnt10b nas VEs, promovendo, a migração e invasão das células cancerosas na neoplasia maligna mamária (Chen et al., 2017). Nesse contexto, também tem sido descrito que VEs secretadas por fibroblastos e CAFs de mama desempenham um papel fundamental na promoção da motilidade e metástase ao mobilizar a sinalização autócrina da polaridade celular planar Wnt-PCP em células tumorais (Luga et al., 2012).

É relevante destacar que a transferência de carga molecular do câncer para células estromais via VEs é um regulador chave da diferenciação dos CAFs. As células estromais, particularmente os fibroblastos, absorvem um grande número de VEs derivadas de células

cancerígenas quando comparadas às células epiteliais, tornando-as alvos importantes de *cross-talk* mediado por VEs (Lee et al., 2016). Além disso, células endoteliais, pericitos e células-tronco mesenquimais também podem ser induzidas a um fenótipo CAF por VEs derivadas do câncer (Chowdhury et al., 2015; Yeon et al., 2018; Ning et al., 2018). Nesse contexto, a capacidade das VEs derivadas de CAF em promover efeitos tumorigênicos em células cancerígenas receptoras tem sido associada a proteínas e RNAs não codificantes, incluindo miRNAs e lncRNAs. O impacto da carga dessas VEs tem uma série de efeitos, incluindo a promoção da transição epitélio-mesênquima, invasão, metástase, proliferação, crescimento, quimiorresistência, reprogramação metabólica e a inibição da apoptose (Shoucair et al., 2020).

Recentemente, as VEs têm recebido atenção crescente como potenciais alvos terapêuticos na pesquisa do câncer; no entanto, para que as vias biológicas envolvidas sejam alvos terapêuticos, ainda é necessário muito mais conhecimento para entender melhor o papel dessas moléculas no *crosstalk* tumor-CAF, especialmente no contexto do CEC oral.

2.5 PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA

Os avanços na pesquisa de biomarcadores de câncer são paralelos ao desenvolvimento de tecnologias. Nos últimos anos, grandes avanços nos métodos analíticos genômicos e proteômicos revelaram redes de sinalização altamente complexas que contribuem para o início e a progressão da doença. Por sua vez, a fisiopatologia diversa dos cânceres e a natureza heterogênea dos tumores ilustram o efeito que as alterações genéticas e proteicas têm na sinalização oncogênica (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

Desde a introdução das tecnologias 'ômicas', uma infinidade de novas ferramentas para entender sistemas biológicos complexos tornou-se disponível. Estudar o proteoma, ou seja, o complemento proteico do genoma, é uma boa maneira de obter mais informações sobre a expressão e modificação de proteínas em células, tecidos e organismos (Garraway, 2013). As tecnologias de proteômica também permitem medir a abundância de proteínas, caracterizar modificações pós-traducionais, a localização das proteínas e também estudar a estrutura e as interações dessas moléculas (Fields, 2001). Em comparação com o genoma estático, o proteoma humano é mais diverso, pois consiste em cerca de 500.000 isoformas de proteínas derivadas de cerca de 20.000 genes codificadores de proteínas. Este grande aumento na diversidade de

proteínas é em grande parte devido ao *splicing* alternativo e às modificações pós-traducionais (Tan et al., 2012).

Nos últimos anos, as tecnologias proteômicas baseadas em espectrometria de massas (MS) se tornaram o método de escolha para analisar amostras complexas de proteínas. O principal motor que impulsionou a proteômica na clínica foram os avanços tecnológicos significativos no campo da espectrometria de massas e da bioinformática, melhorando continuamente a sensibilidade, especificidade e rendimento, tornando o estudo de milhares de proteínas de células, tecidos e fluidos corporais possíveis em um experimento (Baker et al., 2012). Para este fim, a proteômica foi implementada na pesquisa clínica para compreender a fisiopatologia de várias doenças (Hanash, 2003). Mais especificamente, a proteômica clínica concentra-se na compreensão da patogênese das doenças, caracterizando novos alvos como candidatos a biomarcadores, para o desenvolvimento de drogas e intervenção terapêutica (Hanash, 2011; Mischak et al., 2012).

Descrita também como proteômica por *shotgun*, essa metodologia é aplicada sobretudo em estudos nos quais busca-se conhecer as proteínas que estão com a abundância alterada sob determinado estímulo ou condição e, dessa forma, levantar hipóteses quanto aos mecanismos moleculares, processos biológicos ou respostas fenotípicas das células. Considerando que não se sabe a priori as proteínas que serão identificadas, têm-se denominado essa estratégia de proteômica baseada em descoberta (*discovery-based proteomics* ou *untargeted*). Nesta abordagem, o foco está na identificação e quantificação relativa de um maior número possível de proteínas ou modificações pós-traducionais em um sistema biológico (Marx, 2013).

O aumento do conhecimento da complexidade e heterogeneidade do câncer nos últimos dez anos deixou claro que esta patologia evolui por várias vias, sendo resultado de uma variedade de eventos genéticos, moleculares e clínicos. Como uma doença altamente complexa, a desregulação de múltiplas vias de sinalização e a dinâmica de envolvimento de uma variedade de componentes que interagem por meio de redes complexas é enorme. Uma vez que a transformação maligna envolve mudanças na abundância de proteínas, o que influencia a sinalização molecular das células, a análise de proteínas é uma estratégia fundamental para caracterizar redes regulatórias e funcionais, identificar modificações e interações de proteínas, estudar novos alvos para o desenvolvimento de drogas e explorar candidatos a biomarcadores em diversas áreas de conhecimento, especialmente em oncologia (Cho, 2007; Jain, 2008).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil proteômico de fibroblastos orais associados ao tecido normal (NAFs), leucoplasia oral (LAFs) e carcinoma espinocelular oral (CAFs) e de suas vesículas extracelulares (VEs) para indicar potenciais marcadores de transformação maligna.

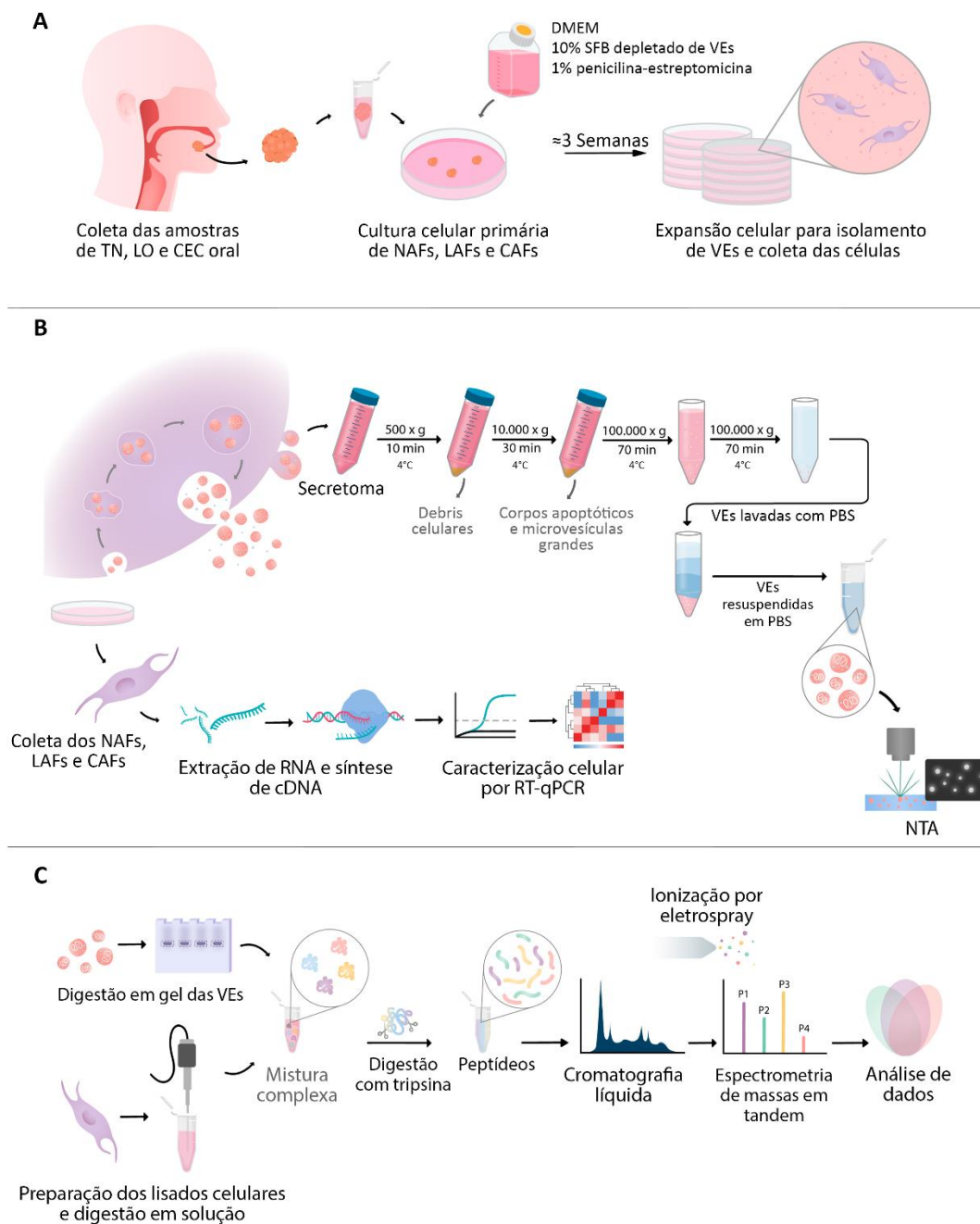
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de NAFs, LAFs e CAFs primários pela técnica do explante.
- Isolamento de VEs de NAFs, LAFs e CAFs por ultracentrifugação sequencial.
- Caracterização de marcadores de fenótipos em LAFs e CAFs pela técnica de RT-qPCR.
- Caracterização as VEs por tamanho e concentração por análise de rastreamento de nanopartículas.
- Caracterização do perfil proteômico dos NAFs, LAFs e CAFs, assim como das suas VEs por proteômica baseada em espectrometria de massas.
- Correlação da abundância das proteínas diferenciais em células e VEs com as características clínico-patológicas dos pacientes com LO e CEC oral por análises estatísticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos empregados para a realização desta pesquisa estão listados e descritos nos tópicos seguintes. A Figura 1 resume o delineamento experimental utilizado para esta pesquisa.

Figura 1 - Delineamento experimental. **A.** Culturas celulares primárias de fibroblastos orais humanos foram estabelecidas a partir de fragmentos teciduais de tecido controle não maligno, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral. Os tecidos foram coletados imediatamente após excisão cirúrgica. Todas as amostras foram cultivadas em meio DMEM completo por aproximadamente 3 semanas até o isolamento de VEs e coleta das células para os experimentos subsequentes. **B.** As VEs foram isoladas por centrifugação e ultracentrifugação diferencial e caracterizadas por rastreamento de nanopartículas (NTA). O fenótipo celular foi caracterizado por RT-qPCR para identificar populações myCAF, iCAFs e apCAF. **C.** As células e suas VEs foram submetidas a extração de proteínas e digestão com tripsina. A mistura de peptídeos foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* por proteômica baseada em descoberta (LCMS/MS). Os dados foram analisados nos *softwares* MaxQuant e Perseus e os alvos proteicos das células e VEs foram selecionados após correlação aos dados clínico-patológicos dos pacientes.



Fonte: SÁ, J. O. et al. Manuscrito em preparação.

4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi conduzido de acordo com as Boas Práticas Clínicas relativas à pesquisa médica envolvendo seres humanos, de acordo com a Declaração de Helsinque. A coleta e o uso das amostras de tecido humano foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa vinculado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio da Plataforma Brasil, sob o número de protocolo (CAAE nº 51762415.5.0000.5418) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) (CAAE nº 61402116.8.0000.0065) (Anexo 1).

4.2 CASUÍSTICA E COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Todos os pacientes foram informados que as amostras biológicas coletadas por meio da prática clínica padrão seriam usadas para fins desta pesquisa e foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido. Nenhuma informação pessoal foi usada no momento da obtenção das amostras e um número de protocolo foi atribuído de acordo com a sequência das coletas. No caso de recusa do paciente, que poderia ser expresso oralmente ou por escrito, as amostras não foram coletadas. Todos os casos incluídos neste estudo foram coletados prospectivamente entre 2017 e 2019.

Para este estudo foram incluídos três grupos experimentais: tecido normal (TN) controle, leucoplasia oral (LO) e CEC oral. Para todos os casos foram estipulados os seguintes critérios de inclusão: i) idade a partir de 40 anos ii) dados demográficos e clínico-patológicos completos, além das informações de acompanhamento. Foram excluídos os casos com i) diagnóstico de doenças autoimunes, ii) história conhecida de infecção ativa pelos vírus HIV, HBV e HCV; iii) grávidas ou amamentando; iv) história prévia de neoplasia maligna em região de cabeça e pescoço e v) lesões em orofaringe.

As amostras controles foram obtidas de fragmentos milimétricos de tecido normal, removidos das margens externas das hiperplasias fibrosas. Os fragmentos de leucoplasia foram coletados dos casos com diagnóstico clínico da lesão em cavidade oral e que foram submetidos a biópsia incisional ou remoção cirúrgica completa. Os critérios de inclusão para esse grupo compreenderam: i) apresentação clínica de acordo com as diretrizes atuais da Classificação da OMS: "uma placa branca não removível à raspagem, de risco questionável, tendo excluído (outras) doenças ou distúrbios conhecidos que não trazem risco aumentado de câncer" (Reibel

et al., 2017); ii) pacientes tabagistas e/ou ex tabagistas; iii) etilistas e/ou ex etilistas. Foram excluídos: i) lesões de LO em orofaringe, ii) casos que apresentavam outros tipos de DOPM, como líquen plano; iii) casos coletados inicialmente como LO e que obtiveram o diagnóstico histopatológico confirmado de CEC oral *in situ* ou microinvasivo; iv) pacientes não tabagistas; v) pacientes que apresentaram lesões brancas, com aparência verrucosa semelhantes à leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). A LVP é uma forma distinta de LO multifocal, caracterizada por curso clínico progressivo, alto índice de recorrência após a remoção completa das lesões e taxas de transformação maligna excepcionalmente altas entre todos os DOPM (González-Moles et al., 2021; Ramos-García et al., 2021) e, portanto, casos de LVP poderiam enviesar os resultados do presente estudo.

Fumantes atuais foram considerados aqueles que fumavam um cigarro ou mais por dia; ex-fumantes foram considerados aqueles que não fumaram pelo menos nos últimos 30 dias (Wen et al., 2001; Chien et al., 2008; Yang et al., 2021). Os etilistas atuais ou regulares foram aqueles que declararam consumir bebidas alcoólicas ao menos mais de uma vez por semana e foram considerados ex-etilistas os pacientes que declararam não beber por pelo menos 12 meses antes da cirurgia para excisão da lesão (Dawson, 2000; Yang, et al., 2021). Os casos controles e de LO foram coletados de pacientes atendidos no Serviço de Estomatopatologia do Orocentro, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP, UNICAMP, durante a remoção cirúrgica das lesões. Os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para os casos controle e de LO foram estabelecidos em decorrência das características clínicas dos casos de CEC oral, com o objetivo de mantê-las similares, como a idade, consumo de tabaco e álcool e localização das lesões.

Os espécimes de CEC oral foram coletados de pacientes com lesões suspeitas e submetidos a biópsia incisional na Clínica Orocentro, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP, UNICAMP e de uma coorte de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão para este grupo foram: i) pacientes com diagnóstico de CEC oral primário por coloração com hematoxilina e eosina, independente do estadiamento clínico ou patológico; disponibilidade de todos os blocos das biópsias ou peças cirúrgicas fixadas em formalina e embebidas em parafina. Os critérios de exclusão foram: i) segundo tumor primário; ii) recidiva(s) de CEC oral; iii) carcinoma localizado em nasofaringe, seios paranasais, orofaringe,

hipofaringe e laringe; iv) metástases à distância e v) tratamento adjuvante antes da cirurgia. As amostras tumorais foram coletadas do compartimento estromal por um patologista experiente do serviço durante o transcirúrgico, antes da pintura da peça com corante e adição ao formol, evitando áreas necróticas.

Imediatamente após a excisão cirúrgica, cada amostra medindo entre 0,4-0-6cm foi lavada 2 vezes em meio de cultura DMEM completo (descrição do meio no item 4.3) para remoção do excesso de sangue e mantida por 16 h à temperatura ambiente até o processamento.

4.3 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS ORAIS

As linhagens celulares primárias de fibroblastos humanos foram estabelecidas a partir da técnica do explante (Takahashi et al., 2015; Bagordakis et al., 2016). Todas as amostras foram processadas em Nível de Biossegurança 2 (NB-2) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM), de acordo com o regulamento de risco envolvido.

Em fluxo laminar e com o auxílio de pinças e lâminas estéreis, os fragmentos de tecido foram novamente lavados por 2 vezes e em seguida cortados em fragmentos menores de aproximadamente 1 mm³, transferidos para frascos de cultura celular de 25 cm² (passagem 0) e cultivados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Life/Thermo*), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab Ltda, Campinas-SP) previamente depletado de exossomos e acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina (*Sigma Aldrich, St.Louis, MO, EUA*). Neste estudo este meio de cultura é denominado DMEM completo. Todas as amostras foram mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera umidificada constante contendo 5% de CO₂.

4.4 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Os requisitos experimentais mínimos para isolamento das VEs foram baseados na publicação de Théry et al., 2018. Todas as VEs usadas neste estudo foram isoladas por centrifugação sequencial, conforme descrito anteriormente (Peinado et al., 2012; Hoshino et al., 2015).

O SFB utilizado nos meios de cultura foi previamente depletado por ultracentrifugação para reduzir a contaminação de exossomos bovinos durante todo o processo de cultivo celular. Resumidamente, os tubos foram carregados com SFB e submetidos a ultracentrifugação por 120.000 x g por 70 min a 4°C (*Beckman Optima L-80XP Ultracentrifuge, SW 45Ti; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA*). O sobrenadante foi então filtrado em fluxo laminar usando membrana de 0,22 µm (*Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha*). Para minimizar o co-isolamento de vesículas exógenas, a água Miliq utilizada para o preparo dos meios de cultura e tampão PBS foi investigada por análise de rastreamento de nanopartículas (do Inglês, *Nanoparticle Tracking analysis - NTA*).

Quando as células na passagem 3 atingiram confluência de ~60%, elas foram incubadas em meio DMEM completo por 48h, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O sobrenadante (200mL) resultante desse período, com ~80% de confluência celular e <5% de morte celular por placa, foi cuidadosamente coletado e as VEs foram isoladas por centrifugação e ultracentrifugação sequencial. O teste de viabilidade foi realizado por meio da diluição das células em Azul de tripan 0,4% (Gibco®, USA) e contagem em câmara de Neubauer. Todas as linhagens celulares primárias foram testadas para verificação de contaminação por micoplasma pela técnica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

Inicialmente o sobrenadante foi centrifugado a 500 x g durante 10 min para remoção de detritos celulares e em seguida foi centrifugado por 30 min a 10.000 x g (*Eppendorf Centrifuge 5810R*) para sedimentar corpos apoptóticos e microvesículas grandes (>200nm). O meio coletado foi então ultracentrifugado a 100.000 x g por 70 min para sedimentar vesículas extracelulares menores (*rotor Beckman 45Ti*). Finalmente, as VEs foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 e sedimentadas novamente por ultracentrifugação de 100.000 x g em rotor de 32 Ti em uma ultracentrífuga *Beckman Optima L-80XP*.

Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a 4°C. Os *pellets* finais contendo VEs foram ressuspensos em 50ul de PBS gelado, previamente filtrado, e armazenados a -80°C para posterior análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e caracterização do conteúdo proteômico por análise de LC-MS/MS. Todas as VEs foram submetidas ao descongelamento-recongelamento por um total de 4 vezes para realização dos seguintes experimentos a) análises por NTA (2x); b) experimento piloto para digestão *in gel* (1x) e c) digestão *in gel* para as análises por LC-MS/MS (1x).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS VES POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

O tamanho e o número de vesículas purificadas foram determinados por análise de rastreamento de nanopartículas usando o instrumento NanoSight NS300 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido), que analisa o rastreamento de nanopartículas com base no princípio de espalhamento de luz e permite o rastreamento do movimento browniano de cada nanopartícula em uma suspensão líquida (Dragovic et al., 2011; Szatanek et al., 2017). O NS300 é equipado com uma iluminação laser verde de 532 nm que ilumina as partículas nanométricas e, por consequência, podem ser visualizadas como pontos individuais através de uma câmera. A velocidade do movimento das partículas é utilizada para calcular o tamanho das mesmas, aplicando a equação bidimensional de Stokes-Einstein.

As configurações do equipamento foram definidas de acordo com o manual do fabricante (NanoSight NS300 Operating Manual, MAN0516-07-EN-00, 2015). O nível da câmera foi aumentado até que todas as partículas estivessem distintamente visíveis, sem exceder a saturação do sinal acima de 20%. Resumidamente, alíquotas das VEs isoladas foram diluídas (1:1.000) em solução PBS, previamente filtrado em membrana de 0,22 µm de tamanho de poro, injetadas no instrumento e medidas a 18°C. Para cada medição, cinco vídeos de 1 minuto foram capturados e analisados pelo *software* integrado NanoSight NTA 3.1. O tamanho médio (nm) e a concentração (partículas/mL) das VEs foram calculados integrando os dados dos cinco registros.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA DOS NAFs, LAFs E CAFs

O RNA intracelular foi extraído de todos os fibroblastos na passagem 3, das mesmas células das quais foram isoladas as VEs, utilizando o reagente caotrópico TRIzol (Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante. Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase *free*.

Resumidamente, para cada amostra foram adicionados 1.000 µL de Trizol e a mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex. Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio ultrapuro 100% e agitação por inversão por 30 seg. Após um período de 5 minutos à temperatura ambiente (TA), as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. Aproximadamente 500 µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, com

capacidade para 1,5 mL. As amostras de RNA foram precipitadas em 500 µL de Isopropanol gelado, após incubação de 10 minutos à TA e centrifugação por 30 minutos a 12.000 x *g* a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas 3 vezes em 1.000 µL de etanol 70% gelado, com centrifugações de 7.500 x *g* por 5 min à 4°C e posteriormente secas em concentrador à vácuo por 10 min. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato, forte inibidor de ribonucleases). O RNA foi armazenado a -80°C até o momento de sua utilização na reação de RT-qPCR.

A concentração total de RNA foi medida usando um espectrofotômetro NanoDrop® 1000c (Thermo Scientific). A leitura foi realizada com 1 µL de cada amostra e foram anotadas as concentrações em ng/µL. A pureza do RNA foi classificada como satisfatória a partir da avaliação das razões de absorção A260/A280 e A260/230.

O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total por transcrição reversa usando o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Scientific, Estados Unidos), seguindo as recomendações técnicas do fabricante. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C e não foram descongeladas até que a reação RT-qPCR fosse realizada.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados para a caracterização do fenótipo dos NAFs, LAFs e CAFs. As sequências dos conjuntos de *primers* foram projetadas usando o Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e o IDT Oligoanalyzer™ (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) foi usado para prever a ocorrência de dímeros e estruturas secundárias. As informações detalhadas e instruções para o uso do Primer-BLAST já foram discutidas anteriormente (Ye et al., 2012). As sequências de todos os *primers* usados neste estudo estão descritos na tabela 1.

Para avaliar a eficiência de amplificação (E), a quantidade de cDNA foi pré-determinada por meio de diluições em série de amostras de cDNA dos NAFs, LAFs e CAFs, utilizando 5 diferentes concentrações (100 ng, 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng e 0,39 ng), de acordo com a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. *Primers* que apresentaram valores de eficiências com variação de 95-105% foram consideradas satisfatórias para as análises posteriores.

As amplificações por PCR foram realizadas em duplicata e a especificidade dos produtos foi verificada com base na análise da curva de *melting*. Controles negativos e positivos foram incluídos para cada reação. O controle positivo consistiu em uma amostra representativa de cada material biológico (NAF, LAF e CAF), que foi usada como amostra normalizadora e permitiu a correção de variações intra-ensaios. O controle negativo consistiu em água DEPC. Todas as reações foram realizadas pelo método de quantificação relativa aos genes de referência *GAPDH* e *GUSB*.

As reações foram realizadas com o reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), que se baseia na utilização de uma molécula fluorescente que, quando intercalada à dupla fita de DNA, passa a emitir fluorescência. Foram utilizados 250 nM de *primers forward* e *reverse* e 30 ng de cDNA, totalizando 12 µL de volume final de reação. Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica no equipamento 7500 *Real-Time* (Applied Biosystems), em placas ópticas de 96 poços. O programa de termociclagem padrão consistia em desnaturação inicial de 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de amplificação, que seguiram com desnaturação a 95°C por 15 seg. e anelamento dos iniciadores a 60 °C por 1 min.

Os resultados foram avaliados no *software* 7500 v2.3 com o objetivo de realizar o controle de qualidade dos dados gerados. Após a observação manual da qualidade dos dados obtidos, os resultados foram exportados em formato .xlsx para avaliação da expressão relativa dos genes propostos no *software* Excel (Microsoft). A quantificação relativa foi calculada usando o modelo proposto por Pfaffl (Pfaffl, 2001) e o teste paramétrico *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, foram aplicados para comparar os níveis de transcrição logaritimizados na base 2 entre as amostras de NAF, LAF e CAF, utilizando o *GraphPad Prism* v8.2.1, (<https://www.graphpad.com>). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As associações significativas foram visualizadas em forma de gráficos ViolinPlot. A diferença estatística significativa entre dois grupos foi representada por barra e asteriscos, onde * representa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para a visualização do painel de genes avaliados foi empregado o agrupamento hierárquico transformando os valores de expressão gênica relativa de cada marcador em *z-score*, com a ferramenta estatística R. Análises estatísticas paramétricas (teste T de Student para amostras independentes ou *one-way* ANOVA) foram realizadas para correlacionar a expressão gênica relativa logada na base 2, entre os genes diferencialmente expressos entre NAF vs. LAF

e NAF vs. CAF, resultantes da caracterização das células por RT-qPCR em myCAF, iCAF e apCAF, com as mesmas variáveis clínico-patológicas dos casos de LO e CEC oral usadas nas comparações por proteômica. A descrição desta análise encontra-se no ítem 4.11.

Tabela 1 - Genes alvos e referências selecionados para verificação da expressão diferencial em amostras de fibroblastos primários isolados de tecido normal, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral, de acordo com a classificação de subpopulação CAF.

(continua)

	Gene	Referência NCBI		Sequência de primers
panF	VIM	NM_003380.5	VIM_F VIM_R	GGCGAGGAGAGCAGGATTC GGTATCAACCAGAGGGAGTGA
	FAP	NM_004460.5	FAP_F FAP_R	AAGTGCCTGTTCCAGCAATG TATGCTCCTGGGTCTTTGGAC
	S100A4	NM_002961.3	S100A4_F S100A4_R	GCCCTGGATGTGATGGTGTGTC GCTTCATCTGTCCTTTTCCCC
	PDPN	NM_006474.5	PDPN_F PDPN_R	CGAAGATGATGTGGTGACTC CGATGCGAATGCCTGTTAC
	COL1A1	NM_000088.4	COL1A1_F COL1A1_R	TGAAGGGACACAGAGGTTTCA ACCATCATTTCCACGAGCA
myCAF	ACTA2	NM_001141945.2	ACTA2_F ACTA2_R	CAATGGCTCTGGGCTCTGTA TGTCCCATTTCCACCATCAC
	TAGLN	NM_001001522.2	TAGLN_F TAGLN_R	CGAGAAGAAGTATGACGAGGAGC GCTTGCTCAGAATCACGCCA
	MYL9	NM_006097.5	MYL9_F MYL9_R	CAGACGAATACCTGGAGGGC CTCATGGATGAAACCTGAGGC
	POSTN	NM_006475.3	POSTN_F POSTN_R	ACTGCTTCAGGGAGACACA TCAGGTTATTGACTTAGGGTTGTA
	MMP11	NM_005940.5	MMP11_F MMP11_R	TGATCGACTTCGCCAGGTAC TCCCCTTCTCGGTGAGTCTT
	CCN2	NM_001901.4	CCN2_F CCN2_R	ACCAATGACAACGCCTCCTG TTTGCCCTTCTTAATGTTCTCTTCC
	THY1	NM_006288.5	THY1_F THY1_R	CGCTCTCCTGCTAACAGTCTTG C CCCCACAGTGCCAAAGAGC
	MMP2	NM_004530.6	MMP2_F MMP2_R	TTTGACGGTAAGGACGGACTC CATACTTCACACGGACCACTTG

Tabela 1 - Genes alvos e referências selecionados para verificação da expressão diferencial em amostras de fibroblastos primários isolados de tecido normal, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral, de acordo com a classificação de subpopulação CAF.

(continuação)

	Gene	Referência NCBI		Sequência de primers
iCAF	DCN	NM_133503.3	DCN_F DCN_R	GGTCTTCCTCCTTCCTTACG GAAACTCAATCCCAACTTAGCCA
	CXCL1	NM_001511.4	CXCL1_F CXCL1_R	CCCAAACCGAAGTCATAGCCA AACAGCCACCAGTGAGCTTC
	CXCL2	NM_002089.4	CXCL2_F CXCL2_R	CTTGTCTCAACCCCGCATCG TGGTCAGTTGGATTGTCATTTT
	CXCL12	NM_199168.4	CXCL12_F CXCL12_R	TGCCCTTCAGATTGTAGCCC GTGGGTCTAGCGGAAAGTCC
	CXCL8	NM_000584.4	CXCL8_F CXCL8_R	TCAGAGACAGCAGAGCACAC GGCAAACTGCACCTTCACAC
	CFD	NM_001928.4	CFD_F CFD_R	CGGCTGGGGCATAGTCAA GGAGTCACCCTTGCAGC
	PDGFRA	NM_006206.6	PDGFRA_F PDGFRA_R	GGTGGTTGAAGGAACAGCCT GCCGTGGGTTTTAGCATCTTC
	IL6	NM_000600.5	IL6_F IL6_R	TGGCAGAAAACAACCTGAACC ACCAGGCAAGTCTCCTCATTG
	LIF	NM_002309.5	LIF_F LIF_R	ATAATGAAGGTCTTGGCGGC TTGTGACATGGGTGGCGTA
	LMNA	NM_170707.4	LMNA_F LMNA_R	GTGGTGACGATCTGGGCTG AGGTGTTCTGTGCCTTCCAC
	CCL2	NM_002982.4	CCL2_F CCL2_R	GTCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCAA TTTGCTTGTCCAGGTGGTCC
apCAF	DPT	NM_001937.5	DPT_F DPT_R	CGCTACTTCGAGTCAGTGCT TCTGTTGTTAGCCAGCAGGAATA
	SLPI	NM_003064.4	SLPI_F SLPI_R	GACACCCCAAACCCAACAAGG AAACGCAGGATTCCACACA

Tabela 1 - Genes alvos e referências selecionados para verificação da expressão diferencial em amostras de fibroblastos primários isolados de tecido normal, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral, de acordo com a classificação de subpopulação CAF.

(conclusão)

	Gene	Referência NCBI		Sequência de primers
Referência	GUSB	NM_000181.4	GUSB_F GUSB_R	GAATCTGCTGGCTACTACTTGAA GCTCACAAAGGTCACAGGC
	GAPDH	NM_002046.7	GAPDH_F GAPDH_R	GAGAAGGCTGGGGCTCATTTG CAGAGATGATGACCCTTTTGGC

Sequência NCBI: Número de acesso da sequência do nucleotídeo ao banco de genes do NCBI.

myCAF: fibroblastos associados ao câncer miofibroblástico

iCAF: fibroblastos associados ao câncer inflamatórios

apCAF: fibroblastos associados ao câncer apresentadores de antígeno

Referência: gene endógeno considerado referência ou normalizador

4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIGESTÃO ENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS E VES PARA PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA

4.8.1 Preparação dos lisados celulares e digestão em solução

Para as etapas de lise e extração das proteínas celulares, uma alíquota de cada amostra celular (n=47) foi ressuspensa e homogeneizada em 500-600 µL de tampão de ureia (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; Uréia a 8 M e Tiourea a 2 M) contendo o coquetel de inibidores de proteases *cOmplete Mini Coquetel Inibidor (Roche)* e EDTA 1 mM. As suspensões celulares foram sonificadas em gelo por três ciclos de pulsos de 30 s a 20% de amplitude (*Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processor VCX500, Sonics & Materials, Inc.*). Para evitar a degradação das proteínas, foram mantidos intervalos de 40 s no gelo para resfriamento das amostras entre cada sonificação. A sonificação foi realizada de forma consistente com 20% de *output* para não causar espumas, pois as bolhas reduzem a transmissão de energia da ponta da sonda para a amostra, limitando assim a eficiência da lise.

Em seguida, o extrato celular foi centrifugado a 4°C por 20 min a 12.000x g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A concentração de proteína total em cada amostra foi analisada com o kit de ensaio *Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)* e, em seguida, as amostras foram alíquotadas e armazenadas à -80°C para uso posterior.

Para as etapas de digestão, amostras com alíquotas equivalentes a 10 µg de proteína foram processadas por meio de protocolo de digestão em solução, conforme descrito anteriormente em protocolo já utilizado em nosso grupo de pesquisa (Carnielli et al., 2018).

Resumidamente, as alíquotas foram tratadas com ureia na concentração final de 8 M, seguido por redução das proteínas com solução de DTT a 5 mM (por 25 min, a 56°C) e alquilação das cisteínas com solução de iodoacetamida a 14 mM (por 30 min no escuro, à temperatura ambiente). A mistura foi então diluída com solução de NH_4HCO_3 a 50 mM para reduzir a concentração final de ureia a 1,6 M e o cloreto de cálcio foi adicionado na concentração final de 1 mM. Finalmente, para digestão das proteínas a solução de tripsina (Promega) na proporção de 1:50 (enzima substrato), especificamente 2 μL , foi adicionada a cada tubo e a reação prosseguiu durante 16h a 37 °C. Após incubação durante a noite, 1 μL de tripsina (1:50) foi adicionado às amostras e a digestão foi continuada por mais 5 h, a 37°C. A digestão trípica foi encerrada pela adição de ácido trifluoroacético a 0,4% e, em seguida, os peptídeos foram dessalinizados por meio de *stage tips* C18 (Rappsilber et al., 2007). As amostras foram então submetidas à secagem em um concentrador a vácuo e armazenadas a -80°C para análise de espectrometria de massas (LC-MS) com aquisição dependente de dados (DDA).

4.8.2 Preparação das VEs e digestão em gel de SDS-PAGE

5×10^9 de VEs, determinado previamente por NTA, foram solubilizadas em tampão de lise contendo desoxicolato de sódio a 12 mM e lauroil sarcosinato de sódio a 12 mM em Tris HCl 100 mM, pH 8,5 (protocolo adaptado de Chen et al., 2017) e fervidas a 95 °C por 5 min. Em seguida, o tampão Laemmli 2x com β -mercaptoetanol (*Sigma - Aldrich*) foi adicionado às amostras, que foram fervidas novamente por 5 min a 95°C e aplicadas no gel pré-fabricado de poliacrilamida (10% *Mini-Protean® TGX™*, *Bio-Rad*). A eletroforese ocorreu em um sistema *Bio-Rad* com a voltagem fixada em 100V durante 15 min, de acordo com as recomendações do fabricante, apenas para as proteínas entrarem em aproximadamente 1 cm no gel. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado do suporte e corado com metanol a 40% (v/v), ácido acético a 20% (v/v) e *Coomassie Brilliant Blue R* 0,1%, durante 1 hora, em temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, o gel foi descorado em solução contendo metanol a 40% (v/v) e ácido acético a 12% (v/v), realizando a troca da solução a cada 30 minutos até a visualização das bandas.

Todos os géis foram digitalizados e as bandas contendo as proteínas foram excisadas dos géis com auxílio de bisturi, cortadas em cubos e transferidas para tubos de 1,5mL. Em seguida, cada amostra foi tratada com solução descorante (50% de metanol e 2,5% de ácido acético) por 3 horas para desidratar os géis e remover o SDS, trocando a solução a cada 1 h. O

protocolo de digestão em gel foi realizado conforme descrito por Shevchenko et al., 2006. Em resumo, foi adicionado um volume de ditioneitol (DTT) a 10 mM dissolvido em NH_4HCO_3 100 mM suficiente para cobrir os pedaços de géis e as proteínas foram reduzidas durante 1 h a 56°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, a solução de DTT foi substituída por aproximadamente o mesmo volume de 50 mM de iodoacetamida em 100 mM de NH_4HCO_3 . Após 30 min de incubação em temperatura ambiente no escuro, os pedaços de gel foram lavados com NH_4HCO_3 a 100 mM por 10 min, desidratados pela adição de acetonitrila a 100%, reidratados em NH_4HCO_3 a 100 mM e desidratados novamente pela adição do mesmo volume de acetonitrila. A fase líquida foi removida e os géis foram completamente secos em uma centrífuga a vácuo. Finalmente os géis foram hidratados com tampão de digestão contendo 50 mM de NH_4HCO_3 gelado em concentração final da tripsina 20 ng/ μL (proporção enzima:substrato, 1:50). A digestão com tripsina (Promega) ocorreu durante 16h a 37°C. Após este período a reação foi interrompida e os peptídeos tripticos foram extraídos dos géis usando 50% de acetonitrila contendo 5% de ácido fórmico. Finalmente, as misturas de peptídeos foram secas e enviadas ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade da Virgínia (UVA, EUA) para análises por LC-MS/MS.

4.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (LC-MS/MS) E ANÁLISE DOS DADOS BRUTOS

4.9.1 Análise das proteínas extraídas das células por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS das proteínas celulares foram realizadas com a ressuspensão da mistura de peptídeos em 10 μL de ácido fórmico a 0,1% v/v, sendo 2 μL deste volume injetados pelo sistema de cromatografia líquida EASY-nLC II acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific), conectado por meio de uma interface *nanoeletrospray*. Resumidamente, os peptídeos foram separados por um gradiente de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% v/v usando uma coluna analítica New Objective (20 cm $\times$ 75 μm ID e de 5 μm tamanho de partícula) em um fluxo de 300 nL/min em 170 min de gradiente total, sendo 30%B em 120 min. A voltagem do nanoeletrospray foi ajustada para 2,2 kV e a temperatura da fonte para 275 °C. O método do instrumento foi configurado no modo de aquisição de análise dependente de dados (DDA). Os precursores foram adquiridos em faixa de m/z 300–1600 no analisador Orbitrap após o acúmulo de 1e^6 íons. A resolução no Orbitrap

foi definida para $r=60.000$ e 20 peptídeos mais intensos com estados de carga ≥ 2 foram sequencialmente isolados e fragmentados na câmara de alta pressão *ion trap* por dissociação induzida por colisão (CID) (energia de colisão normalizada de 35%). A exclusão dinâmica foi habilitada com uma lista de tamanho de exclusão de 500 peptídeos, duração de exclusão de 60 s e contagem de repetição de 1. Uma ativação $Q=0,25$ e tempo de ativação de 10 ms foram usados.

4.9.2 Análise das proteínas extraídas das VEs por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS das proteínas extraídas das VEs foram realizadas com a ressuspensão da mistura de peptídeos em 10 μL de ácido fórmico a 0,1% v/v, sendo 4 μL deste volume analisados no sistema de cromatografia líquida EASY-nLC acoplado ao espectrômetro de massas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific) conectado por meio de uma interface *nanoeletrospray*, na Universidade da Virgínia (UVA, EUA). Os peptídeos foram separados por um gradiente de acetonitrila contendo ácido acético a 0,1 M em fluxo de 300 nL/min em uma coluna analítica EASY-Spray (15 cm $\times$ 75 μm ID e de 3 μm tamanho de partícula) em 131 min de gradiente total, sendo 40%B em 121 min. A voltagem do nanoeletrospray foi ajustada para 1,9 kV e a temperatura da fonte a 285°C. O método do instrumento foi configurado no modo de aquisição de análise dependente de dados (DDA). Os precursores foram adquiridos em faixa de m/z 375–1500 no analisador Orbitrap após o acúmulo de $1e^6$ íons. A resolução no Orbitrap foi definida para $r=120.000$ para precursor e $r=30.000$ para íons fragmentos, sendo os 10 peptídeos mais intensos de cada espectro, com estados de carga ≥ 2 , foram sequencialmente isolados e fragmentados por dissociação induzida por alta energia de colisão (HCD) (energia de colisão normalizada de 30%).

4.10 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA DE CÉLULAS E VES

Os arquivos brutos provenientes da análise por LC-MS/MS das células foram processados usando o programa MaxQuant v1.5.8.0 (Cox e Mann, 2008; Cox et al., 2011) e os espectros MS/MS foram submetidos à busca contra o banco de dados *Human UniProt* (download em 9 de janeiro de 2020, contendo 96.774 sequências canônicas e isoformas e 38.621.617 resíduos), por meio do algoritmo Andromeda (Cox et al., 2011). A especificidade

da enzima foi definida para tripsina/P (clivagem após KR), permitindo até dois locais de clivagem perdidos. A carbamidometilação foi definida como modificação fixa, e a acetilação do terminal N da proteína e a oxidação da metionina como modificações variáveis. Uma tolerância de massas de 10 ppm para íons precursores e 0,5 Da para os íons fragmentos foram estabelecidas para a identificação da proteína. Foi estabelecido um máximo de 1% de falsos positivos (*FDR*) para a identificação de proteína e peptídeo e pelo menos 1 peptídeo *razor* por grupo de proteína. A quantificação de proteína foi realizada usando LFQ (*label-free quantification*) implementado no programa MaxQuant, a partir de peptídeos *unique + razor*. Uma contagem de proporção mínima de 1 foi definida e a correspondência entre as execuções com os parâmetros padrão foram ativados.

Os arquivos brutos provenientes da análise por LC-MS/MS das VEs foram processados usando o software MaxQuant v 2.1.0 e os espectros MS/MS foram submetidos à busca contra os bancos *Human UniProt* e *Bos taurus UniProt* (*download* em 5 de agosto de 2021; Uniprot UP000005640, contendo 75.777 sequências e isoformas e 26.153.667 resíduos; Uniprot UP000009136, contendo 23.847 sequências e isoformas e 12.289.142 resíduos, respectivamente). A especificidade da enzima foi definida para tripsina/P (clivagem após KR), permitindo até dois locais de clivagem perdidos. A carbamidometilação de cisteína foi definida como modificação fixa e a acetilação do terminal N da proteína e a oxidação da metionina como modificações variáveis. Uma tolerância de 10 ppm para a massa do precursor e 0,02 Da para os íons do fragmento foram estabelecidas para a identificação da proteína. Foi estabelecido um máximo de 1% *false discovery rate* (*FDR*) aplicado no nível de PSM. Foi selecionado o mínimo de 1 peptídeo único por proteína e ativação da função *split by taxonomy* ao nível de espécies. A quantificação de proteína foi realizada usando o algoritmo LFQ (*label-free quantification*) implementado no software MaxQuant a partir de peptídeos *unique + razor*. Uma contagem de proporção mínima de 1 foi definida e a correspondência entre as execuções com os parâmetros padrão foram ativados.

Após obtenção do conjuntos de dados para identificação e quantificação das proteínas das células e das VEs, os mesmos foram pré-processados no programa Perseus, v1.6.10.45 (Cox e Mann, 2008), disponível no pacote MaxQuant, para exclusão das entradas identificadas unicamente por sítio de modificação, bem como aquelas identificadas pelo banco reverso. O filtro de contaminantes não foi aplicado aos conjuntos de dados, pois as queratinas são de especial interesse no estudo do CEC oral. Para o conjunto de dados das VEs, as proteínas

identificadas e quantificadas referentes à espécie *Bos taurus*, diferenciadas das proteínas da espécie *Human* pela presença de 1 peptídeo único em cada sequência, foram excluídas do conjunto de dados para as análises posteriores.

A abundância das proteínas de células e VEs foi calculada com base na intensidade normalizada do espectro (LFQ *intensity*) e seus valores foram convertidos para log2. Esses valores foram posteriormente convertidos em *z-score* e utilizados para construção de agrupamentos hierárquicos em Python v3.6. Os métodos de agrupamento hierárquico realizados foram ('complete', 'weighted', and 'ward') e métricas ('braycurtis', 'canberra', 'chebyshev', 'cityblock', 'correlation', 'cosine', 'dice', 'euclidean', 'hamming', 'jaccard', 'jensenshannon', 'kulsinski', 'mahalanobis', 'yule', 'matching', 'minkowski', 'rogerstanimoto', 'russellrao', 'seuclidean', 'sokalmichener', 'sokalsneath', and 'sqeuclidean'). Os dendrogramas que apresentaram o agrupamento mais evidente de proteínas e/ou pacientes foram selecionados para análises posteriores.

O teste Qui-quadrado de Pearson (nível de significância de 95%; $p \leq 0,05$) foi empregado para associar os agrupamentos de pacientes com as características clínico-patológicas no programa SPSS (*IBM SPSS Statistics*) para Windows, v. 28.0.0. (IBM Corp.). Para essas análises, as características avaliadas dos casos controle foram: sexo, idade, tabagismo, etilismo e sítio anatômico do tecido coletado. Em relação ao grupo de LO, os dados foram: sexo, idade, tabagismo, etilismo, sítio anatômico da lesão coletada e aspecto clínico da lesão. Os critérios histopatológicos consistiram em: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células basais, cristas epiteliais em forma de gota de orvalho, aumento do número de figuras mitóticas, mitoses anormalmente superficiais, queratinização prematura em células individuais, pérolas de queratina, perda de coesão das células epiteliais, variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal da forma do núcleo, variação anormal do tamanho da célula, variação anormal da forma da célula, aumento da relação núcleo-citoplasma, figuras mitóticas atípicas, aumento do número e tamanho dos nucléolos, hipercromasia, risco de malignização, infiltrado inflamatório na área displásica.

Para os casos de CEC oral foram avaliados as seguintes características: sexo, idade, tabagismo, etilismo, sítio anatômico do tumor primário, consumo de cigarros por dia, duração do hábito tabagista e consumo de álcool por dia. As características histopatológicas foram: tamanho do tumor primário (pT) (Amin et al., 2017), metástase linfonodal (pN) (Amin et al., 2017), extensão extracapsular da metástase (Amin et al., 2017), grau de diferenciação do tumor

(Barnes et al., 2005), profundidade de invasão (Amin et al., 2017), espessura do tumor (Amin et al., 2017), padrão de crescimento do tumor, invasão angiolinfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório linfomononuclear peritumoral, infiltrado inflamatório linfomononuclear intratumoral, WPOI (Amin et al., 2017) e *status* das margens cirúrgicas. As associações significativas referentes às análises de associação dos agrupamentos de pacientes com as características clínico-patológicas foram visualizadas em forma de gráficos usando GraphPad Prism v8.2.1 (GraphPad; <https://www.graphpad.com>).

Para encontrar perfis distintos de abundância das proteínas entre os NAFs, LAFs e CAFs foi empregada o agrupamento dos dados proteômicos usando a plataforma *on line* VSClust (<http://computproteomics.bmb.sdu.dk/Apps/VSClust/>) (Schwämmle e Jensen, 2018). Para aumentar a robustez desta análise, os dados proteômicos de células e VEs foram filtrados para 50% de valores válidos. Isso significa que foram mantidas apenas as proteínas identificadas e quantificadas em 50% dos casos, considerando pelo menos um dos grupos estudados. Considerando que nesta fase de descoberta foi fundamental avaliar os parâmetros clínico-patológicos dos casos para selecionar as proteínas a serem avaliadas para as próximas etapas de verificação, a aplicação o filtro de valor válido nesse momento permitiu a realização das análises de enriquecimento das proteínas presentes em cada cluster, aumentando a confiabilidade da identificação e quantificação de proteínas, para enriquecer vias biológicas sobre-representadas. O número ótimo de clusters foi primeiramente definido de acordo com a distância centróide mínima de cada número de clusters testado, por meio do algoritmo VSClust.

Para identificar proteínas diferencialmente abundantes entre NAFs, LAFs e CAFs, os valores de intensidade Log2 LFQ foram analisados no programa Perseus, v1.6.10.45 (Cox e Mann, 2008), disponível no pacote MaxQuant. A significância dos resultados foi avaliada empregando o teste paramétrico de análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido do pós-teste de Tukey HSD (do inglês *Tukey's HSD - honestly significant difference test*) com nível de significância de 95% ($p\text{-valor} < 0,05$). Esta análise foi corrigida usando o teste de Storey (Storey et al., 2004), aplicado em ambiente R, onde os valores q foram calculados considerando um FDR máximo de 5%. Os conjuntos de dados LC-MS/MS analisados em células e VEs incluíram 14 NAFs, 11 LAFs e 22 CAFs, sem filtrar valores válidos.

As interseções entre os conjuntos de dados e as relações entre o número de proteínas exclusivas e comuns de cada condição experimental foi visualizada em gráficos UpSet plots

(Lex et al., 2014) empregados para os dados de células e VEs, gerados com a ferramenta *online Intervene* (<https://intervene.shinyapps.io/intervene/>) (Khan e Mathelier, 2017).

Gráficos de dispersão foram realizados usando o GraphPad Prism v8.2.1. para demonstrar individualmente a relação de intensidade normalizada em log2 de cada proteína diferencialmente abundante (*one-way* ANOVA, $p\text{-valor} \leq 0,05$ seguido do pós-teste de Tukey, $p\text{-valor} \leq 0,05$) entre os grupos do conjunto de dados das células e VEs. Os gráficos de dispersão mostram a mediana e a medida de dispersão de distância interquartil. A diferença estatística significativa entre dois grupos foi representada por barra e asteriscos, onde * representa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A identidade da proteína nos gráficos está representada pelo respectivo nome do gene.

As análises de enriquecimento de vias foram realizadas na plataforma REACTOME v.78 (<https://reactome.org/>) (Jassal et al., 2020), com o limite de significância definido em FDR $\leq 0,05$, sem incluir as vias relacionadas a doenças. As 20 vias subre-representadas foram visualizadas usando o GraphPad Prism v8.2.1.

As análises de Ontologia Genética (*gene ontology*, *GO*) baseada na categoria componente celular e processos biológicos foram realizadas no Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2009(a); Huang et al., 2009(b)) usando o proteoma humano completo como referência. A significância estatística foi considerada aplicando $p\text{-valor} \leq 0,05$ usando o teste de Benjamini e Hochberg e $q\text{-valor} \leq 0,05$, usando o FDR.

4.11 CORRELAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS E DA EXPRESSÃO GÊNICA COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Análises estatísticas não paramétricas foram realizadas para correlacionar as proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos conjuntos de dados proteômicos das células e VEs, com as variáveis clínico-patológicas dos casos de LO e CEC oral. As informações clínicas foram obtidas dos prontuários eletrônicos dos pacientes.

Para os casos controle, foram correlacionadas as seguintes características: sexo, idade no momento do diagnóstico, tabagismo, etilismo e sítio anatômico da amostra coletada. Em relação às análises dos casos de LO, as características clínicas incluíram: sexo, idade no momento do diagnóstico, tabagismo, etilismo, sítio anatômico, aparência clínica da lesão

(homogênea ou não homogênea) (Warnakulasuriya et al., 2007) e tamanho da lesão (≤ 2 cm ou ≥ 2 cm) (van der Waal et al., 2002; Warnakulasuriya et al., 2007).

Para as análises dos parâmetros histopatológicos dos casos de LO, as lâminas de vidro com cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina de cinco μm foram digitalizadas usando o *scanner* (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) com uma amostra espacial de $0,47\mu\text{m}$ por pixel, foco automático e aumento de $20\times$, conforme descrito por Araújo et al., 2021.

Todas as imagens digitais foram avaliadas por dois patologistas (A.L.D.A, T.M.M) de forma independente, e os casos discordantes foram revisados por um terceiro patologista (E.S.S) para concordância no diagnóstico final. As seguintes características histopatológicas foram avaliadas: (a) critérios arquiteturais: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, cristas epiteliais em forma de gota, número aumentado de figuras mitóticas, mitoses anormalmente superficiais, queratinização prematura em células individuais, presença de pérolas de queratina e perda de coesão das células epiteliais; (b) critérios citológicos: variação anormal do tamanho e forma do núcleo, anormal do tamanho e forma da célula, aumento da relação núcleo-citoplasma, presença de mitose atípica, aumento do número e tamanho dos nucléolos e hipercromatismo (Kujan et al., 2006). Também foram avaliados a presença ou ausência de infiltrado inflamatório na área displásica (Shaban et al., 2019) e o tipo de queratinização da área displásica.

Após a análise de cada critério individual em todos os casos, a displasia epitelial foi avaliada de acordo com a classificação binária de risco sugerida por Kujan et al. (2006) e o ponto de corte para definir o risco e malignização foi estabelecido de acordo com Nankivell et al. (2013). Assim, os casos foram classificados como de alto risco se quatro características arquiteturais e quatro citológicas estivessem presentes (Kujan et al., 2006; Nankivell et al., 2013).

Para os casos de CEC oral, foram avaliados as seguintes características: sexo, idade, tabagismo, etilismo, sítio anatômico do tumor primário, consumo de cigarros por dia, duração do hábito tabagista, consumo de álcool por dia. As características histopatológicas foram coletadas dos prontuários eletrônicos e incluíram: tamanho do tumor primário (pT) (Amin et al., 2017), metástase linfonodal (pN) (Amin et al., 2017), extensão extracapsular da metástase (Amin et al., 2017), grau de diferenciação do tumor (Barnes et al., 2005), profundidade de invasão (Amin et al., 2017), espessura do tumor (Amin et al., 2017), padrão de crescimento do tumor, invasão angiolinfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório linfomononuclear

peritumoral, infiltrado inflamatório linfomononuclear intratumoral, WPOI (Amin et al., 2017) e status das margens cirúrgicas.

Análises estatísticas paramétricas foram realizadas para correlacionar a expressão gênica relativa logada na base 2, entre os genes diferencialmente expressos entre NAF vs. LAF e NAF vs. CAF, resultantes da caracterização dos fibroblastos por RT-qPCR em marcadores myCAF, iCAF e apCAF, com as mesmas variáveis clínico-patológicas dos casos de LO e CEC oral, avaliadas para os resultados de proteômica.

As análises de correlação foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics, v.28.0.0 (IBM Corp.) Na comparação entre duas variáveis foram aplicados os testes U de Mann-Whitney (para abundância proteica) e teste T de Studenty para amostras independentes (para expressão gênica) e para as comparações entre mais de duas variáveis, os testes Kuskal Wallis (para abundância proteica) e *one-way* ANOVA (para expressão gênica) foram usados, considerando o nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Para análises estatísticas múltiplas, o pós teste de Tukey foi utilizado, com nível de significância $p \leq 0,05$. As associações significativas foram visualizadas em forma de gráficos ViolinPlot usando o GraphPad Prism v8.2.1 (GraphPad; <https://www.graphpad.com>). A diferença estatística significativa entre dois grupos foi representada por barra e asteriscos, onde * representa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A identidade da proteína nos gráficos está representada pelo respectivo nome do gene.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Este estudo foi constituído por uma coorte prospectiva de 14 pacientes com hiperplasia fibrosa, 11 pacientes com leucoplasia oral e 22 pacientes com CEC oral. Os dados demográficos, clínicos, histopatológicos e de seguimento foram obtidos por meio da análise dos prontuários digitais e estão descritos nas tabelas 2-4.

Dos casos de hiperplasia fibrosa, (HF) dos quais foram coletados fragmentos de tecido controle não maligno, 11 (78,6%) eram mulheres e 3 (21,4%) eram homens, com idades entre 40 e 72 anos e média de $57,21 \pm 8,92$ anos. Dos casos de leucoplasia oral, 7 (63,6%) eram homens e 4 (36,4%) eram mulheres, com idades entre 45 e 73 anos e média de $61,81 \pm 7,13$ anos. Em relação aos hábitos, 42,9% dos pacientes do grupo controle reportaram ser fumantes e

28,6% etilistas, enquanto 100% dos pacientes com LO relataram consumo de tabaco no e 54,5% consumo de álcool momento das coletas. Em relação aos sítios anatômicos da cavidade oral, das quais foram realizadas as cirurgias para excisão das lesões, 28,6% das HFs foram removidas da mucosa jugal e 28,6% do fundo de vestibulo. Em relação às LOs, a maioria (46,5%) foi proveniente da mucosa jugal, seguida do assoalho com 36,4% das lesões (tabela 2).

As informações histopatológicas completas dos casos de LO e CEC oral estão apresentados na tabela 3 e 4, respectivamente. Em relação ao aspecto clínico das LO, 54,5% apresentaram lesões homogêneas, em geral < 2,0 cm (63,6%) e 70% das displasias epiteliais foram classificadas como baixo risco de malignização.

Dos 22 casos de CEC oral, 19 (86,4%) eram homens e apenas 3 (13,6%) eram mulheres, com idade média de $61,0 \pm 9,83$ anos. Em relação aos hábitos, 100% dos pacientes se declararam tabagistas, com consumo de 8-40 cigarros por dia, por cerca de 40 anos; 19 (86,4%) dos pacientes se declararam etilistas, consumindo entre 500-5.000 mL de bebidas alcoólicas por dia. Em 50,0% dos pacientes o CEC foi diagnosticado na língua, especialmente na borda lateral, seguido do assoalho bucal (22,7%), trígono retromolar (13,6%), rebordo alveolar (9,1%) e mucosa jugal (4,5%). No que se refere ao tamanho do tumor (pT), 4 pacientes (26,7%) foram classificados como tumores T1/T2 e 11 (73,3%) com T3/T4. Nove (64,3%) pacientes apresentaram metástases regionais (N+), sendo que 4 (26,7%) apresentavam extensão extracapsular da metástase e todos os pacientes foram estadiados como M0.

Tabela 2 - Dados clínicos, demográficos e de estilo de vida dos casos controle e leucoplasia oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

		Casos (n) %			
		Controle (14)		LO (11)	
Sexo	Masculino	3	21,4%	7	63,6%
	Feminino	11	78,6%	4	36,4%
Idade	< 60	8	57,1%	3	27,3%
	≥ 60	6	42,9%	8	72,7%
Tabagismo	Sim/Ex	6	42,9%	11	100,0%
	Não	8	57,1%	0	0,0%
Etilismo	Sim/Ex	4	28,6%	6	54,5%
	Não	10	71,4%	5	45,5%
Sítio anatômico	Língua	1	7,1%		
	Assoalho			4	36,4%
	Rebordo alveolar	2	14,3%		
	Mucosa jugal	4	28,6%	5	45,5%
	Fundo de vestibulo	4	28,6%		
	Mucosa labial	3	21,4%		
	Gengiva			1	9,1%
	Outros			1	9,1%

Tabela 3 - Dados clínico-patológicos dos casos de leucoplasia oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

(continua)

	Casos	%
Aspecto clínico da lesão*		
(informação disponível de 11 pacientes)		
Homogênea	6	54,5%
Não homogênea	5	45,5%
Tamanho da lesão**		
(informação disponível de 11 pacientes)		
<2 cm	7	63,6%
≥2 cm	4	36,4%
†Critérios arquiteturais		
(informação disponível de 10 pacientes)		
Estratificação epitelial irregular		
Sim	10	100,0%
Não	0	0,0%
Perda de polaridade das células basais		
Sim	10	90,9%
Não	1	9,1%
Cristas epiteliais em forma de gota de orvalho		
Sim	6	60,0%
Não	4	40,0%
Aumento do número de figuras mitóticas		
Sim	0	0,0%
Não	10	100,0%
Mitoses anormalmente superficiais		
Sim	0	0,0%
Não	10	100,0%
Queratinização prematura em células individuais		
Sim	2	20,0%
Não	8	80,0%
Pérolas de queratina		
Sim	0	0,0%
Não	10	100,0%
Perda de coesão das células epiteliais		
Sim	1	10,0%
Não	9	90,0%

Tabela 3 - Dados clínico-patológicos dos casos de leucoplasia oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

(conclusão)

	Casos	%
†Critérios citológicos		
(informação disponível de 10 pacientes)		
Variação anormal do tamanho do núcleo		
Sim	3	30,0%
Não	7	70,0%
Variação anormal da forma do núcleo		
Sim	6	60,0%
Não	4	40,0%
Variação anormal do tamanho da célula		
Sim	2	20,0%
Não	8	80,0%
Variação anormal da forma da célula		
Sim	5	50,0%
Não	5	50,0%
Aumento da relação núcleo-citoplasma		
Sim	3	30,0%
Não	7	70,0%
Figuras mitóticas atípicas		
Sim	1	10,0%
Não	9	90,0%
Aumento do número e tamanho dos nucléolos		
Sim	2	20,0%
Não	8	80,0%
Hipercromasia		
Sim	7	70,0%
Não	3	30,0%
*Risco de malignização		
Alto	3	30,0%
Baixo	7	70,0%
§Infiltrado inflamatório na área displásica		
Sim	3	30,0%
Não	7	70,0%

*Warnakulasuriya et al., 2007

**van der Waal et al., 2002

† Kujan et al., 2006 e Nankivell et al., 2013

*Shaban et al., 2019

Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos casos de CEC oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

(continua)

	Casos (n)	%
Sexo		
(informação disponível de 22 pacientes)		
Masculino	19	86,4%
Feminino	3	13,6%
Idade		
(informação disponível de 22 pacientes)		
< 60	14	63,6%
≥ 60	8	36,4%
Tabagismo		
(informação disponível de 22 pacientes)		
Sim/Ex	22	100,0%
Não	0	0,0%
Consumo de cigarros por dia		
(informação disponível de 15 pacientes)		
≤10	1	6,7%
11-20	8	53,3%
21-30	1	6,7%
31-40	5	33,3%
Duração do hábito tabagista		
(informação disponível de 15 pacientes)		
<40 anos	7	46,7%
≥40 anos	8	53,3%
Etilismo		
(informação disponível de 22 pacientes)		
Sim/Ex	19	86,4%
Não	3	13,6%
Consumo de álcool por dia		
(informação disponível de 15 pacientes)		
500-1.500mL	7	46,7%
2.000-3.000mL	4	26,7%
4.000-5.000mL	3	20,0%
Sítio primário		
(informação disponível de 22 pacientes)		
Língua	11	50,0%
Assoalho	5	22,7%
Área retormolar	3	13,6%
Rebordo alveolar	2	9,1%
Mucosa jugal	1	4,5%

Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos casos de CEC oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

(continuação)

	Casos (n)	%
Características histopatológicas - AJCC 8ª edição		
Estadiamento patológico		
(informação disponível de 15 pacientes)		
pT1	2	13,3%
pT2	2	13,3%
pT3	3	20,0%
pT4a	8	53,3%
pNx	1	6,7%
pN0	5	33,3%
pN1	1	6,7%
pN2b	2	13,3%
pN2c	2	13,3%
pN3	1	6,7%
pN3b	3	20,0%
Extensão extracapsular		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Presente	4	26,7%
Ausente	11	73,3%
Grau de diferenciação		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Bem diferenciado	5	33,3%
Moderadamente diferenciado	10	66,7%
Profundidade de invasão		
(informação disponível de 14 pacientes)		
< 2cm	8	57,1%
> 2cm	6	42,9%
Espessura do tumor		
(informação disponível de 15 pacientes)		
< 2,5 cm	7	46,7%
> 2,5 cm	8	53,3%
Padrão de crescimento do tumor		
(informação disponível de 14 pacientes)		
Endofítico	11	78,6%
Exofítico	3	21,4%
Invasão angiolinfática		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Presente	8	53,3%
Ausente	7	46,7%
Invasão perineural		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Presente	11	73,3%
Ausente	4	26,7%

Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos casos de CEC oral incluídos neste estudo, obtidos após revisão dos prontuários eletrônicos.

(conclusão)

	Casos (n)	%
Infiltrado inflamatório linfomononuclear peritumoral		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Presente	14	93,3%
Ausente	1	6,7%
Infiltrado inflamatório linfomononuclear intratumoral		
(informação disponível de 15 pacientes)		
Presente	13	86,7%
Ausente	2	13,3%
WPOI* - pior padrão de invasão tumoral		
(informação disponível de 15 pacientes)		
WPOI 1-4	6	40,0%
WPOI 5	9	60,0%
Margens		
Comprometidas	3	20,0%
Livres	12	80,0%

5.2 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE NAFs, LAFs E CAFs ORAIS

NAF (fibroblasto associado ao tecido normal), LAF (fibroblasto associado a leucoplasia oral) e CAF (fibroblasto associado ao carcinoma espinocelular oral) cresceram em culturas primárias ao redor dos explantes de forma aderente e foram cultivados por aproximadamente 3 semanas até a obtenção de células suficientes para os experimentos e isolamento das VEs. O crescimento, a morfologia e a viabilidade das células foram monitorados diariamente com auxílio do microscópio e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, de acordo com o metabolismo celular. Para evitar a indução de senescência e a ativação das células *in vitro*, todos os NAFs, LAFs e CAFs foram cultivados até a passagem 3, sem congelamento e/ou descongelamento prévio ao estabelecimento das linhagens. A verificação de contaminação por micoplasma apresentou resultados negativos para todas as amostras utilizadas neste estudo.

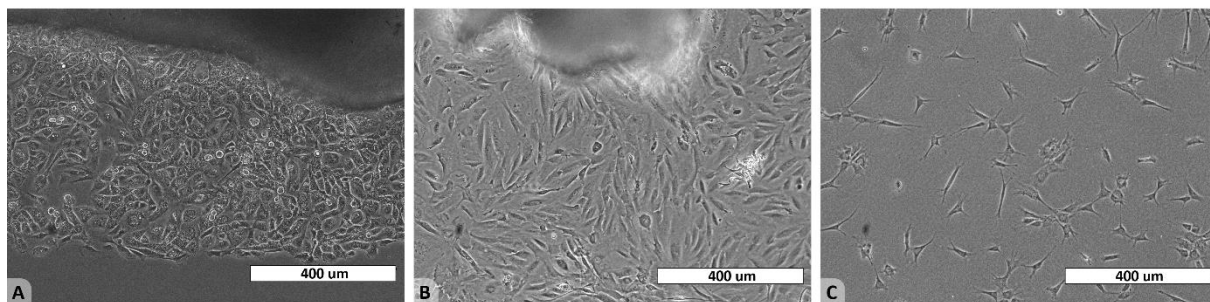
As células cobriram totalmente o fundo do frasco de 25 cm² (passagem 0) em tempos diferentes. Populações esparsas de NAF e LAF foram vistas ao redor do tecido após 5 dias de cultivo e cobriram totalmente o fundo da garrafa em ~8-10 dias. Em contraste, populações esparsas de CAFs migraram dos explantes em 3 dias de incubação e após ~6-8 dias notou-se a formação de uma monocamada confluyente.

Quando as células da P0 formaram uma monocamada confluyente de ~80%, elas foram descoladas da garrafa por tripsinização (Trypsina 2,500 g/L / EDTA 250 mg/L, Cultilab) e repicadas em uma garrafa de T75 cm² (passagem 1). O mesmo foi realizado para a P1, que por sua vez foi repicada para três placas de 150-mm de diâmetro (passagem 2). Quando as células da passagem 2 atingiram a confluência de ~80%, elas foram repicadas para 10 placas de 150-mm e identificadas como passagem 3. O tempo decorrido entre a P2 e P3 foi em média 4-6 dias. A Figura 2 mostra os NAFs, LAFs e CAFs em passagens 0 e 3.

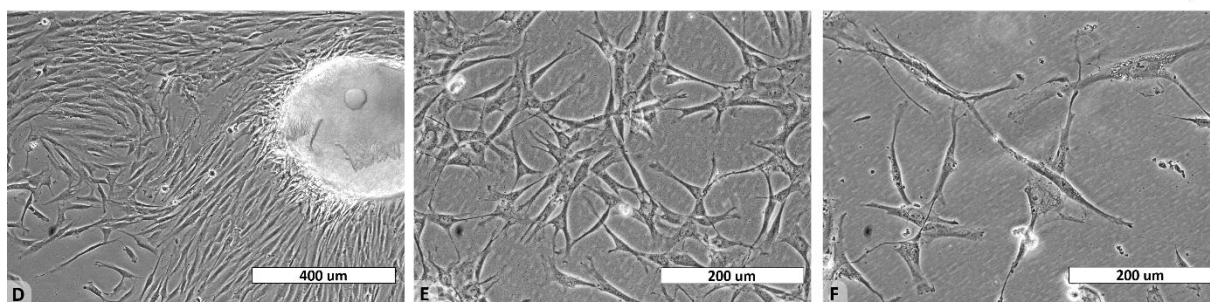
Após três passagens, uma população homogênea de células com morfologia fusiforme ou estrelada foi estabelecida para os três grupos de estudo (Figura 2). Além disso, não foi constatada contaminação por célula epitelial, visto que os queratinócitos não conseguiram crescer no meio DMEM completo utilizado e não suportaram as tripsinizações ao longo das 3 passagens. Nesse momento, o sobrenadante foi coletado para isolamento das VEs e as células foram descoladas das placas por tripsina e lavadas por 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x estéril, até que se apresentassem limpas e sem resíduos de meio de cultura. Em seguida as células foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até a realização das etapas de caracterização celular por RT-qPCR e LC-MS/MS.

Figura 2 - Fotomicrografias de contraste de fase mostrando fibroblastos primários isolados a partir da técnica do explante, crescidos em diferentes densidades celulares. Morfologicamente essas células apresentaram aspecto típico fusiforme ou estrelado. **A-B.** NAFs migrando do explante de tecido controle não maligno na passagem 0 (barras de escala em 400µm). **C.** Linhagem de NAFs estabelecida na passagem 3 (barras de escala em 400 µm). **D.** LAFs migrando do explante de LO (passagem 0, barras de escala em 400µm). **E-F.** LAFs na passagem 2 e 3, respectivamente (barras de escala em 200µm). **G.** CAFs migrando do explante de CEC oral na passagem 0 (barras de escala em 200µm) **H.** CAFs na passagem 2 (barras de escala em 400µm). **I.** Detalhes da morfologia de uma linhagem de CAF oral na passagem 3 (barras de escala em 400µm).

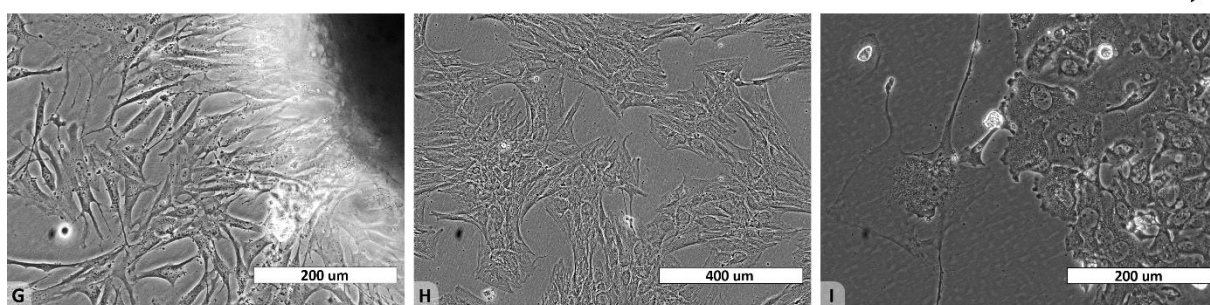
NAF - Fibroblasto associado ao tecido normal



LAF - Fibroblasto associado à leucoplasia oral



CAF - Fibroblasto associado ao carcinoma oral



Fonte: SÁ, J. O. et al. Manuscrito em preparação.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE FENÓTIPO CELULAR POR RT-QPCR

Embora os fibroblastos sejam facilmente reconhecidos por sua morfologia fusiforme e positividade para um marcador mesenquimal, geralmente vimentina, devido à existência de vários tipos de precursores celulares, tem sido reconhecido que a população de CAFs se comporta como células complexas, com vários fenótipos de fibroblastos e funções distintas entre muitos tipos de câncer (Öhlund et al., 2014; Elyada et al., 2019; Mao et al., 2021; Joshi et al., 2021). Portanto, para caracterizar de forma abrangente os fibroblastos orais isolados em cultura primária deste estudo, foram avaliados 12 NAFs, 9 LAFs e 21 CAFs por RT-qPCR.

Foram incluídos os marcadores comuns para fibroblastos já descritos na literatura (Wang et al., 2014; Inoue et al., 2014; Puram et al., 2017), aqui neste estudo denominados de panF e, como até o momento não existe um painel de marcadores definidos para caracterizar subpopulações de CAFs associados ao CEC oral, foram verificados os marcadores que classificam estas células em myCAF, iCAF e apCAF, de acordo com Elyada et al. (2019) (Tabela 1).

Para a visualização dos resultados, foi empregado o agrupamento hierárquico transformando os valores de expressão gênica relativa dos marcadores de fenótipo em *z-score*, com a ferramenta estatística R. (Figura 3A). Os testes *one-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey, foram aplicados para comparar os níveis de transcrição, logaritmizados na base 2, entre as amostras de NAF, LAF e CAF e os valores $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes, e estão mostrados na Figura 3B. A Figura 3C mostra o agrupamento hierárquico apenas dos genes diferenciais desta análise. Ambos os *heat maps* (Figura 3A e 3C) foram realizados usando a correlação de Pearson com o método Ward.

O agrupamento hierárquico dos casos, de acordo com o perfil de expressão dos genes mostrou três grandes grupos, de acordo com o fenótipo celular: 1º) delimitado do NAF 01 até o NAF 08; 2º) delimitado do NAF 05 até o CAF 02 e o 3º) delimitado entre o CAF 08 e CAF 06. Em geral, a separação das amostras não foi perfeita, entretanto os marcadores foram capazes de separar metade dos CAFs, que se encontra no terceiro agrupamento (Figura 3A).

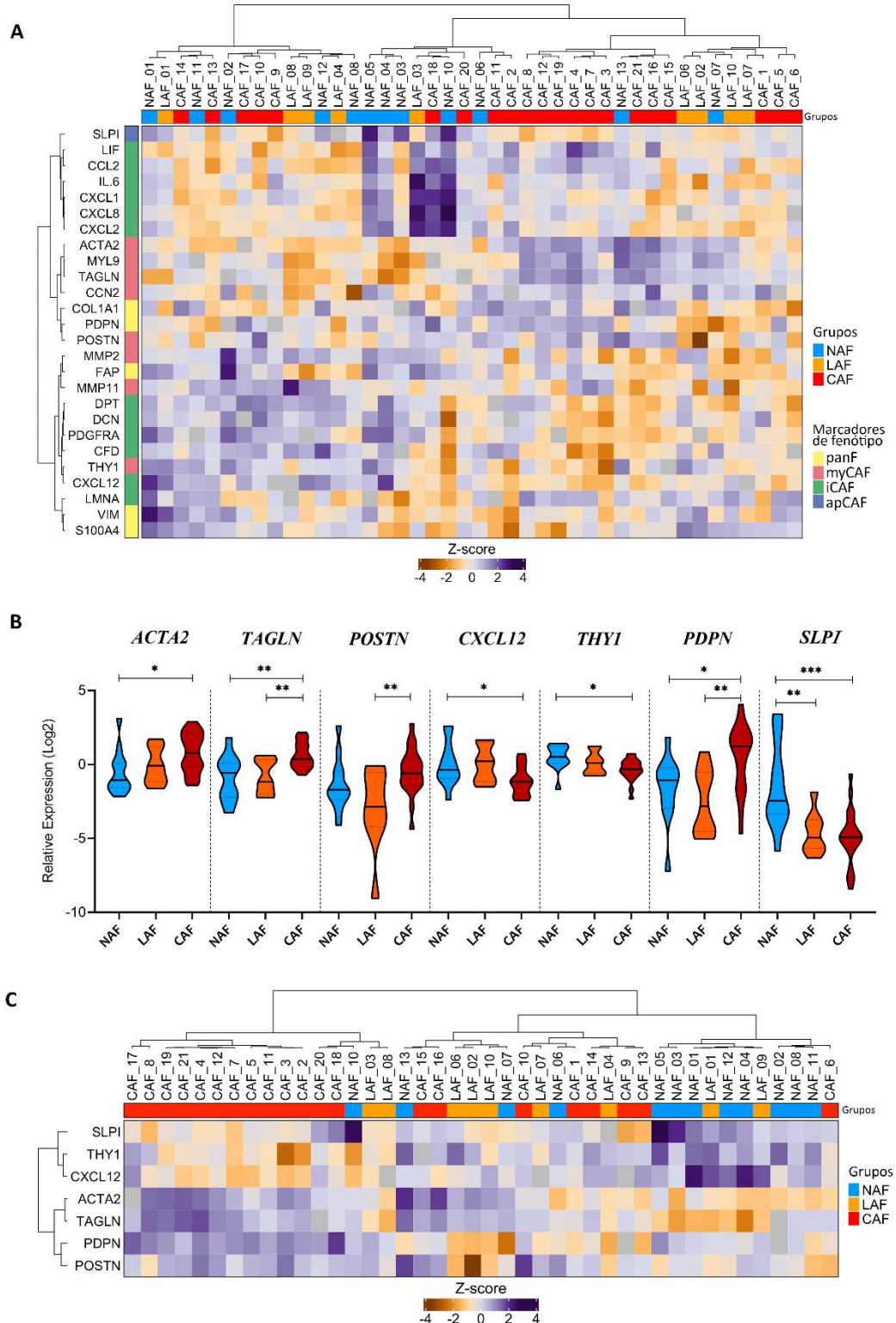
Para o agrupamento hierárquico dos genes marcadores diferenciais, três grandes grupos de NAFs, LAFs e CAFs são visualizados, sendo que a maioria dos CAFs se encontra no primeiro (Figura 3C). Em relação aos genes, 2 grupos são visualizados, sendo *SLPI* e *CXCL12*,

marcadores apCAF e iCAF, localizados no primeiro grupo, enquanto a maioria dos outros marcadores myCAF e panF se encontra no segundo grupo (Figura 3C).

Ao avaliar os genes diferenciais, os resultados mostram que as expressões de mRNA dos LAFs apresentaram expressão diminuída estatisticamente significativa do marcador *SLP1* comparado ao NAF, e expressão mais baixa de *PDPD* e *POSTN* comparado com as expressões desses genes nos CAFs (Figura 3B). Por sua vez, os CAFs orais apresentaram um perfil predominantemente miofibroblástico, caracterizado pela expressão aumentada estatisticamente significativa de *ACTA2*⁺, *POSTN*⁺, *TAGLN*⁺, *PDPN*⁺, *THY1*⁻, *CXCL12*⁻ e *SLP1*⁻ (Figura 3B).

O gene *SPLI* foi o único marcador de fenótipo que mostrou diferença estatisticamente significativa entre NAF vs. LAF e NAF vs. CAFs e, portanto, a expressão relativa de *SLPI*, logada na base 2, foi correlacionada com as características clínico-patológicas dos casos de LO e CEC oral. Entretanto, essa análise não mostrou associações significativas (dados não mostrados).

Figura 3 - Caracterização de marcadores de fenótipos dos NAFs-cel, LAFs-cel e CAFs-cel por RT-qPCR. **A.** Painel completo dos marcadores avaliados mostra o agrupamento hierárquico das amostras (12 NAFs, 9 LAFs e 22 CAFs) de acordo com o perfil panF, myCAF, iCAF e apCAF. Os valores de expressão gênica relativa foram transformados em z-score, usando a correlação de Pearson com o método Ward. **B.** Expressão relativa dos genes estatisticamente diferenciais entre os grupos (p-valor $\leq$ 0,05). A diferença estatística significativa entre dois grupos foi representada por barra e asteriscos, onde * representa p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. **C.** Painel dos marcadores diferenciais mostra o agrupamento hierárquico das amostras (12 NAFs, 9 LAFs e 22 CAFs) de acordo com o perfil panF, myCAF, iCAF e apCAF. Os valores de expressão gênica relativa de cada marcador foram transformados em z-score, usando a correlação de Pearson com o método Ward.



5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS VEs

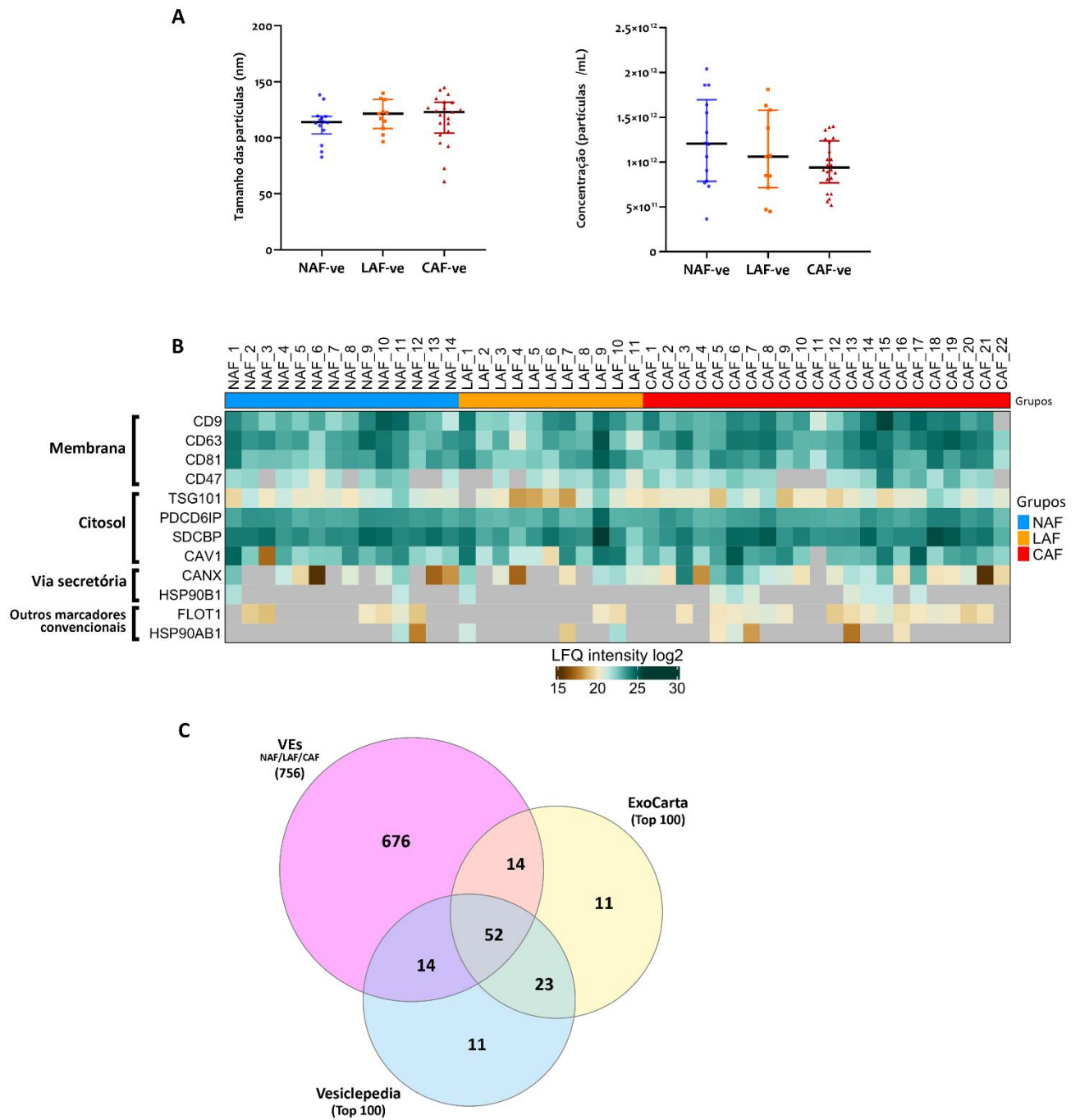
As VEs isoladas por ultracentrifugação diferencial foram caracterizadas quanto ao tamanho e concentração por análise de rastreamento de nanopartículas. NAF-ev mostraram um tamanho médio de $111,9 \pm 15,7$ nm, LAF-ve apresentaram um tamanho médio de $119,6 \pm 13,6$ nm enquanto CAF-ve mostraram tamanho médio de $116,9 \pm 21,4$ nm (Figura 4A). A concentração de VEs variou de acordo com o grupo estudado, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*one-way* ANOVA, $p\text{-valor} \leq 0,05$), conforme mostrado na Figura 4A.

Com base no conteúdo proteico identificado e quantificado por LC-MS/MS foi possível categorizar 12 marcadores geralmente identificados em VEs, de acordo com as Informações mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares (MISEV2018 - Théry et al. 2018). A Figura 4B mostra a abundância em $\log_2$ LFQ *intensity* das proteínas encontradas em membranas de VEs, incluindo as tetraspaninas (CD9, CD63, CD81); a proteína multipassagem CD47 e proteínas citosólicas como TSG101, PDGFR, SDCBP e CAV1. Todas as amostras apresentaram os marcadores genuínos de VEs, com abundâncias diferentes entre os grupos (Figura 4B). Foram observadas baixas abundâncias de proteínas da via secretória (Retículo Endoplasmático, Aparelho de Golgi e Lisossomos), como CANX e HSP90B1. Proteínas de outros compartimentos intracelulares, como mitocôndria (VDAC1) e núcleo (histonas, HIST1H* e CYC1) não foram identificadas nos dados de VEs deste trabalho. Os marcadores de exossomos convencionais, incluindo Flotilinas-1 e a proteína de choque térmico HSP90-beta (HSP90AB1), não foram bem identificadas nos fibroblastos orais humanos deste estudo.

O conjunto de dados de proteínas identificadas e quantificadas neste estudo foi comparado aos Bancos de Dados públicos de VEs. Os compêndios Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) e ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) catalogam proteínas, RNAs, lipídios e metabólitos que são identificados em todas as classes de VEs por meio de anotações contínuas da comunidade biomédica e de dados selecionados manualmente da literatura (Pathan et al., 2019; Keerthikumar et al., 2016). Atualmente, a Vesiclepedia contém dados obtidos de 1.254 estudos em VEs, 349.988 entradas de proteínas, 27.646 entradas de mRNA e 639 entradas de lipídios identificadas em 41 espécie. O banco de dados ExoCarta apresenta dados obtidos de 286 estudos, 41.860 entradas de proteínas, 11.692 entradas de mRNA e 1.116 entradas de lipídeos. O diagrama de Venn (Figura 4C) mostra as proteínas

únicas e compartilhadas entre os grupos deste estudo comparadas com as 100 principais entradas de proteínas nos Bancos Vesiclepedia e ExoCarta.

Figura 4 - Caracterização das 14 NAFs-ve, 11 LAFs-ve e 22 CAFs-ve. **A.** Gráficos mostram os tamanhos (nm) e concentrações (partículas/mL) de NAF-ve, LAF-ve e CAFs-ve. **B.** Agrupamento hierárquico mostra abundância ($\log_2$ LFQ intensity) das proteínas marcadoras de VEs transformadas em z-score. **C.** Proteínas únicas e compartilhadas entre NAF-ve, LAF-ve e CAFs-ve entre os bancos de dados públicos Vesiclepedia e ExoCarta.



Fonte: SÁ, J. O. et al. Manuscrito em preparação.

5.5 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS A PARTIR DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR PROTEÔMICA BASEADA EM DESCOBERTA DAS CÉLULAS E VESÍCULAS EXTRACELULARES

5.5.1 Análise quantitativa do proteoma de células e VEs das amostras de NAF, LAF e CAF

Este estudo empregou a proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas com aquisição dependente de dados para caracterizar o perfil proteômico total e das VEs de fibroblastos primários isolados de tecido controle não maligno, leucoplasia oral com displasia e CEC oral. Entende-se que a elucidação da biologia dos LAFs e CAFs orais pode fornecer novos *insights* sobre o fenótipo fibroblástico pró-oncogênico, além de características relacionadas ao pior prognóstico do pacientes com CEC oral.

A análise dos dados provenientes das células, após a exclusão das entradas identificadas unicamente por sítio de modificação bem como aquelas identificadas pelo banco reverso, identificou e quantificou 1.529 proteínas. Desse total, 1.443 proteínas são comuns aos três grupos, sendo que 17 foram encontradas exclusivamente em NAFs, 2 em LAFs e 34 proteínas em CAFs. Esses resultados podem ser visualizados no gráfico upset plot (Figura 5A).

A análise proteômica quantitativa das VEs identificou e quantificou o total de 1.754 proteínas. Após exclusão das proteínas referentes à espécie *Bos taurus*, que foram diferenciadas pela presença de peptídeos únicos em cada sequência, além da exclusão das proteínas do banco reverso e identificadas unicamente por sítio de modificação, o total de 756 proteínas humanas permaneceram na lista de identificadas e quantificadas. Um total de 671 proteínas foi compartilhado entre os três grupos, sendo que 7 proteínas foram encontradas exclusivamente em NAFs e 13 proteínas em CAFs. Nenhuma proteína foi exclusiva para LAFs, conforme mostrado no gráfico upset plot (Figura 5B).

O gráfico na Figura 5C mostra a distribuição e faixa dinâmica das proteínas identificadas e quantificadas em Cel. e VEs. Essa análise indicou que tanto o proteoma das células como das VEs abrangeu 5 ordens de magnitude, considerando as proteínas identificadas em VEs após exclusão das proteínas referentes à espécie *Bos taurus*, que previamente alcançou 6 ordens de magnitude.

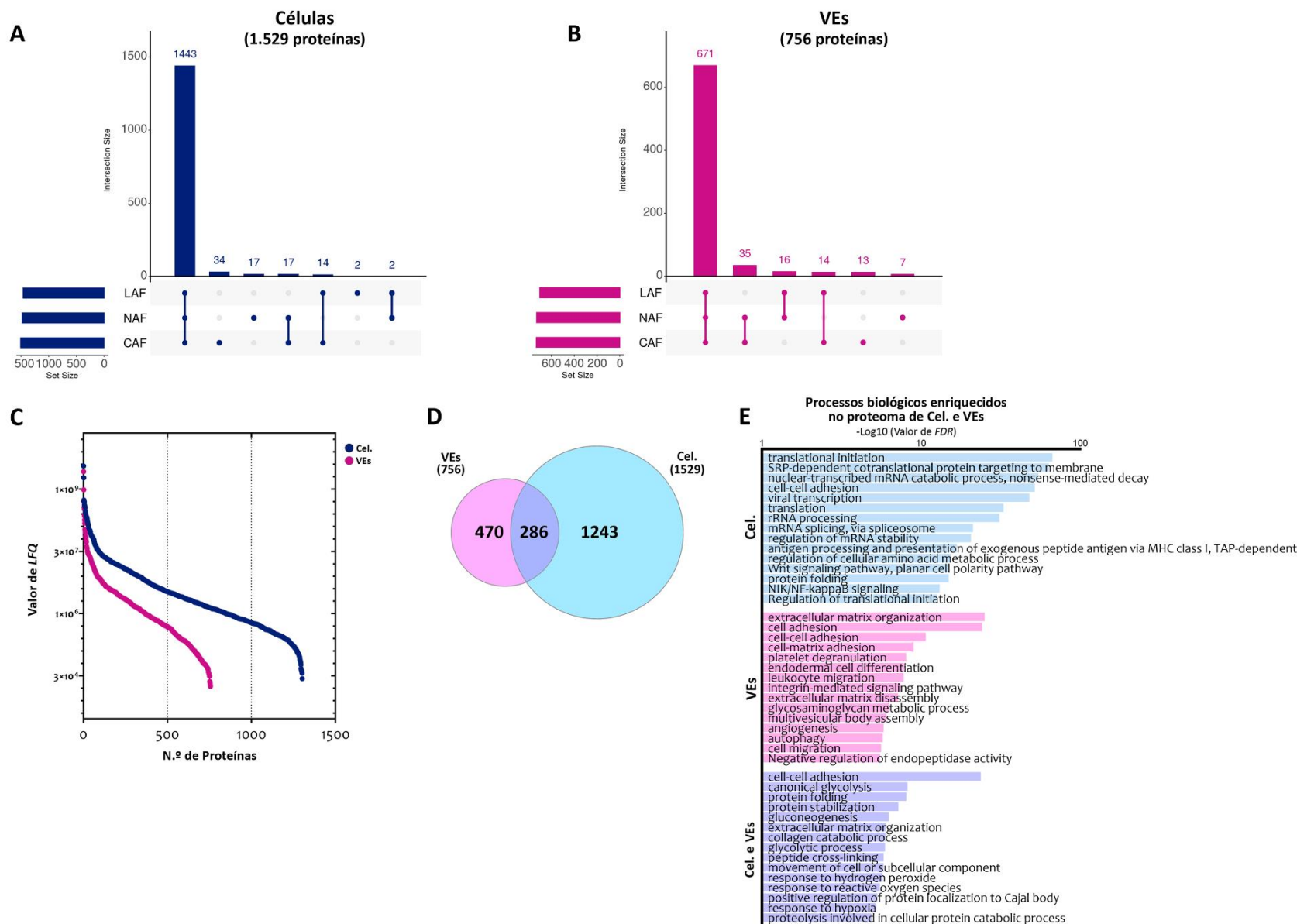
O diagrama de Venn mostra uma visão geral do repertório proteico dos fibroblastos orais e suas VEs (Figura 5D), analisado pelos principais processos biológicos enriquecidos referentes às proteínas exclusivas e compartilhadas em cada proteoma, com base na anotação GO, por meio da plataforma online DAVID (v.6.8). Os processos biológicos significativamente

enriquecidos (TOP-15) referentes às análises do proteoma identificado e quantificado nas células e VEs, assim como das proteínas compartilhadas (método Benjamini e Hochberg, FDR, $q\text{-valor} \leq 0,05$) são apresentados na Figura 5E e as tabelas com os resultados completos, incluindo o nome dos genes referentes à esta análise, se encontram nos Apêndices 1-3.

A iniciação da tradução ($q\text{-valor}=5.60\text{E-}64$), o direcionamento co-translacional de proteínas para o retículo endoplasmático ($q\text{-valor}=5.25\text{E-}61$), o mecanismo de decaimento do mRNA mediado por mutações nonsense ($q\text{-valor}=2.83\text{E-}52$) e o controle da polaridade celular ($q\text{-valor}=2.72\text{E-}13$) foram os principais termos do proteoma identificado nas células (Figura 5E, Apêndice 1), enquanto a organização da matriz extracelular ($q\text{-valor}=2.44\text{E-}22$), a adesão celular ($q\text{-valor}=850\text{E-}22$) e adesão célula-matriz ($q\text{-valor}=1.65\text{E-}08$) foram significativamente enriquecidos nas VEs. Além disso, outras categorias funcionais enriquecidas especificamente no proteoma das VEs foram a angiogênese ($q\text{-valor}=2.93\text{E-}04$) e a migração celular ($q\text{-valor}=4.14\text{E-}04$) (Figura 5E, Apêndice 2)

Dentre os termos significativamente enriquecidos referentes às proteínas compartilhadas entre Cel. e VEs, destacam-se a adesão celular ($q\text{-valor}=3.59\text{E-}21$), a glicólise canônica ($q\text{-valor}=4.85\text{E-}06$) e o metabolismo de proteínas ($q\text{-valor}=4.85\text{E-}06$) (Figura 5E, Apêndice 3).

Figura 5 - Análise quantitativa do proteoma de células e VEs das amostras de NAF (n=14), LAF (n=11) e CAF (n=22). **A.** Proteínas comuns e compartilhadas identificadas nas análises de células. **B.** Proteínas comuns e compartilhadas identificadas nas análises de VEs. **C.** Gráfico da intensidade e número de proteínas das células e VEs. **D.** Diagrama de Venn mostra o número de proteínas identificadas unicamente em células e VEs e o número de proteínas compartilhadas entre esses proteomas (análise baseada no número de acesso do *protein groups*). **E.** Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes (Benjamini e Hochberg, $FDR \leq 0,05$) avaliados do proteoma das células, VEs e das proteínas compartilhadas entre células e VEs (Top 15).



5.6 OS PROTEOMAS DAS CÉLULAS E SUAS VES AGRUPAM OS CASOS DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

O agrupamento hierárquico pode ser visualizado na Figura 6. O dendrograma mostra o perfil de agrupamento dos casos em relação à abundância das proteínas, que estão representadas em $\log_2$ LFQ *intensity* transformados em *z-score*. Os nós intermediários do dendrograma representam a magnitude da proximidade entre os indivíduos e a sua altura expressa a distância entre um par de indivíduos, entre um par de *clusters* ou ainda entre um indivíduo e um cluster. Em geral, três ramos principais foram gerados para as proteínas de células e 4 para VEs (Figuras 6A e 7A).

Para investigar a capacidade do repertório proteômico identificado e quantificado em agrupar os indivíduos de forma não supervisionada, as correlações entre as características clínico-patológicas e o agrupamento dos casos foram testadas por Qui-quadrado de Pearson, ($p\text{-valor} \leq 0,05$), selecionando os dendrogramas de células e VEs em diferentes níveis.

Os resultados mostraram que, quando o dendrograma da análise de células (47 amostras e 1.529 proteínas) foi categorizado em 2 *clusters*, o agrupamento dos pacientes se correlacionou com o diagnóstico ($p=0,012$), consumo de álcool ($p=0,042$) e presença e ausência de figuras mitóticas atípicas ($p=0,035$), esta última característica avaliada para os casos de LO (Figura 6B). A categorização do dendrograma em 3 *clusters* mostrou que os casos foram agrupados de acordo com a profundidade de invasão ($p=0,011$), padrão de crescimento do CEC oral ($p=0,047$) e invasão perineural ($p=0,012$). Esses resultados estão representados na Figura 6C.

As correlações clínico-patológicas para a análise de VEs (47 amostras e 756 proteínas) mostrou associação significativa do agrupamento dos casos quando o dendrograma também foi categorizado em 2 e 3 *clusters*. Com a divisão em 2 *clusters*, os casos se agruparam de acordo com o aumento da proporção núcleo-citoplasma ($p=0,016$), infiltrado inflamatório na área displásica ($p=0,016$), risco de malignização ($p=0,016$) e diferenciação histopatológica do CEC oral (Figura 7B). A categorização do dendrograma em 3 *clusters* mostrou que os casos se agruparam de acordo com a idade dos indivíduos ($p=0,030$) e com a diferenciação do tumor ($p=0,026$) (Figura 7C).

Figura 6 - **A.** Agrupamento hierárquico do perfil proteômico de células (TN=14, LO=11, CEC=22). A primeira barra colorida mostrada no topo do *heat map* indica as amostras de NAF-cel (azul), LAF-cel (laranja) e CAF-cel. (vermelha). Análise de agrupamento hierárquico foi realizada em ambiente R utilizando a combinação do método e métrica *Complete Euclidian* (1.529 *protein groups*). Os pares de barras intermediárias rosa e roxo / amarelo indicam o agrupamento das amostras no dendrograma dividido em 2 ou 3 *clusters* para as análises estatísticas dos dados clínico-patológicos dos casos. **B.** Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 2 *clusters*. **C.** Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 3 *clusters* (teste Quiquadrado de Pearson, $p \leq 0,05$).

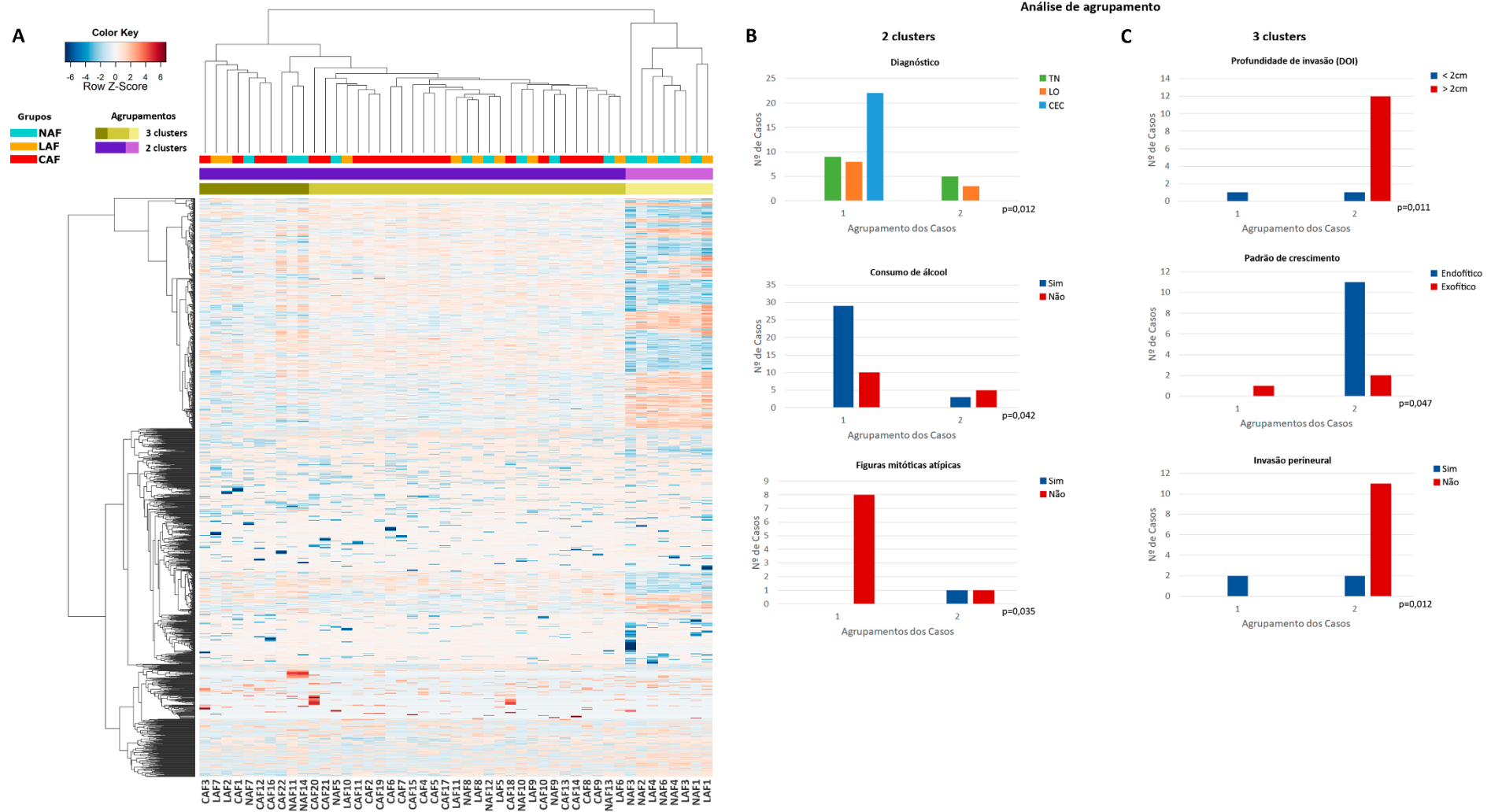
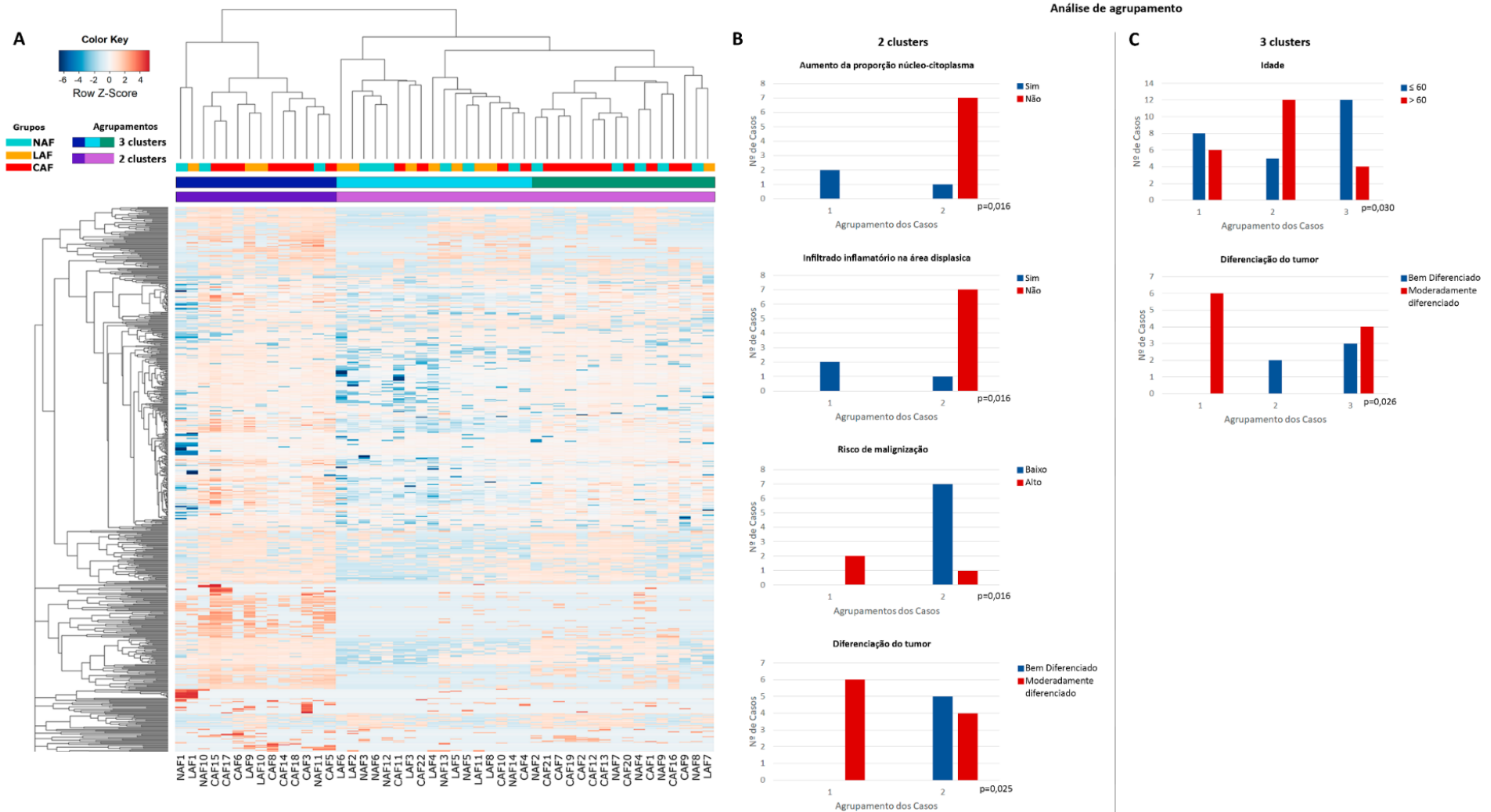


Figura 7 - Agrupamento hierárquico do perfil proteômico das VEs (TN=14, LO=11, CEC=22). A primeira barra colorida mostrada no topo do *heat map* indica as amostras de NAF-cel (azul), LAF-cel (laranja) e CAF-cel. (vermelha). Análise de agrupamento hierárquico foi realizada em ambiente R utilizando a combinação do método e métrica *Complete Braycurtis* (756 *protein groups*). Os pares de barras intermediárias rosa e roxo / azul e verde indicam o agrupamento das amostras no dendrograma dividido em 2 e 3 *clusters* para as análises estatísticas dos dados clínico-patológicos dos casos. **B.** Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 2 *clusters*. **C.** Análises estatísticas do agrupamento dos casos ao considerar a divisão em 3 *clusters* (teste Quiquadrado de Pearson, $p \leq 0,05$).



5.7. O AGRUPAMENTO DO REPERTÓRIO PROTEÔMICO DE CÉLULAS E VES DOS NAFs, LAFs E CAFs IDENTIFICA UM PERFIL MOLECULAR DISTINTO ENTRE OS CASOS DE LO E CEC ORAL

Para auxiliar na interpretação dos dados biológicos e identificar as características moleculares biologicamente relevantes entre os fibroblastos isolados de tecido controle não maligno, LO e CEC oral, realizou-se análises de agrupamento na plataforma VSCluster (Schwämmle and Jensen, 2018), para os dados de Cel. e VEs. O objetivo dessa análise foi encontrar perfis de proteínas que, quando localizadas em um mesmo *cluster*, apresentam mais características em comum entre si, nesse caso de abundância, do que as proteínas situadas em outro *cluster*, de forma que a avaliação individual dos pacientes não é considerada, como no agrupamento hierárquico.

A plataforma VSCluster baseia-se em um algoritmo derivado do agrupamento *fuzzy c-means* sendo capaz identificar estruturas de *cluster* em conjuntos de dados de alta dimensão, como os obtidos em experimentos de proteômica quantitativa. Enquanto as abordagens usuais de agrupamento descartam a variação das proteínas medidas, o VSClust combina testes estatísticos com reconhecimento de padrões em um algoritmo comum (Schwammle et al., 2018). O agrupamento *fuzzy c-means* foi aplicado e o valor do fuzzificador calculou o número ótimo de *clusters* para o conjunto de proteínas das células e VEs de acordo com Schwämmle e Jensen et al., 2018 (Figuras 8 e 9). Em seguida, as plataformas REACTOME (v77) e DAVID (v6.8) foram utilizadas para os diferentes agrupamentos *Fuzzy c-means* com o objetivo de identificar as vias e os componentes celulares enriquecidos para o conjunto de proteínas de cada *cluster*, respectivamente, usando o proteoma humano completo como referência.

As cores representadas nos *clusters* correspondem aos chamados valores de *Membership* e mostram o grau do quanto uma proteína pertence ao *cluster* mais próximo. Apenas as proteínas que apresentaram *Membership* >0,5, após avaliação do algoritmo *Fuzzy c-means*, foram consideradas para identificar as vias e os componentes celulares enriquecidos.

Para as análises dos *Clusters-cel*, o filtro aplicado de 50% de valores válidos em pelo menos um grupo resultou em 1.357 proteínas. O *Cluster-1* (Figura 10A) é representado pelas 387 proteínas mais abundante em CAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e NAFs. Quando avaliadas as vias biológicas nas quais as proteínas do *Cluster-1* participam, observa-se que estas estão enriquecidas principalmente nas vias do metabolismo de proteínas, especialmente no enrolamento de proteínas mediado por chaperonina e no dobramento de actina

e tubulina (*Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC; Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding*; p-valor= 1,11E-16), em vias do sistema imune (*Neutrophil degranulation*; p-valor= 1,11E-16), transdução de sinal (*Signaling by Rho GTPases, Miro GTPases and RHOBTB3*; p-valor= 2,22E-16) e ciclo celular (*The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint*; p-valor=1,11E-15).

O *Cluster-2 Cel* (Figura 10B) mostra as 288 proteínas mais abundantes em LAFs e simultaneamente menos abundantes em CAFs e LAFs, que estão envolvidas principalmente em vias do metabolismo de RNA (*Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex EJC*; p-valor= 1,11E-16), metabolismo de proteínas (*SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane*; p-valor=1,11E-16), iniciação da tradução (*Formation of a pool of free 40S subunits*; p-valor=1,11E-16), *L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression*; p-valor=1,11E-16), metabolismo de RNA (*Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)*; *Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol*; p-valor=1,11E-16) e sistema imune (*Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC*; p-valor=1,11E-16).

O *Cluster-3 Cel*. (Figura 10C) agrupou 241 proteínas que se mostraram mais abundantes em NAFs e menos abundantes em CAFs, um perfil oposto ao *Cluster-1*. Essas proteínas estão envolvidas na maioria das vias descritas no *Cluster-2*, sendo o que diferencia esse *cluster* do anterior são as vias de *Splicing* de mRNA (*mRNA Splicing - Major Pathway*; p-valor=1,11E-16), metabolismo de aminoácidos (*Selenocysteine synthesis*; p-valor=1,11E-16) e resposta celular ao estresse (*Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency*; p-valor=1,11E-16). Quando avaliados os principais componentes celulares no programa DAVID v6.8, constou-se principalmente o enriquecimento de proteínas de exossomos, citosol e membrana e para todos os *Clusters-cel* (gráfico de barras em preto de cada painel).

Para as análises dos *Clusters-ve*, o filtro aplicado de 50% de valores válidos em pelo menos um grupo resultou em 523 proteínas, que foram agrupadas em 3 *clusters* (Figura 11). O *Cluster-1* (Figura 11A) mostra as 185 proteínas mais abundantes nas VEs dos CAFs e simultaneamente menos abundantes em NAFs e LAFs. As principais vias biológicas sobrerrepresentadas (16 vias das 20 mostradas) nesse agrupamento estão relacionadas ao sistema imune (*Neutrophil degranulation*; *Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC*; *ER-Phagosome pathway*; *Endosomal/Vacuolar pathway Class I MHC*

mediated antigen processing & presentation; ER-Phagosome pathway; Antigen processing-Cross presentation; p-valor=1,11E-16; Interferon alpha/beta signaling; p-valor=6,18E-14; Interferon gamma signaling; p-valor=6,86E-13; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell; p-valor=1,10E-10).

O *Cluster-2* VEs (Figura 11B) mostra as 100 proteínas que estão significativamente menos abundantes em LAFs. Esse perfil não foi observado na análise dos *clusters* das Células. Curiosamente, o repertório proteico resultante desse agrupamento participa das mesmas 13 vias relacionadas ao sistema imune, observadas no *Cluster1-ve*. As vias observadas nesse agrupamento, que diferencia esse *Cluster* do anterior foram a formação do envelope cornificado e a queratinização (*Formation of the cornified envelope; p-valor=5,60E-12; Keratinization; p-valor=4,59E-09*), morte celular programada (*Apoptotic execution phase; p-valor=1,39E-05; Apoptotic cleavage of cellular proteins; p-valor=3,36E-05; Apoptotic cleavage of cell adhesion proteins; p-valor=3,36E-05*) e organização da matriz extracelular (*Collagen formation; p-valor=6,39E-05; Extracellular matrix organization; p-valor=7,05E-05*).

Por fim, o *Cluster-3* VEs (Figura 11C) é formado por 46 proteínas que estão mais abundantes em LAFs, um perfil oposto ao *Cluster-2*. Quando investigadas as vias biológicas, observa-se o enriquecimento de diversos processos que vão desde a regulação homeostática como a ativação, sinalização e agregação plaquetária (*Platelet degranulation; Response to elevated platelet cytosolic Ca²⁺; p-valor=1,65E-04*), organização da matriz extracelular e interações célula-matriz extracelular (*Laminin interactions; p-valor=2,75E-04; Cell-extracellular matrix interactions; p-valor=2,69E-03*), metabolismo de proteínas (*Post-translational protein phosphorylation; p-valor=9,74E-04; Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); p-valor=1,70E-03*), até vias relacionadas ao transporte de pequenas moléculas e transdução de sinal. Interessante a presença de uma via relacionada a sinalização de interleucina 12, referente ao sistema imune, (*Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation; p-valor=3,19E-03*) nesse grupo. As proteínas das VEs derivaram principalmente da membrana plasmática, adesão focal e matriz extracelular.

Figura 8 - Estimativa do número ideal de *clusters* para o conjunto de dados proteômicos de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel, de acordo com as abundâncias de proteínas logaritmizadas na base 2, realizada na plataforma *online* VSCLust. O número ideal foi definido pela distância mínima centróide, indicada pelo quadrado preto na imagem. O número ideal foi usado para realizar as análises de agrupamento subsequentes.

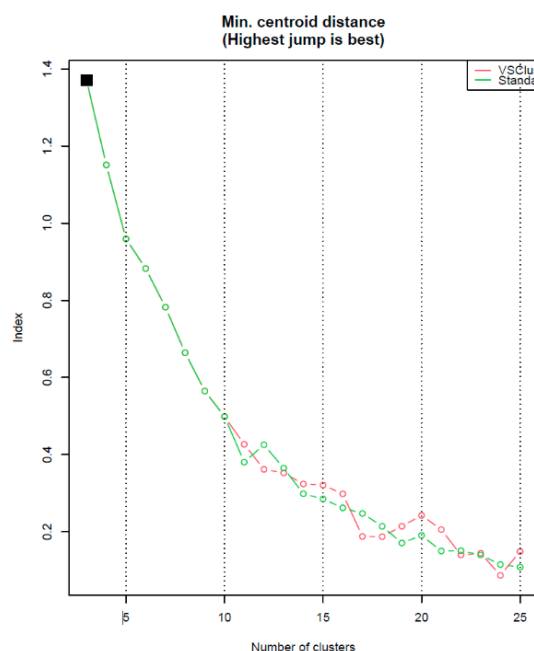


Figura 9 - Estimativa do número ideal de *clusters* para o conjunto de dados proteômicos de NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve, de acordo com as abundâncias de proteínas logaritmizadas na base 2, realizada na plataforma *online* VSCLust. O número ideal foi definido pela distância mínima centróide, indicada pelo quadrado preto na imagem. O número ideal foi usado para realizar as análises de agrupamento subsequentes.

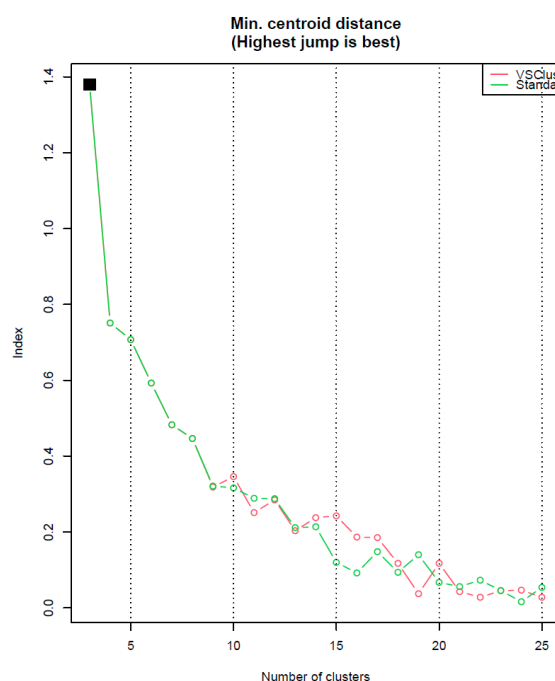


Figura 10 - Agrupamento do repertório proteômico de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel (primeiro gráfico, cor laranja) e análises de vias biológicas (segundo gráfico, cor azul) e componentes celulares enriquecidos (terceiro gráfico, cor preto). As cores representadas nos *clusters* correspondem aos chamados valores de *Membership* e apresentam o grau do quanto uma proteína pertence ao *cluster* mais próximo entre as amostras de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel. Apenas as proteínas que apresentaram *Membership* >0,5 são mostradas nos *clusters*. As vias e os componentes celulares significativamente enriquecidos estão listados ao lado e os resultados são mostrados em Log10 (p-valor $\leq 0,05$). Os valores de *Membership* são indicados no canto inferior esquerdo da figura. **A.** *Cluster-1* mostra as proteínas mais abundante em CAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e NAFs. **B.** *Cluster-2* mostra as proteínas mais abundante em LAFs e simultaneamente menos abundantes em NAFs e CAFs. **C.** *Cluster-3* mostra as proteínas mais abundante em NAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e CAFs.

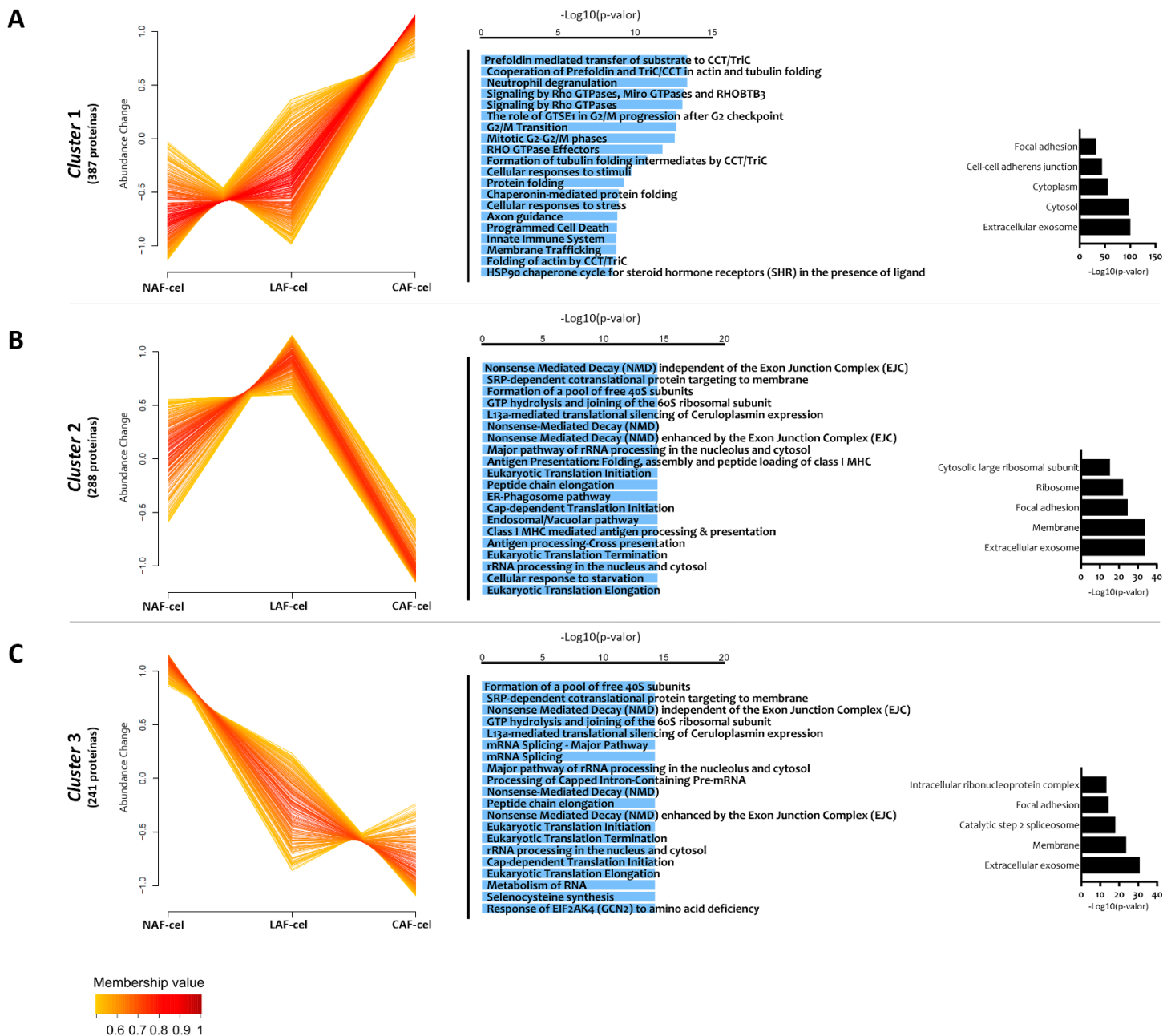
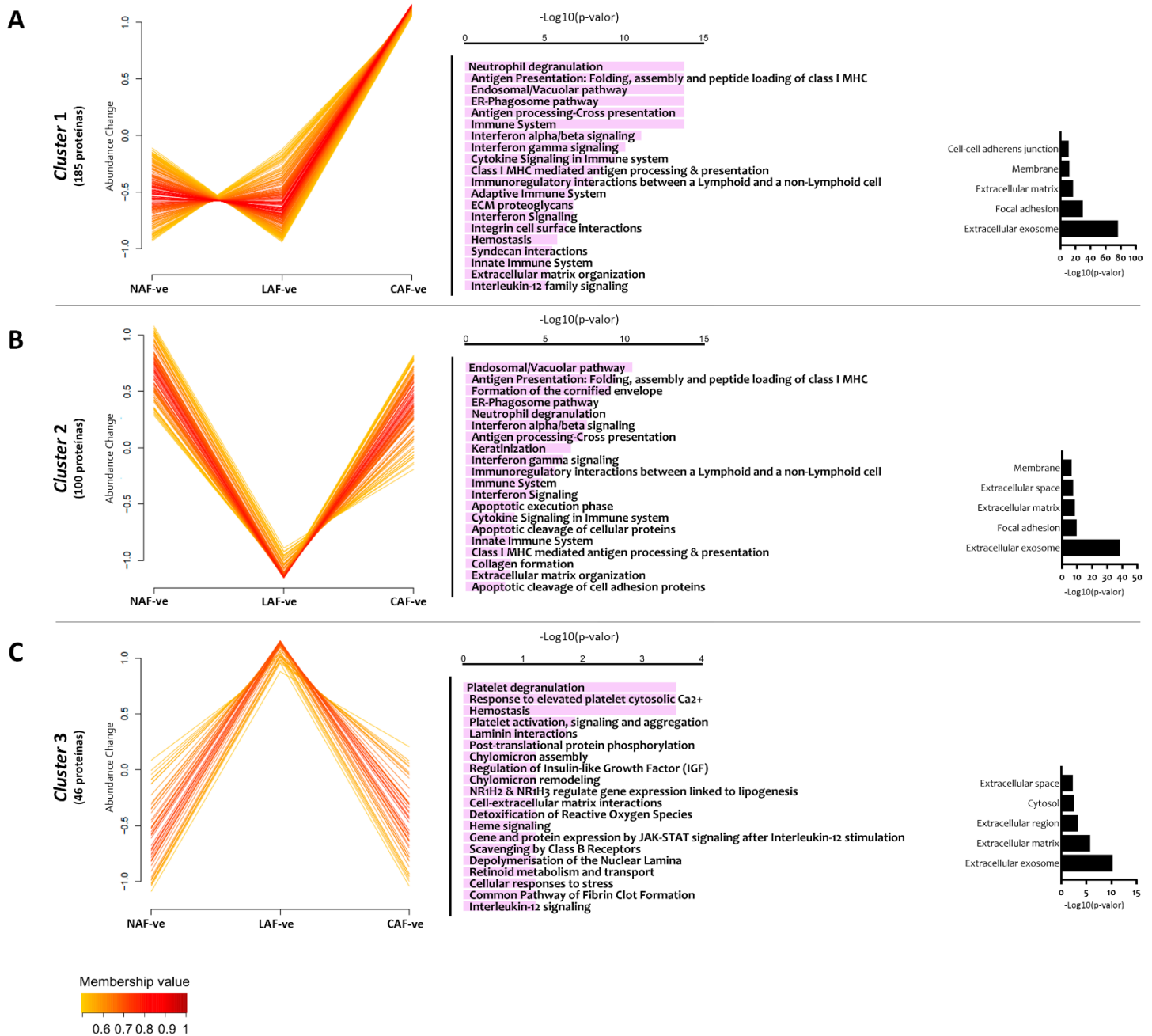


Figura 11 - Agrupamento do repertório proteômico de NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve (primeiro gráfico, cor laranja) e análises de vias biológicas (segundo gráfico, cor azul) e componentes celulares enriquecidos (terceiro gráfico, cor preto). As cores representadas nos *clusters* correspondem aos chamados valores de *Membership* e apresentam o grau do quanto uma proteína pertence ao *cluster* mais próximo entre as amostras de NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel. Apenas as proteínas que apresentaram *Membership* >0,5 são mostradas nos *clusters*. As vias e os componentes celulares significativamente enriquecidos estão listados ao lado e os resultados são mostrados em Log10 (p-valor $\leq 0,05$). Os valores de *Membership* são indicados no canto inferior esquerdo da figura. **A.** *Cluster-1* mostra as proteínas mais abundante em CAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e NAFs. **B.** *Cluster-2* mostra as proteínas menos abundante em LAFs e simultaneamente mais abundantes em NAFs e CAFs. **C.** *Cluster-3* mostra as proteínas mais abundante em LAFs e simultaneamente menos abundantes em LAFs e CAFs.



5.8 PRIORIZAÇÃO DE PROTEÍNAS-ALVO

Para identificar as proteínas diferencialmente abundantes entre NAFs, LAFs e CAFs, foi aplicado o teste de variância *one-way* ANOVA em conjunto com o pós-teste de Tukey HSD usando o programa Perseus v1.6.10.45 (considerando $p\text{-valor} \leq 0,05$ como nível de significância estatística) aos conjuntos de dados das células e VEs. Essa análise mostrou que, das 1.529 proteínas identificadas em Células, 396 apresentaram diferença estatisticamente significantes. Dos resultados de VEs, das 756 proteínas identificadas, 50 mostraram diferenças estatisticamente significantes. Os valores de p foram ajustados usando o teste de Storey (Storey et al., 2004), resultando em 19 proteínas diferenciais em células (Figura 12, Tabela 6). Para VEs, nenhuma proteína mostrou diferença significativa com valor de p ajustado, portanto, das 50 proteínas filtradas pelo teste de ANOVA, nesse momento foram consideradas as 46 que mostraram alguma diferença estatística entre os grupos pelo teste de Tukey, para análises posteriores (Figura 12 e Tabela 7).

Das 19 proteínas resultantes em células, 11 mostraram significância estatística ($p\text{-valor} \leq 0,05$) na associação com dados clínico-patológicos e das 46 proteínas resultantes da análise em VEs, 38 foram significativamente correlacionadas com os dados clínico-patológicos. Como o foco principal deste estudo foi identificar proteínas em NAFs, LAFs e CAFs que poderiam estar associadas à malignização, foi almejado priorizar aquelas que apresentassem pelo menos diferenças estatísticas entre NAF vs. LAF e NAF vs. CAF. Dessa forma, as proteínas que foram associadas a alguma característica clínico-patológica foram consideradas como proteínas marcadoras de malignização. Nesse grupo foram selecionadas as proteínas CAMK2D, SHBGRL e AK1 do conjunto de dados das células e a proteína TNFRSF11B do conjunto de dados das VEs. É importante ressaltar que outras proteínas não selecionadas podem ser potencialmente associadas à malignização se confirmada a abundância ou expressão por outros métodos, já que pela análise de proteômica em fase da descoberta não atingiram significância entre NAF vs. LAF.

Figura 12 - Proteínas diferenciais entre NAFs, LAFs e CAFs por LC-MS/MS do conjunto de dados de Células (19 proteínas após *one-way* ANOVA, p -valor $\leq 0,05$) e Teste de Storey, q -valor $\leq 0,05$) e VEs (47 proteínas após *one-way* ANOVA p -valor $\leq 0,05$), em conjunto com o pós-teste de Tukey, $p\leq 0,05$.

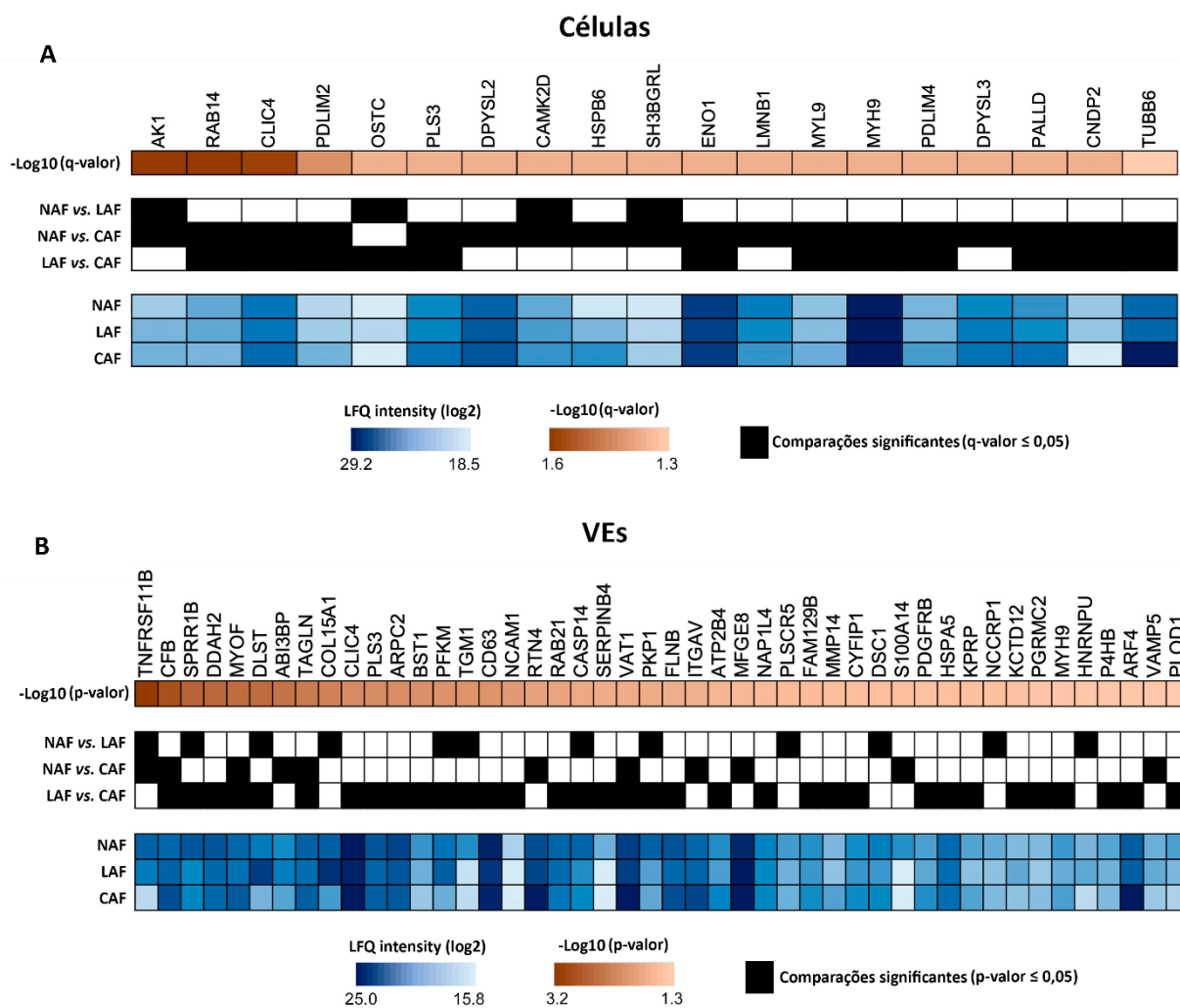


Tabela 5 - Proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-cel, LAF-cel e CAF-cel por LC-MS/MS a partir do teste *one-way* ANOVA e correção de Storey ($p \leq 0,05$).

Nome do Gene	Número de Acesso Uniprot	Proteína	p-valor (ANOVA, $p \leq 0,05$)	q-valor (Storey, $p \leq 0,05$)
<i>RAB14</i>	P61106	<i>Ras-related protein Rab-14</i>	2.58E-05	0.0235172
<i>AK1</i>	P00568	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	2.96E-05	0.0235172
<i>CLIC4</i>	Q9Y696	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>	4.59E-05	0.0243117
<i>PDLIM2</i>	Q96JY6	<i>PDZ and LIM domain protein 2</i>	8.83E-05	0.03507718
<i>CAMK2D</i>	Q13557	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta</i>	0.000170863	0.04059454
<i>MYL9</i>	P24844	<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	0.00021683	0.04059454
<i>DPYSL2</i>	Q16555	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	0.000273613	0.04059454
<i>DPYSL3</i>	Q14195	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 3</i>	0.000295545	0.04059454
<i>MYH9</i>	P35579	<i>Myosin-9</i>	0.000300454	0.04059454
<i>ENO1</i>	P06733	<i>Alpha-enolase</i>	0.000327452	0.04059454
<i>PDLIM4</i>	P50479	<i>PDZ and LIM domain protein 4</i>	0.000359663	0.04059454
<i>LMNB1</i>	P20700	<i>Lamin-B1</i>	0.000362034	0.04059454
<i>SH3BGRL</i>	O75368	<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>	0.000363468	0.04059454
<i>PALLD</i>	Q8WX93	<i>Palladin</i>	0.000401279	0.04059454
<i>OSTC</i>	Q9NRP0	<i>Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC</i>	0.000438838	0.04059454
<i>CNDP2</i>	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	0.000439367	0.04059454
<i>HSPB6</i>	O14558	<i>Heat shock protein beta-6</i>	0.000448814	0.04059454
<i>PLS3</i>	P13797	<i>Plastin-3</i>	0.00045985	0.04059454
<i>TUBB6</i>	Q9BUF5	<i>Tubulin beta-6 chain</i>	0.000559948	0.04682934

Tabela 6 - Proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve por LC-MS/MS a partir do teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$).

(continua)

Nome do Gene	Número de Acesso Uniprot	Proteína	p-valor (ANOVA, $p \leq 0,05$)	q-valor (Storey, $p \leq 0,05$)
<i>NCAM1</i>	A0A087WWD4	<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>	0.0103403	0.522457263
<i>COL15A1</i>	A0A087X0K0	<i>Collagen alpha-1(XV) chain</i>	0.00494108	0.448994133
<i>HNRNPU</i>	A0A1W2PP35	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	0.0416358	0.85403
<i>PFKM</i>	F8VZI0	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type</i>	0.00819983	0.448994133
<i>PLSCR5</i>	A0PG75	<i>Phospholipid scramblase family member 5</i>	0.0284932	0.798237714
<i>BST1</i>	H0Y984	<i>ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2</i>	0.00771802	0.448994133
<i>NAP1L4</i>	A8MXH2	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 4</i>	0.0268232	0.798237714
<i>CFB</i>	E7ETN3	<i>Complement factor B</i>	0.00114565	0.4191888
<i>ABI3BP</i>	H7C556	<i>Target of Nesh-SH3</i>	0.00310868	0.426333257
<i>CD63</i>	F8VNT9	<i>Tetraspanin; CD63 antigen</i>	0.00837635	0.448994133
<i>TNFRSF11B</i>	O00300	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B</i>	0.00058124	0.4191888
<i>ARPC2</i>	O15144	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 2</i>	0.00708636	0.448994133
<i>PGRMC2</i>	O15173	<i>Membrane-associated progesterone receptor component 2</i>	0.0392754	0.85403
<i>FLNB</i>	O75369	<i>Filamin-B</i>	0.0184283	0.680429538
<i>VAMP5</i>	O95183	<i>Vesicle-associated membrane protein 5</i>	0.043783	0.857789388
<i>DDAH2</i>	O95865	<i>N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i>	0.00226755	0.4191888
<i>HSPB1</i>	P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	0.0497134	0.865023086
<i>ITGAV</i>	P06756	<i>Integrin alpha-V</i>	0.0204401	0.726759111
<i>P4HB</i>	P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	0.0419537	0.85403
<i>PDGFRB</i>	P09619	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>	0.0338281	0.798237714
<i>HSPA5</i>	P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	0.0341851	0.798237714
<i>PLS3</i>	P13797	<i>Plastin-3</i>	0.00686138	0.448994133
<i>ARF4</i>	P18085	<i>ADP-ribosylation factor 4</i>	0.0427015	0.85403
<i>SPRR1B</i>	P22528	<i>Cornifin-B; Cornifin-A</i>	0.00205139	0.4191888
<i>TGM1</i>	P22735	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K</i>	0.00832979	0.448994133

Tabela 6 - Proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve por LC-MS/MS a partir do teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$).

(conclusão)				
Nome do Gene	Número de Acesso Uniprot	Proteína	p-valor (ANOVA, $p \leq 0,05$)	q-valor (Storey, $p \leq 0,05$)
<i>ATP2B4</i>	P23634	<i>Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4</i>	0.0240728	0.798237714
<i>CASP14</i>	P31944	<i>Caspase-14</i>	0.0160035	0.680429538
<i>GPC1</i>	P35052	<i>Glypican-1</i>	0.0460219	0.865023086
<i>MYH9</i>	P35579	<i>Myosin-9</i>	0.0403379	0.85403
<i>DLST</i>	P36957	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase*</i>	0.00261993	0.4191888
<i>SERPINB4</i>	P48594	<i>Serpin B4</i>	0.0181319	0.680429538
<i>MMP14</i>	P50281	<i>Matrix metalloproteinase-14</i>	0.0312234	0.798237714
<i>RAB5C</i>	P51148	<i>Ras-related protein Rab-5C</i>	0.0378982	0.846099349
<i>TAGLN</i>	Q01995	<i>Transgelin</i>	0.00400789	0.448994133
<i>PLOD1</i>	Q02809	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>	0.0471905	0.865023086
<i>MFGE8</i>	Q08431	<i>Lactadherin</i>	0.0250851	0.798237714
<i>DSC1</i>	Q08554	<i>Desmocollin-1</i>	0.0328171	0.798237714
<i>PKP1</i>	Q13835	<i>Plakophilin-1</i>	0.0183596	0.680429538
<i>KPRP</i>	Q5T749	<i>Keratinocyte proline-rich protein</i>	0.0342529	0.798237714
<i>NCCRP1</i>	Q6ZVX7	<i>F-box only protein 50</i>	0.0344603	0.798237714
<i>CYFIP1</i>	Q7L576	<i>Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1</i>	0.031642	0.798237714
<i>KCTD12</i>	Q96CX2	<i>BTB/POZ domain-containing protein KCTD12</i>	0.0349229	0.798237714
<i>FAM129B</i>	Q96TA1	<i>Niban-like protein 1</i>	0.0285827	0.798237714
<i>VAT1</i>	Q99536	<i>Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog</i>	0.0183009	0.680429538
<i>S100A14</i>	Q9HCY8	<i>Protein S100-A14</i>	0.0333204	0.798237714
<i>RTN4</i>	Q9NQC3	<i>Reticulon-4</i>	0.0129349	0.6208752
<i>MYOF</i>	Q9NZM1	<i>Myoferlin</i>	0.00260768	0.4191888
<i>RAB21</i>	Q9UL25	<i>Ras-related protein Rab-21</i>	0.0142532	0.651574857
<i>PSAT1</i>	Q9Y617	<i>Phosphoserine aminotransferase</i>	0.0326644	0.798237714
<i>CLIC4</i>	Q9Y696	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>	0.00645081	0.448994133

*Nome completo da proteína: Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial

5.9 PROTEÍNAS-ALVO E CORRELAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS DE LO E CEC ORAL

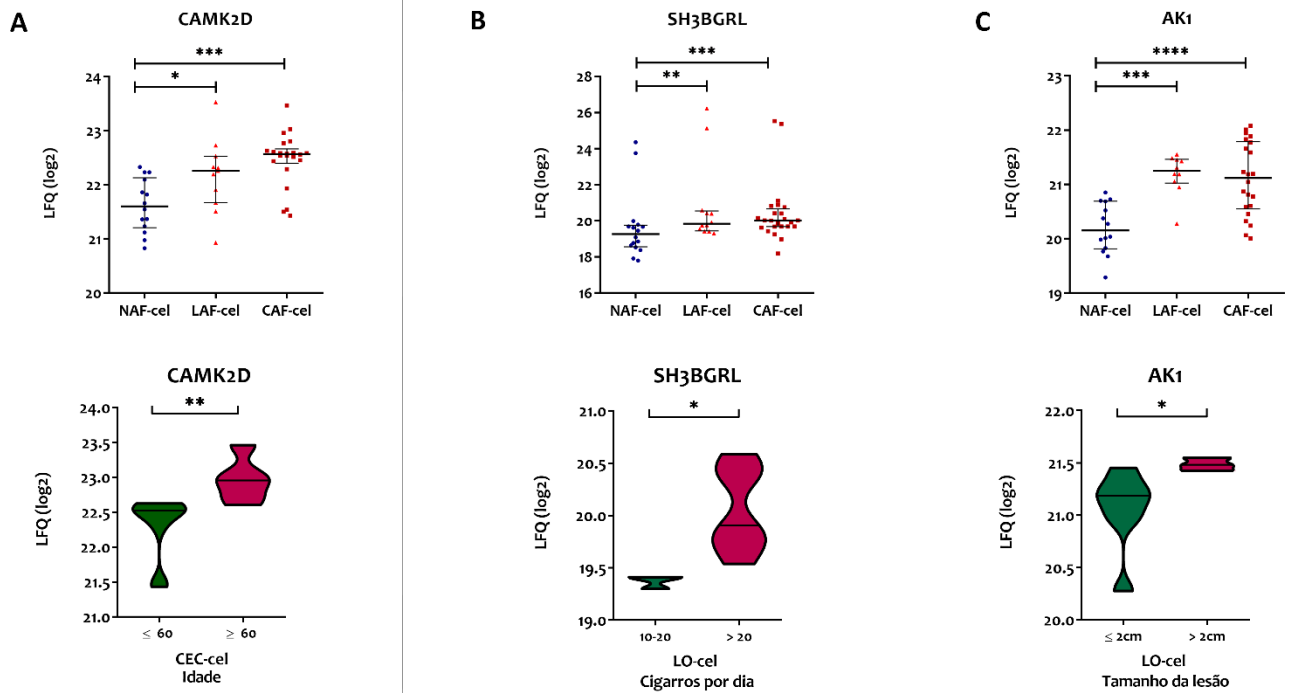
Do conjunto de dados das células, foram priorizadas as proteínas CAMK2D (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta*), SH3BGRL (*SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3*) e AK1 (*Adenylate kinase isoenzyme 1*). Do conjunto de dados das VEs, foi priorizada a proteína TNFRSF11B (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B*) (Figura 13).

Dos resultados da associação entre a abundância das proteínas das células com as características clínico-patológicas dos casos, as proteínas CAMK2D e SH3BGRL apresentaram intensidades normalizadas mais altas em amostras de CAF e LAF em comparação com NAF (Figuras 13 A-B) e associação estatisticamente significativa com a idade dos casos de CEC oral ($p=0,001$) e consumo de cigarros por dia dos casos de LO ($p=0,017$), respectivamente. A proteína AK1 mostrou intensidades normalizadas mais altas em amostras de LAF e CAF (Figura 13C) em comparação com NAF e correlação significativa com o tamanho das lesões de LO ($p=0,033$).

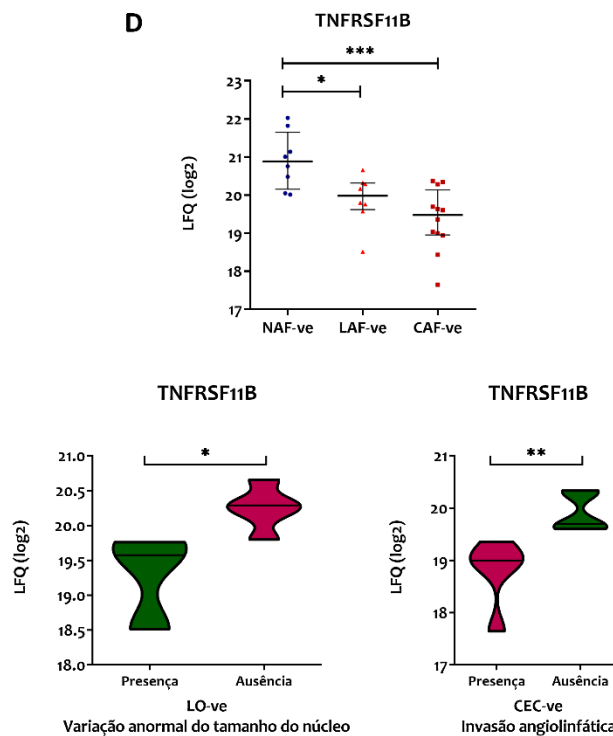
A associação entre as proteínas das VEs com as características clínico-patológicas dos casos mostrou que a proteína TNFRSF11B apresentou intensidades normalizadas mais baixas nas amostras de CAF e LAF em comparação com NAF (Figura 13D) e associação estatisticamente significativa com a ausência de variação anormal do tamanho dos núcleos dos casos de LO ($p=0,036$) e com a ausência de invasão angiolinfática dos casos de CEC oral ($p=0,009$).

Figura 13 - Perfil das proteínas estatisticamente significantes em relação às suas abundâncias entre NAF, LAF e CAF, do conjunto de dados das Células e das VEs, que apresentaram correlação com os dados clínico-patológicos dos casos de LO e CEC oral por análises estatísticas não paramétricas. Os gráficos apresentam as associações com $p\text{-valor} \leq 0,05$ do teste U de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. A diferença estatística significativa entre dois grupos está representada por barra e asteriscos, onde * representa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A identidade da proteína está representada pelo respectivo nome do gene.

Células



VEs



6 DISCUSSÃO

6.1 Os CAFs ORAIS APRESENTAM ASSINATURA MIOFIBROBLÁSTICA

Nos tecidos homeostáticos, as células epiteliais encontram-se estritamente separadas do tecido conjuntivo pela membrana basal (MB), uma estrutura de matriz extracelular (MEC) especializada, responsável pela integridade, elasticidade, sinalização bioquímica e mecânica dos tecidos, ao mesmo tempo que facilita as interações intra e intercelulares (Armstrong et al., 2000). Fibroblastos quiescentes são encontrados dispersos no tecido conjuntivo próximos à MB e representam um importante sensor de integridade do tecido com atividade metabólica e transcricional mínima, que são fundamentais na definição do estado de diferenciação do epitélio adjacente por meio da secreção de fatores de sinalização, além da produção dos componentes da MEC, como colágeno, fibronectina e elastina a uma taxa mínima para manter a MB complacente e resistente à tensão (Tschumperlin et al., 2013; Sekiguchi et al., 2018). Após um sinal de dano tecidual, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos e orquestram o reparo tecidual por meio da síntese de componentes da matriz e da comunicação com células do sistema imunológico (McAnulty & Laurent, 2002; Sahai et al., 2020).

Durante o surgimento de alterações citológicas e arquiteturais, caracterizadas histologicamente por proliferação epitelial anormal ou atípica, que refletem a perda da maturação e do padrão de estratificação do epitélio superficial, as células alteradas ainda se encontram delimitadas no tecido epitelial e separadas do estroma circundante, contidas dentro dos limites da MB, assim como acontece no carcinoma *in situ* (Kalluri et al., 2006; Glentis et al., 2017). Não obstante, até o momento ainda há questionamentos se as alterações nas propriedades do estroma precedem ou são consequência da proliferação dos queratinócitos transformados. Ademais, os mecanismos moleculares e o tempo de recrutamento e ativação de fibroblastos no estágio pré-invasivo (como na displasia epitelial e no carcinoma *in situ*) são mal compreendidos (Kalluri, 2003; Glentis et al., 2017). Em contrapartida, tem sido evidenciado que durante a invasão dos tecidos, os queratinócitos alterados induzem uma série de modificações no estroma adjacente e que a desregulação das condições fisiológicas durante a iniciação do tumor, acompanhada por uma resposta inflamatória crônica, leva à ativação dos fibroblastos e sua diferenciação em CAFs, que expressam constitutivamente a proteína α -actina de músculo liso (Mueller et al., 2004; Yu et al., 2014; Glentis et al., 2017; Labernadie et al.,

2017; Fiori et al., 2019). No entanto, as origens e funções celulares precisas dos CAFs permanecem ambíguas e desafiadoras, especialmente devido à substancial heterogeneidade fenotípica e funcional dessas células e, conseqüentemente, pela falta de biomarcadores definitivos (Öhlund et al., 2014; Elyada et al., 2019; Mao et al., 2021).

As células tumorais requerem comunicação ativa com as células vizinhas e seu microambiente local. Durante a última década, o papel crítico das VEs na comunicação célula-célula entre as células tumorais e as células imunológicas do microambiente do tumor primário tem sido destacado (Peinado et al., 2011; Peinado et al., 2012; Maas et al., 2017; Hoshino et al., 2015; Hoshino et al., 2020). Acredita-se que as VEs participam de várias etapas durante os processos invasivos e, após sua disseminação pela circulação sanguínea, inicia o estabelecimento de nichos metastáticos em órgãos distantes (Peinado et al., 2011; Hood et al., 2011; Rana et al., 2013). Uma vez liberadas no espaço extracelular, as VEs podem atingir as células receptoras e entregar seu conteúdo que, conseqüentemente, impacta diretamente nas respostas funcionais e nas mudanças fenotípicas que afetarão o estado patológico do organismo (van Niel et al., 2018).

Considerando a perspectiva de que os fibroblastos atuam como sensores e receptores de sinais químicos e físicos, que são gerados e propagados no microambiente em homeostase e associados ao câncer, e que seu fenótipo evolui concomitante à massa tumoral, sendo, portanto, considerados extremamente influentes nesse processo, o objetivo desse estudo foi i) buscar por marcadores de transformação maligna em fibroblastos isolados de três condições clínicas distintas: tecido não neoplásico, potencialmente maligno e carcinoma espinocelular oral por meio da proteômica das células e das suas VEs; e 2) correlacionar esses achados com os dados clínico-patológicos da coorte de casos de LO e CEC oral.

Os CAFs têm sido encontrados nos carcinomas espinocelulares orais principalmente próximos às ilhas tumorais e no fronte invasivo em estudos com imuno-histoquímica pela expressão de α -SMA (Kellermann et al., 2007; Mezawa et al., 2016; Sobral et al., 2011; Cirillo et al., 2017; Takahashi et al., 2017; Bello et al., 2011; Bagordakis et al., 2016; Dourado et al., 2018). Em CEC oral, os CAFs são diferenciados dos fibroblastos quiescentes pela expressão da proteína de ativação de fibroblastos (FAP), proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) α/β e vimentina. Entretanto, ainda há controversas sobre a detecção de miofibroblastos α -SMA positivos em lesões

potencialmente malignas da mucosa oral. Enquanto alguns trabalhos constataram a presença destas células no estroma de leucoplasias orais com displasia usando a técnica de imunohistoquímica, (Vered et al., 2009; Seifi et al., 2010; Chaudhary et al., 2012) outras pesquisas não confirmaram este resultado (Kellermann et al., 2007; Etemad Moghadam et al., 2009; De Assis et al., 2012; Rodrigues et al., 2015).

Recentemente, Öhlund e colaboradores (2017) identificaram pela primeira vez dois subconjuntos espacialmente distintos e totalmente opostos de CAFs no adenocarcinoma ductal pancreático – os CAFs miofibroblásticos (myCAFs) e os CAFs inflamatórios (iCAFs). Os myCAFs estão localizados nas proximidades de células cancerosas e apresentam alta expressão de α -SMA, enquanto os iCAFs estão localizados mais distantes das células neoplásicas e expressam menos α -SMA, entretanto secretam IL-6 e outros fatores inflamatórios (por exemplo, IL-8, IL-11 e LIF), e podem participar na supressão imunológica por estimular a via de sinalização STAT3. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores confirmou a existência de myCAF e iCAF e denominou uma nova subpopulação de CAF como apresentadores de antígenos (apCAFs), que expressam MHC de classe II, CD74 e SLPI ao invés de moléculas coestimulatórias clássicas (Elyada et al., 2019).

Para caracterizar os fenótipos das populações de NAFs, LAFs e CAFs deste estudo, os níveis diferenciais de expressão gênica foram estudados por análises de RT-qPCR. Foram incluídos os marcadores comuns para fibroblastos já descritos na literatura, aqui neste estudo denominados de panF (*VIM*, *FAP*, *S100A4*, *PDPN*, *COL1A1*) e, como ainda como não existe na literatura um painel de marcadores definidos para caracterizar subpopulações de CAFs associados ao CEC oral, foram verificados os marcadores que classificam estas células em myCAF (*ACTA2*, *TAGLN*, *MYL9*, *POSTN*, *MMP11*, *CCN2*, *THY1*, *MMP2*, *DCN*), iCAF (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL12*, *CXCL8*, *CFD*, *PDGFRA*, *IL-6*, *LIF*, *LMNA*, *CCL2*, *DPT*) e apCAF (*SLPI*) de acordo com Elyada et al. (2019) (Figura 3).

Considerando que a detecção de CAFs no estroma tumoral pode ser um potencial marcador biológico para determinar a presença de microinvasão e que a heterogeneidade dos CAFs representa um desafio da biologia tumoral, a próxima etapa desse estudo foi analisar se os CAFs orais isolados de tumores primários representavam subpopulações de myCAF, iCAF e apCAFs (Elyada et al., 2019), como também avaliar a expressão desses genes nos LAFs. Os resultados dessa análise confirmaram que, os NAFs, LAFs e CAFs orais expressaram o

marcador mesenquimal panF *VIM*. Nessa categoria, *PDPN* mostrou expressão aumentada significativa em CAF em comparação com NAF e LAF, não havendo diferença estatística significativa entre NAF e LAF. Entretanto, os marcadores de ativação *FAP* e *S100A4*, já descritos na literatura como marcadores de fibroblastos orais ativados, não foram superexpressos nas amostras de CAFs deste estudo. Ademais, não foi constatado aumento significativo da expressão do marcador *COL1A1*. Em geral, quando avaliados os agrupamentos hierárquicos, os marcadores de fenótipo não separaram perfeitamente as amostras, entretanto, foi possível observar que a maioria dos CAFs se encontra localizada em grupos específicos do *heat map* (Figura 3).

Codificada pelo gene *PDPN* humano, a podoplanina é uma glicoproteína transmembrana do tipo mucina que é amplamente distribuída na superfície de vários tipos de células, no entanto, durante a transformação maligna, a expressão de *PDPN* sofre alterações quantitativas e qualitativas importantes (Wicki et al., 2006). Nos últimos anos estudos relataram a superexpressão de *PDPN* em áreas hiperplásicas e displásicas (Kawaguchi et al., 2008) e nas desordens potencialmente malignas orais, como leucoplasia, eritroleucoplasia, líquen plano e também em carcinomas *in situ* (Zhang et al., 2009; Shi et al., 2010; Funayama et al., 2011; Feng et al., 2012; Kreppel et al., 2012; de Vicente et al., 2013).

Kawaguchi e colaboradores relataram a forte associação entre a alta expressão de *PDPN*, a nível de proteína, e o desenvolvimento de CEC a partir da leucoplasia oral em um estudo prospectivo de 7,5 anos de acompanhamento. Um estudo retrospectivo recente conduzido por Kreppel e colaboradores também detectou resultados semelhantes. Embora o papel exato da *PDPN* ainda seja discutível, a forte associação estatística entre sua expressão e o risco de transformação maligna oral apoia o presumível papel dessa proteína na carcinogênese. É importante ressaltar que, independentemente do tipo de lesão potencialmente maligna e da natureza do estudo, os pesquisadores reforçam que a validade da classificação histológica da *PDPN* como marcador preditivo na avaliação do risco de câncer oral é questionável, devido às variações substanciais inter e intra-observador (Kawaguchi et al., 2008; Kreppel et al., 2012). A expressão consistente e significativa de *PDPN* nas desordens potencialmente malignas orais não apenas sugere esta proteína como um poderoso marcador que prediz a lesão displásica verdadeira pelo aumento dos parâmetros clínicos e histológicos estabelecidos, mas também que este marcador pode ser útil para orientar as condutas de tratamento dos pacientes (Kawaguchi et al., 2008; Kreppel et al., 2012).

A regulação positiva da expressão de PDPN foi observada em diferentes tipos de tumores experimentais e humanos, incluindo carcinomas de células escamosas da pele, pulmão, esôfago, colo do útero, laringe e cavidade oral (Gandarillas et al., 1997; Martín-Villar et al., 2005; Schacht et al., 2005; Kato et al., 2005; Wicki et al., 2006). Em carcinomas de células escamosas, a expressão de podoplanina é frequentemente restrita à frente invasiva, com expressão aumentada na extensão da membrana, ou seja, em filopódios e lamelópodes de queratinócitos (Martín-Villar et al., 2005). Embora não seja específico para fibroblastos, pois também é expressa em células tumorais epiteliais e macrófagos, estudos recentes sugerem que este marcador poderia ser potencialmente usado para identificar subpopulações de CAFs pró-tumorigênicos (Shindo et al., 2013; Cueni et al., 2010; Pula et al., 2011; Kawase et al., 2008; Yamanashi et al., 2009).

O perfil de expressão gênica myCAF (Figura 3) caracterizado como contrátil e reparador de danos, principalmente por sua capacidade de produção dos componentes da MEC, foi evidente nos resultados do presente estudo. A caracterização celular por RT-qPCR mostrou expressão aumentada significativa do gene envolvido no contexto da remodelação do citoesqueleto de actina, motilidade e geração de força contrátil (Rockey et al., 2013), (*ACTA2*); diferenciação, migração celular e formação de podossomos (Assinder et al., 2009), (*TAGLN*); e cicatrização de feridas e fibrose (Walker et al., 2016) (*POSTN*). Esses achados corroboram com a constatação de que uma das marcas registradas dos CAFs é a produção excessiva de componentes da matriz extracelular (Fullar et al., 2015; Pickup et al., 2014). O aumento da rigidez da MEC, resultante do espessamento das fibras de colágeno e da atividade dos CAFs favorece a migração, a sobrevivência e a proliferação de células cancerosas (Pickup et al., 2014) e, conseqüentemente, restringe o acesso das células do sistema imunológico, servindo assim como uma barreira física (Sorokin et al., 2010). Esse mecanismo já foi associado à falta de resposta à terapia anti-PDL1, particularmente em alguns tumores com assinatura gênica que reflete alta sinalização de TGF β 1 nos CAFs. De forma consistente, o co-tratamento de tumores colorretais e de mama de camundongos com inibidores contra TGF β e PD-L1 reduziu a expressão de enzimas modificadoras da MEC por CAFs, permitindo a infiltração de células T, que conseqüentemente reduziu a carga do tumor primário e metastático, presumivelmente por superar o fenótipo de exclusão imunológica (Chakravarthy et al., 2018). Assim, a remodelação e fibrose da MEC mediadas por CAF são eventos importantes que contribuem para a formação

de um microambiente imunossuprimido que promove o crescimento tumoral e a formação de metástases (Sorokin et al., 2010; Chakravarthy et al., 2018).

Curiosamente, a expressão do gene *THY1*, também pertencente à assinatura myCAF e envolvido principalmente na ativação de células T e apoptose (Saalbach et al., 2000), foi estatisticamente diminuída em CAFs em relação aos NAFs e LAFs (Figura 3). Tem sido discutido que a expressão da proteína Thy-1 divide fibroblastos de vários tecidos em dois grupos funcionalmente diferentes: Thy-1⁺ e Thy-1⁻ (Koumas et al., 2001). Apenas fibroblastos positivos para Thy-1 produzem proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) e expressam CD40, uma glicoproteína de superfície celular envolvida na ativação, proliferação e produção de citocinas de células T, em resposta à estimulação de IL-1 (Koumas et al., 2001).

A assinatura iCAF, descrita por apresentar um perfil imunomodulador e regulador da inflamação, pois expressa altos níveis de citocinas e quimiocinas (Elyada et al., 2019), não foi evidente neste trabalho. Dos 11 genes iCAFs avaliados, apenas a expressão de mRNA do gene *CXCL12* mostrou diferença estatisticamente significativa, entretanto menos expresso em CAFs em comparação com NAFs e sem diferença estatisticamente significativa em relação aos LAFs. *CXCL12*, também conhecida como fator 1 derivado do estroma (SDF-1), é uma quimiocina amplamente secretada em diferentes tecidos por células do estroma, fibroblastos e células epiteliais em seis diferentes isoformas, codificadas no cromossomo 10q11 (Meng et al., 2018). No microambiente tumoral, os CAFs e as células-tronco mesenquimais/estromais expressam constitutivamente *CXCL12* e esta sinalização parácrina aumenta a proliferação e sobrevivência de células tumorais positivas para CXCR4. Além disso, o baixo nível de oxigênio no microambiente melhora significativamente a expressão de *CXCL12*, bem como os níveis de superfície de CXCR4 em células tumorais. Assim, o eixo *CXCL12*/CXCR4 desempenha um papel crítico na regulação do crescimento tumoral, pois ativa vias de sinalização que afetam a angiogênese tumoral, proliferação de células tumorais e a quimiorresistência e, portanto, tem sido estudada como alvo potencial para as terapias oncológicas (Meng et al., 2018).

Resultado similar foi observado para o único marcador apCAF investigado. O gene *SLPI* já foi previamente identificado como pró-inflamatório em fibroblastos displásicos de pele (Erez et al., 2010) e é considerado um dos marcadores apCAF mais proeminentes em adenocarcinoma de pâncreas murino (Elyada et al., 2019), sendo associado a capacidade imunomodulatória e apresentadora de antígeno. A proteína SLPI é descrita como potente

inibidora de serino-proteinases, com várias funções relevantes para a defesa inata do hospedeiro, incluindo atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Como seus níveis sistêmicos são baixos, acredita-se que SLPI atue no nível tecidual, ao contrário dos inibidores de serino-proteinase circulantes. Além disso, a recente descoberta da expressão de SLPI epitelial durante o reparo de feridas cutâneas gerou interesse no papel desta molécula na resposta fisiológica de cicatrização de feridas (Ashcroft et al., 2000). No presente estudo, a expressão gênica de *SLPI* foi significativamente aumentada nos fibroblastos associados ao tecido controle não maligno quando comparado com a expressão gênica em LAFs e CAFs. Em contrapartida, apesar desse gene ter sido o único alvo que mostrou diferenças estatísticas significantes entre NAF vs. LAF e NAF vs.CAF, considerando o contexto da malignização, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão relativa de SLPI com as características clínico-patológicas dos casos de LO e CEC estudados. Apesar disso, esse resultado é interessante, pois pode indicar que os LAFs e CAFs apresentam menor capacidade pró-inflamatória e de apresentação de antígenos. Entretanto, outros alvos nessa via de regulação precisam ser avaliados para consolidar esse conhecimento.

O perfil de expressão gênica identificada neste estudo mostrou que, em geral, enquanto os NAFs-cel apresentam resposta fisiológica associada a um microambiente homeostático, com baixa atividade no contexto da remodelação do citoesqueleto de actina, de motilidade e geração de força contrátil e com expressão aumentada de genes relacionados ao contexto imunológico, os CAFs expressaram mais mRNA de genes com características de remodelação e geração de força contrátil e mostraram baixa atividade de secretar moléculas inflamatórias e apresentadoras de antígeno no microambiente tumoral. Neste contexto, tem sido persistente na literatura as constatações de que tumores com assinaturas estromais altas estão associados à resistência terapêutica e à recorrência da doença (Correia et al., 2012; Finak et al., 2008; Calon et al., 2015; Liu et al., 2016; Fiori et al., 2019). No entanto, vale ressaltar que o presente estudo apresenta a limitação de não ter realizado ensaios funcionais para verificar o papel das proteínas relacionadas à assinatura dos LAFs e CAFs orais nos principais eventos biológicos associados à tumorigênese oral.

A caracterização dos fibroblastos orais primários provenientes da coorte de pacientes com CEC oral deste estudo indica que a heterogeneidade dos CAFs orais representa um aspecto pertinente da biologia tumoral. Devido à existência de vários tipos de precursores celulares, as populações de CAFs se comportam como células complexas e com funções distintas entre

muitos tipos de câncer (Kalluri et al., 2016; Elyada et al., 2019; Biffi et al., 2019). A existência simultânea de CAFs com propriedades diferentes dentro do MT pode depender da origem da célula precursora e/ou do estágio evolutivo do microambiente em questão (Elyada et al., 2019), sendo coerente a afirmação de que os CAFs orais possam representar um fenótipo ou estado funcional, em vez de um tipo específico de célula (Li et al., 2015).

Dessa forma, esses achados convergem na hipótese de que possam existir populações diferentes de CAFs para conjuntos específicos de funcionalidades dentro do microambiente tumoral do CEC oral, como contratilidade aprimorada e diferenças na síntese de proteínas, como citocinas, quimiocinas e moléculas relacionadas à apresentação de antígenos. Com base nesses dados, foi formulada a hipótese de que os LAFs primários com perfil de expressão diminuída estatisticamente significativa do gene pró-inflamatório e apresentador de antígeno *SLPI* e os CAFs com expressão aumentada estatisticamente significativa, em especial de genes envolvidos no contexto da remodelação do citoesqueleto de actina, motilidade, geração de força contrátil, diferenciação, migração celular e formação de podossomos (*ACTA2*⁺, *POSTN*⁺, *TAGLN*⁺), poderiam levar à identificação de proteínas totais e secretadas que estivessem envolvidas na promoção de um microambiente permissivo no contexto das leucoplasia orais com displasia e do CEC oral. Em sequência, análises por espectrometria de massas com aquisição dependente de dados foram utilizadas para caracterizar o perfil proteico de 14 NAFs, 11 LAFs e 22 CAFs e, também, do seu subproteoma em VEs.

6.2 VES ISOLADAS DE NAF, LAF E CAF SÃO ENRIQUECIDAS DE TETRASPANINAS

A caracterização das VEs por rastreamento de nanopartículas mostrou que todas as partículas isoladas por ultracentrifugação diferencial apresentaram tamanhos médios de 116,0±18,1 nm de diâmetro e estão na faixa de tamanho esperado (50-150 nm) para serem classificadas como VEs (Willms et al., 2018; Niel et al., 2018; Kalluri & LeBleu, 2020). Esses resultados corroboram com os achados de trabalhos que também isolaram VEs de células em culturas primárias (Dourado et al., 2019; Principe et al., 2018).

Os NAFs, LAFs e CAFs deste estudo foram enriquecidos de marcadores de VEs, incluindo as tetraspaninas CD9, CD63, CD81, classicamente usadas como marcadores de exossomos (Kowal et al., 2016; Kalluri e LeBleu, 2020) e proteínas citosólicas como TSG101,

PDCD6IP, SDCBP e CAV. Esses resultados estão de acordo com as diretrizes internacionalmente aceitas (Théry et al., 2018) e sugerem que provavelmente tais proteínas, especialmente as tetraspaninas, sejam bons marcadores pan-exossomo para VEs isoladas de fibroblastos orais. Curiosamente, marcadores considerados convencionais para VEs, como Flotilinas-1 e a proteína de choque térmico HSP90-beta (HSP90AB1), não foram identificadas e quantificadas em todas as amostras de fibroblastos orais humanos deste estudo. Além disso, proteínas de compartimentos intracelulares como mitocôndria (VDAC1) e núcleo (histonas, HIST1H* e CYC1) não foram identificadas no banco de dados de VEs deste trabalho, o que indica que as VEs isoladas não foram contaminadas por componentes intracelulares e mostra a pureza do isolamento dessas partículas.

É importante salientar que os marcadores biológicos atuais podem não reconhecer todas as subpopulações de VEs com conteúdo específicos (Willms et al., 2018). O microambiente e a biologia inerente das células podem influenciar o conteúdo das VEs e de seus marcadores biológicos, o que impacta diretamente no tamanho das partículas e, consequentemente, nas células receptoras. Embora as análises do conteúdo vesicular exijam grandes *pools* de amostras, nem todas as VEs contêm uma abundância semelhante de uma determinada carga/conteúdo (Pathan et al., 2019).

Ressalta-se ainda que os efeitos das VEs nas células receptoras podem ser diferentes devido a expressão variada de receptores de superfície celular, e dessa maneira, a heterogeneidade funcional pode resultar em um conjunto de VEs responsáveis por induzir a sobrevivência celular, outro conjunto responsável pela apoptose e um conjunto diferente induzindo imunomodulação etc., em diferentes tipos de células-alvo. A heterogeneidade também pode ser baseada no órgão e tecido de origem dos exossomos, incluindo se eles são de células neoplásicas, dando-lhes propriedades distintas como tropismo para certos órgãos e captação por tipos específicos de células (Pathan et al., 2019).

6.3 O REPERTÓRIO PROTEÔMICO DOS LAF-VE E CAF-VE ESTÃO ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Neste estudo, dados proteômicos foram obtidos pela quantificação sem marcação (do Inglês, *label-free*) dos espectros gerados, assim como empregado em outros trabalhos que avaliaram amostras biológicas por LC-MS/MS (Carnielli et al., 2018; Busso-Lopes et al., 2021).

Cabe salientar que a combinação da análise proteômica das células e suas VEs isoladas de tecido primário permitiu a correlação entre a abundância dessas moléculas com informações clínico-patológicas valiosas no contexto das lesões potencialmente malignas e do CEC oral.

Outra abordagem relevante deste estudo foi o uso de ferramentas estratégicas de bioinformática para trabalhar com a grande quantidade de dados gerados, como o agrupamento do repertório proteômico aplicado para o conjunto de dados das células e das VEs, utilizando o VSCluster. Essa ferramenta permitiu identificar agrupamentos de proteínas que estão simultaneamente mais ou menos abundantes entre as condições estudadas, de maneira que o grau de associação entre elas é alto no mesmo *cluster* e baixo entre as proteínas de *clusters* diferentes, mostrado pelos valores do Membership $>0,5$. Esse comportamento co-regulatório sugere que as proteínas de tal grupo compartilham de características funcionais e, portanto, podem ser mapeadas para os mesmos processos biológicos e redes moleculares.

Em geral, os resultados obtidos mostraram que, enquanto o proteoma total dos fibroblastos é caracterizado principalmente pelos processos relacionados a tradução de proteína, no proteoma das VEs as moléculas participam da organização da matriz extracelular e dos processos de adesão célula-célula e célula-matriz e de vias de sinalização mediada por integrinas. Em especial, no conjunto de dados das VEs as proteínas estão envolvidas na modulação de processos importantes no contexto da progressão do câncer, como angiogênese e migração celular. Ao enriquecer as proteínas compartilhadas, nota-se a presença de processos relacionados a produção de glicose (Figura 5E, Apêndices 1-3).

O agrupamento hierárquico dos casos evidenciou que a posição de qualquer amostra no dendrograma é determinada pela influência da variação biológica que reflete no padrão de abundância das proteínas (Figuras 6 e 7). Entretanto, ao agrupar os pacientes de acordo com suas características clínicas e histopatológicas em comum e correlacionar essas informações com suas respectivas posições no dendrograma, foi possível constatar associações estatísticas significantes, tanto do conjunto de dados das células quanto das VEs. Essa análise evidencia que apesar do agrupamento não ter sido perfeito, ele não aconteceu ao acaso e permitiu a constatação de associações significativas com características revelantes no contexto das patologias estudadas.

Para explorar os processos biológicos refletidos pelas proteínas identificadas e quantificadas em NAFs, LAFs e CAFs, empregou-se o agrupamento do conjunto de dados de

Células e VEs na plataforma VSCluster (Schwämmle & Jensen, 2018). O agrupamento dos dados permitiu o reconhecimento de 3 padrões distintos, tanto do proteoma total quanto do proteoma das VEs (Figuras 10 e 11). Notavelmente, os padrões moleculares relacionados ao proteoma total dos fibroblastos mostram principalmente proteínas mais abundantes em NAFs, LAFs e CAFs, enquanto o agrupamento dos dados das VEs permitiu a identificação de um padrão distinto, conduzido por proteínas menos abundantes na leucoplasia oral (LAFs). A seguir, serão discutidas as principais vias biológicas enriquecidas no proteoma das células e das vesículas extracelulares.

As proteínas mais abundantes nos CAFs orais, referentes ao *Cluster-1* Cel. que simultaneamente estão menos abundantes em NAFs (Figura 10A), enriquecem principalmente vias regulatórias dependentes do citoesqueleto que controlam a migração das células, bem como a regulação dinâmica dos microtúbulos e atividades do ciclo celular. Dentre as vias associadas, se destaca principalmente o dobramento de actinas e tubulinas mediado pelas chaperoninas citosólicas TRiC/CCT e Prefoldina ($p\text{-valor}=1,11\text{E-}16$). Descobertas recentes mostraram que a biogênese eficiente de actinas e tubulinas está intimamente associada a uma maquinaria celular especializada, sendo o processo de dobramento associado a uma ampla gama de processos biológicos, incluindo o tráfego de proteínas e a regulação do ciclo celular (Gestaut et al., 2019; Kumar et al., 2004). A expressão de CCT/TRiC é regulada positivamente durante a transição de fase G1/S do ciclo celular, enquanto sua regulação negativa leva à inibição da proliferação, diminuição da viabilidade da célula, parada do ciclo celular e apoptose (Spiess et al., 2004). Corroborando com esses dados, outra via enriquecida no *Cluster-1* Cel. refere-se à transdução de sinal por Rho GTPases. A família RHO de GTPases é grande e diversa, com muitos de seus membros considerados reguladores mestres do citoesqueleto de actina, e, conseqüentemente de todos os processos que dependem da reorganização dinâmica dessa estrutura, incluindo a migração celular, adesão celular, divisão celular, estabelecimento de polaridade celular e transporte intracelular mediado por vesículas (Bustelo et al., 2007). Interessante que as vias enriquecidas do *Cluster-1* Cel. corroboram com os dados de assinatura gênica myCAF deste estudo.

O *Cluster-1* das VEs (Figura 11A) também mostrou o agrupamento de proteínas mais abundantes nos CAFs orais, entretanto, envolvidas em vias distintas do *Cluster-1* Cel. pois estão principalmente relacionadas à modulação da resposta imune, como a degranulação de neutrófilos, processamento e apresentação de antígeno mediado por MHC de Classe I,

sinalização de interferon e de citocinas e interações imunorregulatórias entre uma célula linfóide e uma célula não linfóide. Em conjunto, esses dados indicam que as proteínas secretadas nas VEs dos CAFs estão associadas a processos imunológicos no contexto do microambiente tumoral.

Na comparação entre o *cluster-2* de Cel. (Figura 10B) e o *cluster-2* VEs (Figura 11B), nota-se que, enquanto o agrupamento das proteínas nas células mostra um padrão de moléculas mais abundantes em LAFs, que estão envolvidas em vários eventos de tradução proteica, como o direcionamento co-translacional de proteínas para o retículo endoplasmático mediado pelo complexo de ribonucleoproteína, conhecido como partícula de reconhecimento de sinal – SRP e na vigilância do mRNA, o repertório proteômico das VEs apresenta um padrão de abundância oposto: as proteínas estão menos abundantes em LAFs e participam da modulação da resposta imune, queratinização, morte celular programada e organização da matriz extracelular.

No que se refere ao *cluster-2* Cel. (Figura 10B) destaca-se principalmente que as proteínas estão envolvidas no mecanismo denominado de decaimento de RNA mensageiro (mRNA) mediado por nonsense (*Nonsense-Mediated Decay*, NMD; p-valor=1,11E-16). O NMD é parte de uma rede maior de vigilância de RNA que garante que apenas mRNAs com potencial de codificação adequado se tornem disponíveis para a síntese de proteínas. Especificamente, a maquinaria NMD reconhece mRNAs com códons de terminação prematura e medeia sua degradação. Se deixados disponíveis para tradução, estes mRNAs representam uma ameaça latente para a célula, pois podem codificar proteínas truncadas, sem funções ou com funções indesejadas (Pawlicka et al., 2020). É importante enfatizar que o NMD não apenas degrada os transcritos mutados, ele também é um mecanismo de controle de qualidade que remove transcritos com *splicing* de forma aberrante, como aqueles resultantes de íntrons retidos ou éxons ignorados. Além disso, estima-se que o NMD regula ~10% do transcriptoma normal e, portanto, tem um impacto importante na expressão fisiológica do gene. Isso ocorre porque muitos transcritos têm características indutoras do NMD, mesmo na ausência de códons de terminação prematura. A regulação gênica por NMD é importante para o desenvolvimento do organismo e é particularmente crucial para a diferenciação de alguns tecidos e também para as respostas celulares ao estresse (Nickless et al., 2017). Com base nessas funções, o NMD regula vários processos biológicos e está envolvido na fisiopatologia de uma infinidade de doenças genéticas humanas, incluindo o câncer (Nogueira et al., 2021).

No *cluster-2* VEs – menos abundantes em LAFs (Figura 11B) - as proteínas estão envolvidas principalmente na modulação de eventos relacionados ao sistema imune, na queratinização e apoptose. Ao comparar esse *cluster* (Figura 11B) com o *cluster* das proteínas *upreguladas* em CAF, *cluster 1-ve* (Figura 11A), nota-se que a modulação da resposta imune, mediada pela degranulação de neutrófilos, processamento e apresentação de antígenos por moléculas de MHCI e sinalização Interferon gama, alpha e beta, são vias importantes compartilhadas entre ambos. O que muda é a condição patológica analisada. Digno de nota, o único *cluster-cel* que apresentou vias relacionadas ao sistema imune foi o *cluster-2*, que também mostra proteínas mais abundantes nos LAFs, que estão envolvidas em vias de processamento e apresentação de antígeno mediado por MHC de classe I (Figura 11 B).

É importante ressaltar que o objetivo dessa análise de agrupamento foi mostrar o perfil de regulação de vias associadas aos padrões de abundância proteica entre as condições clínicas estudadas. Para afirmar se tais vias estão mais ou menos reguladas em cada condição é necessário analisar individualmente as proteínas. Ademais, quando avaliados em conjunto, estes dados mostram que no repertório proteômico das VEs secretadas por LAFs e CAFs, as diferenças de abundância indicam que importantes mecanismos relacionados ao sistema imune estão presentes, especialmente orquestrados pelos fibroblastos do microambiente das LOs com displasia e CEC oral.

O estudo do sistema imune em lesões potencialmente malignas da cavidade oral tem sido focado principalmente na verificação de células de Langerhans, que são células dendríticas derivadas da medula óssea que residem nas camadas de células suprabasais e espinhosas do epitélio escamoso estratificado oral (Pelliccioli et al., 2017; Wang et al., 2017; Silva et al., 2020). Como sentinelas do sistema imunológico, as células dendríticas de Langerhans (CDL) atuam como apresentadoras de antígenos profissionais que captam e processam antígenos no epitélio oral e migram para a lâmina própria e posteriormente para a área paracortical do linfonodo de drenagem, local onde processam as proteínas em peptídeos antigênicos e desempenham sua função de apresentação aos linfócitos T CD4+ e CD8+. Consequentemente, os mecanismos efetores mediados por células T contra antígenos específicos, incluindo antígenos displásicos e de células cancerosas, são ativados (Wang et al., 2017). Alguns trabalhos, usando a técnica de imunohistoquímica, têm mostrado o aumento gradual no número de CDL da mucosa oral normal para displasia epitelial e, posteriormente, em CEC oral (Bondad-Palmario et al., 1995; Araújo et al., 2010; Öhman et al., 2012; Kindt et al., 2016; Wang et al., 2017). Em contrapartida,

outros trabalhos já demonstraram um declínio gradual no número de CDL durante a progressão da carcinogênese oral (Gomes et al., 2016; Upadhyay et al., 2012; Girod et al., 1994). No entanto, ainda não existem estudos sobre a modulação das respostas imunes nos DOPM, sejam orquestrados por fibroblastos, células dendríticas ou mesmo mostrando as interações entre LAFs e CAFs com os componentes do microambiente imunológico das LOs e do CEC oral.

No *Cluster 3-Cel* – mais abundantes em NAFs e simultaneamente menos abundantes em CAFs (Figura 10C) – as proteínas estão envolvidas na maioria das vias já descritas no *Cluster 2-Cel* – mais abundantes em LAFs e simultaneamente menos abundantes em NAFs e CAFs. Na verdade, as proteínas de ambos os *clusters* estão modulando vias relacionadas à vigilância da qualidade de mRNA, mas é possível notar que a diferença entre eles foi a presença de vias de *Splicing* de mRNA adicionadas ao agrupamento 3-Cel. O *splicing* de RNA, que é a remoção dos íntrons seguida pela ligação do exon, é um processo essencial que governa muitos aspectos da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Para os RNAs mensageiros, esse processo resulta numa sequência codificadora de proteína. Para RNAs transportadores (tRNAs) e ribossômicos (rRNAs), esse processo resulta na produção de moléculas funcionais para a maquinaria da tradução. A flexibilidade desse processo tem desempenhado um papel fundamental na evolução de organismos superiores, promovendo a expansão do proteoma e ajudando a regular a expressão gênica. Considerando a importância desse mecanismo na regulação gênica, alterações nesta via têm sido implicadas em muitos cânceres humanos. Estudos genômicos em grande escala descobriram um espectro de mutações na maquinaria de *splicing* que contribuem para a tumorigênese (Wang et al., 2020).

O agrupamento das proteínas do *Cluster-3 VE* – mais abundantes em LAFs (Figura 11C) – estão enriquecendo principalmente a degranulação de plaquetas. Tem sido reportado que as plaquetas contribuem para a metástase do câncer por meio da facilitação da migração de células tumorais, invasão e até mesmo fornecem proteção contra as defesas do sistema imunológico do hospedeiro. A ativação e degranulação plaquetária promove sobrevivência e sinalização pró-angiogênica em células de câncer de ovário (Egan et al., 2011). Outras vias estão enriquecidas nesse agrupamento, como por exemplo organização da MEC e a comunicação célula-célula, entretanto, merece destaque a via de sinalização JAK-STAT após estimulação com interleucina-12. A via de sinalização Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT) é uma das mais importantes vias de sinalização para transdução do sinal usadas pelas citocinas, envolvida na proliferação e sobrevivência da célula, além de desempenhar um

papel central nas respostas imunes e diferenciação celular. A família STAT contém o resíduo de tirosina próximo ao C terminal que é fosforilado pela família JAK na presença de receptores, dentre eles a família de citocinas IL-3, citocinas com receptores gp130 (IL-6, IL-11, IL-12), assim como o receptor IFN- γ . Notavelmente, existem várias citocinas com funções distintas, e às vezes opostas, que provavelmente ativam a mesma proteína STAT (Sanz-Moreno et al., 2011). Recentemente foi reportado que no adenocarcinoma ductal pancreático, a cascata de sinalização induzida por IL-1 ativa a via JAK/STAT e promove a transformação de myCAFs em CAFs inflamatórios, sugerindo plasticidade potencial entre esses dois subtipos celulares (Biffi et al., 2019).

Outra comparação interessante é que, enquanto as proteínas do *Cluster 2-ve* – menos abundantes em LAFs (fig. 11B) – modulam as principais vias de sinalização do interferon (gama, alpha e beta), as proteínas do *Cluster 3-ve* – mais abundantes em LAFs (Figura 11C) – enriquecem a via JAK-STAT e, curiosamente, os interferons (que também são considerados citocinas), sinalizam classicamente por meio da via JAK / STAT para estimular a expressão gênica. O IFN- γ , por exemplo, modula positivamente os genes envolvidos com apresentação de antígenos de classe I e II (MHC I, MHCII) através da via JAK / STAT (Schroder et al., 2004).

Entretanto, o papel da via de sinalização JAK / STAT induzida por IL-6 ou IL-12 ainda é desconhecido na progressão do CEC oral, mas esses dados reforçam o importante papel dos LAFs no microambiente das leucoplasias orais e revelaram possíveis vias biológicas associadas à malignização. Além disso, as VEs dos LAFs e CAFs parecem influenciar o recrutamento e a atividade das células imunes e facilitar a degradação e remodelação da MEC.

6.4 AS PROTEÍNAS PRIORIZADAS EM CÉLULAS E VES DOS NAF, LAF E CAF DESEMPENHAM PAPÉIS BIOLÓGICOS RELEVANTES

Apesar dos avanços em pesquisas e terapias oncológicas ao longo das décadas, não foram observadas melhorias significativas nas taxas de sobrevida dos pacientes com CEC oral em todo o mundo, o que está principalmente associado ao diagnóstico em estágios avançados (Rivera et al., 2017). Assim, esta doença ainda representa importante causa de morbidade e mortalidade, o que implica maior agressividade da doença e tratamentos mutiladores (Miller et

al., 2019). Estima-se que aproximadamente 50% dos pacientes com CEC oral sobrevivem após cinco anos do diagnóstico (Leemans et al., 2011; Rivera et al., 2015).

A leucoplasia oral é definida como uma placa branca que apresenta risco aumentado de transformação maligna, tendo excluído outras doenças conhecidas sem risco aumentado de desenvolvimento de câncer (Warnakulasuriya et al., 2007) e, normalmente, a escolha do tratamento para esta lesão depende do risco estimado de transformação maligna, que muitas vezes difere entre os serviços de saúde (Wetzel et al., 2020). Lesões de baixo risco podem ser tratadas pela cessação do hábito e acompanhamento clínico rigoroso, enquanto o tratamento para lesões de alto risco geralmente envolve métodos mais invasivos, como excisão cirúrgica ou ablação a laser (Dionne et al., 20015). No entanto, a decisão sobre observar ou tratar a LO por intervenções invasivas é um desafio na prática clínica diária e, mesmo após a excisão cirúrgica, pode haver recorrência ou transformação maligna (Lodi et al., 2008; Pletcher & Pignone, 2011). Nesse contexto, identificar e caracterizar aspectos moleculares indicativos de transformação maligna é uma estratégia valiosa para o desenvolvimento de planos de tratamento individualizados (Pletcher & Pignone, 2011; Smith et al., 2009; Zaini et al., 2018; Mello et al., 2020; Odell et al., 2021).

Entretanto, a transformação maligna das lesões com displasia epitelial permanece pouco compreendida a nível molecular. Nesse cenário, a displasia epitelial oral é o diagnóstico histopatológico que descreve o estágio potencialmente maligno, caracterizado por uma série de alterações celulares e morfológicas do tecido que são semelhantes às encontradas no CEC, entretanto, ainda restritas às células epiteliais e delimitadas pela membrana basal, portanto sem invadir o conjuntivo adjacente. A displasia deve ser reconhecida e o seu significado histológico deve ser interpretado clinicamente, baseado no conhecimento dos processos patológicos da carcinogênese oral (Tilakaratne et al., 2011; Sperandio et al., 2013; Alaizari et al., 2018; Odell et al., 2021).

Diferentes fatores estão associados um risco estatístico aumentado de alteração maligna, como por exemplo idade, sexo, localização anatômica, tamanho da lesão, grau de displasia epitelial, consumo de álcool e tabaco (Warnakulasuriya et al., 2007; Warnakulasuriya & Ariyawardana 2016). Da mesma forma que a assinatura molecular de um tumor pode diferir de acordo com o perfil clínico do indivíduo, a progressão da carcinogênese oral não é uniforme e vários fatores podem afetar a suscetibilidade de um indivíduo com LO a desenvolver o CEC

oral. É bem estabelecido na comunidade científica que a carcinogênese oral é um processo multifatorial associado a fatores de risco modificáveis – como dieta, álcool e tabaco - e não modificáveis - como por exemplo idade, sexo e predisposição genética. Embora a descoberta e validação de biomarcadores moleculares para transformação maligna dos DOPM possa ajudar a reduzir a incidência do câncer oral em todo o mundo, a influência dos fatores de risco na expressão de biomarcadores e o valor da combinação de perfis clínicos e moleculares para desenvolver modelos de risco devem ser considerados na interpretação de estudos moleculares (Sperandio et al., 2013; Speight et al., 2018; Mello et al., 2021; Odell et al., 2021).

Nesse cenário, a proteômica baseada em espectrometria de massas é uma estratégia promissora que permite identificar e quantificar proteínas em uma determinada condição biológica, seja em cultura de células, microdissecção de tecidos e análises em fluidos, e assim compreender vias de sinalização e processos biológicos regulados por essas proteínas que estejam associados a um determinado fenótipo (Carnielli et al., 2018; Sá et al., 2021; Irmisch et al., 2021). A determinação da abundância diferencial proteica de fibroblastos orais associados ao tecido controle não maligno, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral, e também das suas vesículas extracelulares, combinada com os dados clínico-patológicos dos pacientes foi a estratégia adotada por este estudo para priorização de moléculas-alvos que possam estar relacionadas à transformação maligna oral.

Para priorizar as proteínas para as próximas etapas desse estudo, foi realizada a correlação das características clínico-patológica dos casos de LO e CEC oral com as 49 proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre NAFs, LAFs e CAFs dos conjuntos de dados de células e VEs. Além disso, foram consideradas proteínas associadas com a transformação maligna aquelas que apresentaram diferenças estatísticas significantes com os fibroblastos isolados do tecido controle não maligno em relação aos LAFs e CAFs. Essa seleção foi fundamentada nos resultados de proteômica baseada em descoberta e proteínas adicionais poderão fazer parte desse painel se a abundância diferencial em relação ao controle (NAF) for confirmada por métodos direcionados, como por exemplo RT-qPCR ou proteômica dirigida baseada em alvos.

Todas as proteínas priorizadas, CAMK2D, SH3BGRL, AK1 e TNFRSF11B, já foram descritas na literatura científica por desempenhar algum papel biológico em câncer, o que confirma a robustez e reprodutibilidade da metodologia empregada neste estudo. A maioria já

foi reportada como marcador prognóstico favorável ou desfavorável em carcinomas como o urotelial (TNFRSF11B), cervical (TNFRSF11B), renal (TNFRSF11B) e gástrico (SH3BGRL; AK1), de acordo com a indicação do *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

A proteína CAMK2D é uma serina /treonina quinase pertencente à superfamília de quinase dependente de Ca^{++} que, juntamente com a proteína quinase (PKC), está envolvida em uma cascata de sinalização que regula processos envolvidos na tumorigênese, incluindo proliferação celular, migração, invasão e angiogênese (Nguyen & Shively, 2016). Neste estudo, a proteína CAMK2D mostrou aumento da abundância gradual entre NAF, LAF e CAF – cel., com diferenças estatisticamente significantes em relação ao tecido controle não maligno e mostrou correlação com os casos de CEC que apresentavam idade >60 anos. A literatura recente sugere que superexpressão dessa proteína resulta na regulação positiva de muitas cascatas de sinalização como MAPK, NF- κ B, Wnt5a e HDAC5 frequentemente correlacionadas positivamente com os carcinomas de próstata (Yamamoto et al., 2010) mama (Kennett et al., 2004), pâncreas (Trauzold et al., 2003) e pele (Jadali et al., 2010).

As proteínas SH3BGRL e AK1 foram correlacionadas com as características dos pacientes com LO, especificamente com a quantidade de cigarros consumidos por dia e com o tamanho da lesão leucoplásica, respectivamente. Ambas mostraram maior abundância estatisticamente significativa na comparação entre NAF-cel vs. CAF-cel e NAF-cel vs. LAF-cel. Nesse contexto, é amplamente reconhecido que o consumo de tabaco em todas as suas formas e o consumo crônico de álcool são os fatores etiológicos mais importantes, com atividade sinérgica e dose dependente para as LO e CEC oral (Warnakulasuriya et al., 2007; Scully, 2014; Alsahafi et al., 2019). Dentre os aspectos reconhecidos por aumentar estatisticamente o risco de progressão para malignidade das LOs, se destaca a presença de lesões com tamanhos que excedem 2cm de diâmetro (van der Waal, 2009; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016; Odell et al., 2020).

A proteína rica em ácido glutâmico de ligação ao domínio SH3 (SH3BGRL) é um membro da família SH3BGR, expressa em muitos tecidos e órgãos humanos, incluindo medula óssea, coração, pulmão, fígado e rim. Com exceção da SH3BGRL3, esta família de proteínas (que também inclui SH3BGR, SH3BGRL2 e SH3BGRL3) contém um domínio rico em prolina altamente conservado. O papel fisiopatofisiológico da família SH3BGR permanece

desconhecido, entretanto, suas funções têm sido implicados na transdução de sinal, rearranjos do citoesqueleto e tráfego de membrana (Mazzocco et al., 2002).

A família de isoenzimas da adenilato quinase (AK) pertence à maquinaria de síntese de nucleotídeos celulares, envolvida no metabolismo energético e na homeostase das proporções de nucleotídeos de adenina em diferentes compartimentos intracelulares (Klepinin et al., 2020). Os nucleotídeos, por sua vez, compõem a estrutura dos ácidos nucléicos e também são importantes no metabolismo celular, seja como fonte de energia química ou como intermediários ativados em muitas vias biossintéticas, na sinalização celular e como componentes de coenzimas (Panayiotou et al., 2014). Em geral, a localização intracelular distinta e as propriedades cinéticas das isoformas de AK favorecem o suporte energético de processos celulares específicos que variam de contração muscular, atividade elétrica, motilidade celular e energética mitocondrial/nuclear. É importante ressaltar que uma marca registrada das células cancerosas é a capacidade de religar seus circuitos bioenergéticos e de sinalização metabólica para alimentar sua proliferação e metástase descontrolada (Klepinin et al., 2020). Recentemente, uma nova estrutura de "reprogramação do metabolismo do estroma tumoral" ou "efeito Warburg reverso" foi introduzida na oncologia experimental. De acordo com esse paradigma, há acoplamento metabólico entre as mitocôndrias nas células malignas e o catabolismo nas células do estroma, que consequentemente promove o crescimento tumoral e metástase. Em outras palavras, as células cancerosas podem induzir a reprogramação do microambiente tumoral em direção ao fenótipo Warburg (Klepinin et al., 2020). Collavin e colaboradores (1999) clonaram seis novos transcritos regulados positivamente por p53 em fibroblastos murinos Val5 e relataram que um desses clones codifica uma nova forma alternativa de adenilato quinase citosólica (AK1), diferindo de AK1 por ter 18 aminoácidos extras no N-terminal. Os autores demonstraram que a nova isoforma de AK1 é regulada positivamente em células Val5 após a ativação de p53. Essas descobertas sugerem que, dentro de um programa genético dependente de p53, uma isoforma específica de adenilato quinase tem uma função reguladora de crescimento que pode não exigir necessariamente sua atividade bioquímica já bem caracterizada. Nesse contexto, é importante ressaltar o gene supressor de tumor p53 é o alvo mais frequente de alterações genéticas já identificadas no câncer humano.

Em relação as proteínas diferencialmente abundantes entre NAF-ve, LAF-ve e CAF-ve, apenas a proteína TNFRSF11B foi selecionada. O membro 11B da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFRSF11B), também conhecida como osteoprotegerina (OPG), pertence à

superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFRSF) e inicialmente foi identificada como moduladora da homeostase e turnover ósseo devido à sua capacidade de se ligar ao receptor ativador do fator nuclear kappaB (NF- κ B) (Holen et al., 2005; Holen et al., 2006). Entretanto, um número crescente de estudos considera que a proteína TNFRA11B/OPG exerça uma ação anti-apoptótica, protetora em tumores que a expressam, ao superar o mecanismo fisiológico de vigilância tumoral exercido por TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF e protagonista da vigilância imunológica tumoral). Junto com a inibição da apoptose induzida por TRAIL, a OPG pode ligar-se a vários receptores da superfície celular e, assim, ativar a sobrevivência e as vias proliferativas em células malignas (Holen et al., 2005; Holen et al., 2006; De Toni et al., 2006). Ademais, tem sido reportado que TNFRA11B também induz a angiogênese e facilita a metástase nos tumores (Malyankar et al., 2000; Scatena et al., 2002).

Um papel potencial pró-tumoral e pró-metastático da OPG tem sido estudado em um rico repertório de tumores e inclui estudos *in vitro* (mama, próstata, câncer gástrico) e *in vivo* (mama, próstata, gástrico, câncer de bexiga), bem como em dados clínicos relativos às concentrações séricas de OPG (mama, próstata, câncer de bexiga) e expressão de OPG em tecidos malignos (mama, próstata, câncer gástrico) (Holen & Shipman, 2006). Da mesma forma, a expressão de mRNA de OPG em tecidos de câncer colorretal humano foi significativamente correlacionada com o comportamento agressivo do tumor (Tsukamoto et al., 2011). Entretanto, na presente pesquisa, a proteína TNFRA11B foi significativamente mais abundante em fibroblastos controles, isolados de tecidos não malignos, com diminuição progressiva de abundância em LAF-ve e CAF-ve. Esse resultado foi coerente com as correlações clínicas constatadas, visto que a diminuição da abundância dessa proteína nos CAFs e LAFs se correlacionou com a ausência de invasão angiolinfática dos casos de CEC oral e nos casos de LO que não apresentaram variação anormal do tamanho dos núcleos das células epiteliais displásicas. Entretanto, o papel da TNFRSF11B ainda não foi investigado em fibroblastos de leucoplasias orais e CEC oral e é uma potencial candidata para estudos futuros.

Notavelmente, os resultados desse estudo indicam, por meio da análise de expressão gênica, que os LAFs e CAFs apresentam expressão diminuída do gene associado à inflamação e apresentação de antígeno, *SLPI*, em comparação com os NAFs, entretanto sem correlação com as características clínico-patológicas dos pacientes de LO e CEC oral. Em acréscimo, as proteínas AK1 (células) e TNFRSF11B (VEs), identificadas e quantificadas por LC-MS/MS, apresentam-se diferencialmente abundantes entre NAFs vs. LAFs e NAFs vs. CAFs, sendo a

abundância dessas proteínas em LAFs similares aos CAFs, e foram correlacionadas com características clínico-patológicas dos pacientes, portanto, podem ser considerados potenciais alvos associados à transição da leucoplasia oral para o carcinoma espinocelular oral.

É importante destacar que a grande maioria dos casos estudados nesta pesquisa apresentou um perfil de leucoplasia oral com característica clínica homogênea (54,5%) e com lesões de tamanho <2,0cm (63,6%), sendo este perfil descrito na literatura e visto na prática clínica em estomatopatologia como de menor possibilidade de transformação maligna. Ademais, os critérios citológicos e arquiteturais avaliados revelaram, em conjunto, que 70% dos casos mostraram um baixo risco de malignização das displasias epiteliais. Apesar disso, as estratégias empregadas neste estudo permitiram encontrar moléculas associadas às características clínico-patológicas dos pacientes que podem estar relacionadas à transformação maligna das lesões de LOs estudadas. Estes resultados reforçam claramente a importância do diagnóstico das LOs, da realização de biópsias independente do tipo clínico da lesão suspeita e sugerem a necessidade da vigilância clínica rigorosa e revisões regulares para o acompanhamento dos casos.

Finalmente, entender os processos moleculares que mediam a transformação maligna das leucoplasias orais ainda é um desafio para a ciência e esse estudo aponta um papel relevante dos LAFs e suas VEs no microambiente das leucoplasias orais com displasia, dada a sua similaridade com CAFs. Estudos adicionais serão realizados para confirmar os resultados da análise da expressão gênica e de proteômica baseada em descoberta em cortes maiores e independentes, utilizando técnicas direcionadas como RT-qPCR e proteômica dirigida a alvos em tecidos e biofluidos, bem como comparar com os bancos de dados de repositórios públicos. Além disso, estudos funcionais serão realizados para avaliar o papel das proteínas priorizadas nesse estudo na iniciação e progressão tumoral.

7 CONCLUSÃO

1. A caracterização dos fibroblastos por marcadores de fenótipo myCAF, iCAF e apCAF mostrou que os LAFs apresentam um perfil de expressão diminuída estatisticamente significativa do marcador pró-inflamatório e apresentador de antígeno *SLPI* em comparação com os NAFs. Por outro lado, os CAFs mostraram assinatura miofibroblástica, com expressão aumentada estatisticamente significativa de genes envolvidos no remodelamento do citoesqueleto de actina, motilidade e geração de força contrátil (*ACTA2*⁺); diferenciação, migração celular e formação de podossomos (*TAGLN*⁺); e cicatrização de feridas (*POSTN*⁺); além de expressão diminuída estatisticamente significativa do marcador inflamatório *CXCL12*⁻ em relação aos NAFs e do marcador *SLPI* em relação aos NAFs e LAFs.
2. O repertório proteômico dos fibroblastos foi caracterizado principalmente pelos processos relacionados à tradução de proteínas e controle da polaridade celular, enquanto no proteoma das suas VEs os processos biológicos enriquecidos foram relacionados à organização da matriz extracelular, adesão celular, migração celular e angiogênese.
3. O agrupamento do conjunto de dados usando a ferramenta VSCluster permitiu identificar perfis de abundância distintos de proteínas que estão simultaneamente mais ou menos abundantes entre as condições estudadas e esse comportamento co-regulatório mostrou que as proteínas mais ou menos reguladas em LAFs e CAFs estão envolvidas principalmente na modulação da resposta imune.
4. A proteína AK1 de células e TNFRSF11B de VEs, ambas derivadas de fibroblastos, apresentam potencial de serem consideradas marcadoras de malignização de leucoplasia oral para carcinoma espinocelular oral.

REFERÊNCIAS*

- Alaizari NA, Sperandio M, Odell EW, Peruzzo D, Al-Maweri SA. Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *J Oral Pathol Med*. 2018 Feb;47(2):97-103. doi: 10.1111/jop.12603.
- Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019 Jul 15;10(8):540. doi: 10.1038/s41419-019-1769-9.
- Alzahrani R, Obaid A, Al-Hakami H, Alshehri A, Al-Assaf H, et al. Locally Advanced Oral Cavity Cancers: What Is The Optimal Care? *Cancer Control*. 2020 Jan-Dec;27(1):1073274820920727. doi: 10.1177/1073274820920727.
- Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388.
- Araújo ALD, do Amaral-Silva GK, Pérez-de-Oliveira ME, Gallagher KPD, López de Cáceres CVB, et al. Fully digital pathology laboratory routine and remote reporting of oral and maxillofacial diagnosis during the COVID-19 pandemic: a validation study. *Virchows Arch*. 2021 Sep;479(3):585-595. doi: 10.1007/s00428-021-03075-9.
- Araújo CP, Gurgel CA, Ramos EA, Freitas VS, Barbosa Ade A Jr, Ramalho LM, dos Santos JN. Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. *J Mol Histol*. 2010 Dec;41(6):357-65. doi: 10.1007/s10735-010-9297-z.
- Arduino PG, Bagan J, El-Naggar AK, Carrozzo M. Urban legends series: oral leukoplakia. *Oral Dis*. 2013 Oct;19(7):642-59. doi: 10.1111/odi.12065.
- Armstrong PB, Armstrong MT. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 27;1470(2):O9-20. doi: 10.1016/s0304-419x(00)00003-2.
- Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*. 2000 Oct;6(10):1147-53. doi: 10.1038/80489.
- Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Mar;41(3):482-6. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.011.
- Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016 Nov;95(11):493-502. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.07.004.
- Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):628-636. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.010.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. *Oral Oncol.* 2009 Jul;45(7):e45-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.12.012.

Bagordakis E, Sawazaki-Calone I, Macedo CC, Carnielli CM, de Oliveira CE, et al. Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures. *Tumour Biol.* 2016 Jul;37(7):9045-57. doi: 10.1007/s13277-015-4629-y.

Baker ES, Liu T, Petyuk VA, Burnum-Johnson KE, Ibrahim YM, et al. Mass spectrometry for translational proteomics: progress and clinical implications. *Genome Med.* 2012 Aug 31;4(8):63. doi: 10.1186/gm364.

Barnes, L. et al. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumour. 2005; (9):163-175.

Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Virchows Arch.* 2004 Mar;444(3):231-4. doi: 10.1007/s00428-003-0965-1.

Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther.* 2018 Aug;188:1-11. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013.

Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell.* 2016 Dec 12;30(6):836-848. doi: 10.1016/j.ccell.2016.10.009.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol.* 2010 Sep;46(9):636-43. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.06.008.

Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, et al.. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2019 Feb;9(2):282-301. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0710.

Bondad-Palmario GG. Histological and immunochemical studies of oral leukoplakia: phenotype and distribution of immunocompetent cells. *J Philipp Dent Assoc.* 1995 Jun-Aug;47(1):3-18.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

Busso-Lopes, Ariane Fidelis; Rivera, César; Neves, Leandro Xavier; Granato, Daniela Campos; Patroni, Fábio Malta de Sá; Mazo, Tatiane de Rossi. et al. Wiring multiple microenvironment proteomes uncovers the biology in head and neck cancer. *bioRxiv* 2021.10.22.465341; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.22.465341>.

Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* 2007 Apr;29(4):356-70. doi: 10.1002/bies.20558. PMID: 17373658; PMCID: PMC1971132.

- Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015 Apr;47(4):320-9. doi: 10.1038/ng.3225.
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013 Jun;15(6):637-46. doi: 10.1038/ncb2756.
- Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2B):1197-205.
- Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, Granato DC, Rivera C. et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun.* 2018 Sep 5;9(1):3598. doi: 10.1038/s41467-018-05696-2.
- Carrard VC, van der Waal I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018 Jan 1;23(1):e59-e64. doi: 10.4317/medoral.22292.
- Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP, Bose P, De Carvalho DD. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun.* 2018 Nov 8;9(1):4692. doi: 10.1038/s41467-018-06654-8.
- Chan JS, Tan MJ, Sng MK, Teo Z, Phua T, Choo CC, Li L, Zhu P, Tan NS. Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2017 Jan 19;8(1):e2562. doi: 10.1038/cddis.2016.492.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12877-82. doi: 10.1073/pnas.162488599.
- Chaudhary M, Gadgail AR, Vidhale G, Mankar Gadgail MP, Gondivkar SM, Gawande M, Patil S. Comparison of myofibroblasts expression in oral squamous cell carcinoma, verrucous carcinoma, high risk epithelial dysplasia, low risk epithelial dysplasia and normal oral mucosa. *Head Neck Pathol.* 2012 Sep;6(3):305-13. doi: 10.1007/s12105-012-0335-x.
- Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 2015 Mar 5;13:45. doi: 10.1186/s12916-015-0278-7.
- Chen IH, Xue L, Hsu CC, Paez JS, Pan L, et al. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017 Mar 21;114(12):3175-3180. doi: 10.1073/pnas.1618088114.
- Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 Feb;18(2):99-115. doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
- Chen Y, Zeng C, Zhan Y, Wang H, Jiang X, Li W. Aberrant low expression of p85 α in stromal fibroblasts promotes breast cancer cell metastasis through exosome-mediated paracrine Wnt10b. *Oncogene.* 2017 Aug 17;36(33):4692-4705. doi: 10.1038/onc.2017.100.
- Chien CY, Su CY, Fang FM, Huang HY, Chuang HC, et al. Lower prevalence but favorable survival for human papillomavirus-related squamous cell carcinoma of tonsil in Taiwan. *Oral Oncol.* 2008 Feb;44(2):174-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.01.018.

- Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer*. 2007 Apr 2;6:25. doi: 10.1186/1476-4598-6-25.
- Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 2015 Jan 20;6(2):715-31. doi: 10.18632/oncotarget.2711.
- Cirillo N, Hassona Y, Celentano A, Lim KP, Manchella S, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate keratinocyte cell-cell adhesion via TGF- β -dependent pathways in genotype-specific oral cancer. *Carcinogenesis*. 2017 Jan;38(1):76-85. doi: 10.1093/carcin/bgw113.
- Collavin L, Lazarevic D, Utrera R, Marzinotto S, Monte M, Schneider C. wt p53 dependent expression of a membrane-associated isoform of adenylate kinase. *Oncogene*. 1999 Oct 21;18(43):5879-88. doi: 10.1038/sj.onc.1202970.
- Correia AL, Bissell MJ. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat*. 2012 Feb-Apr;15(1-2):39-49. doi: 10.1016/j.drug.2012.01.006.
- Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec;26(12):1367-72. doi: 10.1038/nbt.1511.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1794-805. doi: 10.1021/pr101065j.
- Cueni LN, Hegyi I, Shin JW, Albinger-Hegyi A, Gruber S, et al. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):1004-16. doi: 10.2353/ajpath.2010.090703.
- Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jan;18(1):19-32. doi: 10.1038/nrc.2017.102.
- Custódio M, Biddle A, Tavassoli M. Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2020 Nov;110:104972. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104972.
- Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb;15(2):81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166.
- Dai J, Su Y, Zhong S, Cong L, Liu B, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Aug 5;5(1):145. doi: 10.1038/s41392-020-00261-0.
- D'Arcangelo E, Wu NC, Cadavid JL, McGuigan AP. The life cycle of cancer-associated fibroblasts within the tumour stroma and its importance in disease outcome. *Br J Cancer*. 2020 Mar;122(7):931-942. doi: 10.1038/s41416-019-0705-1.
- Dawson DA. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend*. 2000 Jun 1;59(3):235-49. doi: 10.1016/s0376-8716(99)00130-1.
- Dayan D, Salo T, Salo S, Nyberg P, Nurmenniemi S, et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new

therapeutic approaches in mobile tongue cancer. *Cancer Med.* 2012 Oct;1(2):128-40. doi: 10.1002/cam4.24.

de Freitas Silva BS, Batista DCR, de Souza Roriz CF, Silva LR, Normando AGC, et al. Binary and WHO dysplasia grading systems for the prediction of malignant transformation of oral leukoplakia and erythroplakia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2021 Jul;25(7):4329-4340. doi: 10.1007/s00784-021-04008-1.

De Toni EN, Thieme SE, Herbst A, Behrens A, Stieber P, et al. OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 1;14(15):4713-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5019.

de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral Oncol.* 2013 Jun;49(6):598-603. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.02.008.

de-Assis EM, Pimenta LG, Costa-e-Silva E, Souza PE, Horta MC. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Sep 1;17(5):e733-8. doi: 10.4317/medoral.17834.

Di Credico G, Polesel J, Dal Maso L, Pauli F, Torelli N, Luce D. et al. Alcohol drinking and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration. *Br J Cancer.* 2020 Oct;123(9):1456-1463. doi: 10.1038/s41416-020-01031-z.

Ding L, Zhang Z, Shang D, Cheng J, Yuan H, et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014 May;43(5):335-43. doi: 10.1111/jop.12143.

Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *Int J Cancer.* 2015 Feb 1;136(3):503-15. doi: 10.1002/ijc.28754.

Dirven R, Ebrahimi A, Moeckelmann N, Palme CE, Gupta R, Clark J. Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer. *Oral Oncol.* 2017 Nov;74:30-33. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.09.007.

Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, Lambert DW, Coletta RD. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018 May;47(5):443-453. doi: 10.1111/jop.12623.

Dourado MR, Korvala J, Åström P, De Oliveira CE, Cervigne NK, et al. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Extracell Vesicles.* 2019 Feb 13;8(1):1578525. doi: 10.1080/20013078.2019.1578525.

Dourado RC, Porto LPA, Leitão ÁCGH, Cerqueira PSG, Dos Santos JN, et al.. Immunohistochemical Characterization of Cancer-associated Fibroblasts in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018 Oct;26(9):640-647. doi: 10.1097/PAL.0000000000000486.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular

vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*. 2011 Dec;7(6):780-8. doi: 10.1016/j.nano.2011.04.003.

Egan K, Crowley D, Smyth P, O'Toole S, Spillane C, et al. Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26125. doi: 10.1371/journal.pone.0026125.

Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov*. 2019 Aug;9(8):1102-1123. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094.

Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010 Feb 17;17(2):135-47. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041. Epub 2010 Feb 4. Erratum in: *Cancer Cell*. 2010 May 18;17(5):523. Arron, Sarah Tuttleton [added].

Etemad-Moghadam S, Khalili M, Tirgary F, Alaeddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009 Sep;38(8):639-43. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00768.x.

Feng JQ, Mi JG, Wu L, Ma LW, Shi LJ, et al. Expression of podoplanin and ABCG2 in oral erythroplakia correlate with oral cancer development. *Oral Oncol*. 2012 Sep;48(9):848-52. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.03.015.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*. 2008 May;14(5):518-27. doi: 10.1038/nm1764.

Fiori ME, Di Franco S, Villanova L, Bianca P, Stassi G, De Maria R. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer*. 2019 Mar 30;18(1):70. doi: 10.1186/s12943-019-0994-2.

Franco OE, Hayward SW. Targeting the tumor stroma as a novel therapeutic approach for prostate cancer. *Adv Pharmacol*. 2012;65:267-313. doi: 10.1016/B978-0-12-397927-8.00009-9.

French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jul;67:48-55. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.002.

Friedman, G, Levi-Galibov, O, David, E, Bornstein, C, Giladi, A, et al. Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nat. Cancer*. 2020, 1, 692–708.

Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med*. 2012 Jul;41(6):444-51. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01127.x.

Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, et al. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer*. 2015 Apr 11;15:256. doi: 10.1186/s12885-015-1272-3.

Funayama A, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Kobayashi T, et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology*. 2011;78(3):171-80. doi: 10.1159/000324926.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Dec;9(12):1392-400. doi: 10.1038/ncb1658. Epub 2007 Nov 25.

Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M. Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 1997 Sep;20(1):10-8. doi: 10.1002/(sici)1098-2744(199709)20:1<10::aid-mc3>3.0.co;2-m.

Gestaut D, Roh SH, Ma B, Pintilie G, Joachimiak LA, Leitner A, Walzthoeni T, Aebersold R, Chiu W, Frydman J. The Chaperonin TRiC/CCT Associates with Prefoldin through a Conserved Electrostatic Interface Essential for Cellular Proteostasis. *Cell*. 2019 Apr 18;177(3):751-765.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.012.

Girod SC, Kühnast T, Ulrich S, Krueger GR. Langerhans cells in epithelial tumors and benign lesions of the oropharynx. *In Vivo*. 1994 Jul-Aug;8(4):543-7.

Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun*. 2017 Oct 13;8(1):924. doi: 10.1038/s41467-017-00985-8. Erratum in: *Nat Commun*. 2018 Mar 7;9(1):1036.

Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lérida I, Lazcano JJ, Samaniego R, et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):148-63. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040.

Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016 Jul;45(6):433-9. doi: 10.1111/jop.12389.

González-Moles MÁ, Ramos-García P, Warnakulasuriya S. A Scoping Review on Gaps in the Diagnostic Criteria for Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Conceptual Proposal and Diagnostic Evidence-Based Criteria. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 21;13(15):3669. doi: 10.3390/cancers13153669.

Gupta S, Jawanda MK, Madhushankari GS. Current challenges and the diagnostic pitfalls in the grading of epithelial dysplasia in oral potentially malignant disorders: A review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2020 Oct-Dec;10(4):788-799. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.09.005.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.

Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):226-32. doi: 10.1038/nature01514.

Hanash SM. Why have protein biomarkers not reached the clinic? *Genome Med*. 2011 Oct 26;3(10):66. doi: 10.1186/gm282.

Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol*. 2014 Apr;25:69-77. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.005.

- Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019 Feb;20(2):71-88. doi: 10.1038/s41576-018-0071-5.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001 Sep;12(9):2730-41. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730.
- Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Aug;92(3):207-15. doi: 10.1007/s10549-005-2419-8.
- Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006 Mar;110(3):279-91. doi: 10.1042/CS20050175. PMID: 16464170.
- Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006 Mar;110(3):279-91. doi: 10.1042/CS20050175.
- Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011 Jun 1;71(11):3792-801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038/nature15756.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038/nature15756.
- Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, Gyan KE, Cioffi M, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell.* 2020 Aug 20;182(4):1044-1061.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Huelsken J, Hanahan D. A Subset of Cancer-Associated Fibroblasts Determines Therapy Resistance. *Cell.* 2018 Feb 8;172(4):643-644. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.028.
- Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, et al. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2017 Sep;82:115-127. doi: 10.1016/j.ejca.2017.05.026.
- IARC - Global Cancer Observatory. Lyon: IARC. [acesso 2021 Out 12]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA. [acesso 2021 Out 12]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

- Inoue H, Tsuchiya H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Ide F, Sakashita H, et al. Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer. *Tumour Biol.* 2014 Nov;35(11):11345-52. doi: 10.1007/s13277-014-2450-7.
- Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, et al. 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. doi: 10.1002/hed.26006.
- Irmisch A, Bonilla X, Chevrier S, Lehmann KV, Singer F, Toussaint NC, et al. The Tumor Profiler Study: integrated, multi-omic, functional tumor profiling for clinical decision support. *Cancer Cell.* 2021 Mar 8;39(3):288-293. doi: 10.1016/j.ccell.2021.01.004.
- Jadali A, Ghazizadeh S. Protein kinase D is implicated in the reversible commitment to differentiation in primary cultures of mouse keratinocytes. *J Biol Chem.* 2010 Jul 23;285(30):23387-97. doi: 10.1074/jbc.M110.105619.
- Jain KK. Innovations, challenges and future prospects of oncoproteomics. *Mol Oncol.* 2008 Aug;2(2):153-60. doi: 10.1016/j.molonc.2008.05.003.
- Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D498-D503. doi: 10.1093/nar/gkz1031.
- Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S, Pereira MP, Jain S, Aghi MK. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Progression. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 19;13(6):1399. doi: 10.3390/cancers13061399.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392-401. doi: 10.1038/nrc1877.
- Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):422-33. doi: 10.1038/nrc1094.
- Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1208-15. doi: 10.1172/JCI81135.
- Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, Frimannson DO, Bronsart L, et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 24;112(12):E1433-42. doi: 10.1073/pnas.1418401112.
- Karaca IR, Ozturk DN. Oral cancer: Etiology and risk factors. *J Cancer Res Ther.* 2019 Jul-Sep;15(3):739. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_375_17.
- Karunakaran K, Muniyan R. Genetic alterations and clinical dimensions of oral cancer: a review. *Mol Biol Rep.* 2020 Nov;47(11):9135-9148. doi: 10.1007/s11033-020-05927-0.
- Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene.* 2004 Nov 4;23(52):8552-6. doi: 10.1038/sj.onc.1207869.
- Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol.* 2008 Jan 20;26(3):354-60. doi: 10.1200/JCO.2007.13.4072.

Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Sep 1;123(5):1053-9. doi: 10.1002/ijc.23611.

Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2009 Oct;31(10):1346-53. doi: 10.1002/hed.21097.

Kayamori K, Katsube K, Sakamoto K, Ohyama Y, Hirai H, et al. NOTCH3 Is Induced in Cancer-Associated Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2016 Apr 28;11(4):e0154112. doi: 10.1371/journal.pone.0154112. PMID: 27124156; PMCID: PMC4849776.

Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):688-692. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.019.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology*. 2007 Dec;51(6):849-53. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02873.x.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol*. 2008 May;44(5):509-17. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.07.001.

Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR, et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015 Apr;37(4):479-86. doi: 10.1002/hed.23627.

Kennett SB, Roberts JD, Olden K. Requirement of protein kinase C micro activation and calpain-mediated proteolysis for arachidonic acid-stimulated adhesion of MDA-MB-435 human mammary carcinoma cells to collagen type IV. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3300-7. doi: 10.1074/jbc.M305734200.

Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Mar 9;9(1):63. doi: 10.1186/s13287-018-0791-7.

Khan A, Mathelier A. Intervene: a tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics*. 2017 May 31;18(1):287. doi: 10.1186/s12859-017-1708-7.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology*. 2006 Oct;119(2):254-64. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02430.x.

Kindt N, Descamps G, Seminerio I, Bellier J, Lechien JR, Pottier C, Larsimont D, Journé F, Delvenne P, Saussez S. Langerhans cell number is a strong and independent prognostic factor for head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2016 Nov;62:1-10. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.08.016.

- Klepinin A, Zhang S, Klepinina L, Rebane-Klemm E, Terzic A, et al. Adenylate Kinase and Metabolic Signaling in Cancer Cells. *Front Oncol*. 2020 May 19;10:660. doi: 10.3389/fonc.2020.00660.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 16;107(46):20009-14. doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016 Jan;18(1):13-24. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.008.
- Koumas L, King AE, Critchley HO, Kelly RW, Phipps RP. Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts. *Am J Pathol*. 2001 Sep;159(3):925-35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61768-3.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 23;113(8):E968-77. doi: 10.1073/pnas.1521230113.
- Kreppel M, Kreppel B, Drebber U, Wedemayer I, Rothamel D, Zöller JE, Scheer M. Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. *Oral Dis*. 2012 Oct;18(7):692-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01927.x.
- 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 Oncol*. 2006 Nov;42(10):987-93. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.12.014.
- Kumar TK, Yu C. Monitoring protein folding at atomic resolution. *Acc Chem Res*. 2004 Dec;37(12):929-36. doi: 10.1021/ar020156z.
- Labernadie A, Kato T, Brugués A, Serra-Picamal X, Derzsi S, et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. 2017 Mar;19(3):224-237. doi: 10.1038/ncb3478.
- Lee SU, Moon SH, Choi SW, Cho KH, Park JY, et al. Prognostic significance of smoking and alcohol history in young age oral cavity cancer. *Oral Dis*. 2020 Oct;26(7):1440-1448. doi: 10.1111/odi.13432.
- Lee TH, Chennakrishnaiah S, Meehan B, Montermini L, Garnier D, D'Asti E, Hou W, Magnus N, Gayden T, Jabado N, Eppert K, Majewska L, Rak J. Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras. *Oncotarget*. 2016 Aug 9;7(32):51991-52002. doi: 10.18632/oncotarget.10627.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan;11(1):9-22. doi: 10.1038/nrc2982.
- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 May;18(5):269-282. doi: 10.1038/nrc.2018.11.
- Lex A, Gehlenborg N, Strobel H, Vuilleumot R, Pfister H. UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Trans Vis Comput Graph*. 2014 Dec;20(12):1983-92. doi: 10.1109/TVCG.2014.2346248.

- Li H, Zhang J, Chen SW, Liu LL, Li L, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. *J Transl Med*. 2015 Jun 21;13:198. doi: 10.1186/s12967-015-0551-8.
- Li J, Chen L, Qin Z. Multifaceted tumor stromal fibroblasts. *Cancer Microenviron*. 2012 Dec;5(3):187-93. doi: 10.1007/s12307-012-0109-8. Epub 2012 May 25.
- Li K, Pang J, Cheng H, Liu WP, Di JM, et al. Manipulation of prostate cancer metastasis by locus-specific modification of the CRMP4 promoter region using chimeric TALE DNA methyltransferase and demethylase. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):10030-44. doi: 10.18632/oncotarget.3192.
- Li W, Zhang X, Wang J, Li M, Cao C, et al. TGF β 1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(56):96035-96047. doi: 10.18632/oncotarget.21635.
- Liu L, Liu L, Yao HH, Zhu ZQ, Ning ZL, Huang Q. Stromal Myofibroblasts Are Associated with Poor Prognosis in Solid Cancers: A Meta-Analysis of Published Studies. *PLoS One*. 2016 Jul 26;11(7):e0159947. doi: 10.1371/journal.pone.0159947.
- Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2019 Aug 28;12(1):86. doi: 10.1186/s13045-019-0770-1.
- Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med*. 2008 Feb;37(2):63-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00575.x.
- Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*. 2012 Dec 21;151(7):1542-56. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024.
- Luksic I, Sutton P, Manojlovic S, Virag M, Petroveckii M, Macan D. Significance of myofibroblast appearance in squamous cell carcinoma of the oral cavity on the occurrence of occult regional metastases, distant metastases, and survival. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;44(9):1075-80. doi: 10.1016/j.ijom.2015.05.009.
- Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):122-137. doi: 10.3322/caac.21389.
- Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Interacellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*. 2017 Mar;27(3):172-188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003.
- MacCarthy-Morrogh L, Martin P. The hallmarks of cancer are also the hallmarks of wound healing. *Sci Signal*. 2020 Sep 8;13(648):eaay8690. doi: 10.1126/scisignal.aay8690.
- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, et al. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):20959-62. doi: 10.1074/jbc.C000290200.
- Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer*. 2021 Oct 11;20(1):131. doi: 10.1186/s12943-021-01428-1.

- Marchiano EJ, Mathis NJ, Bellile EL, Lobo R, Ibrahim M, et al. Impact of extrinsic tongue muscle invasion on stage migration in AJCC 8th edition staging of oral cavity carcinoma. *Oral Oncol*. 2020 Nov;110:104888. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104888.
- Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol*. 2011 Mar;223(4):470-81. doi: 10.1002/path.2830.
- Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):899-910. doi: 10.1002/ijc.20656.
- Marx V. Targeted proteomics. *Nat Methods*. 2013 Jan;10(1):19-22. doi: 10.1038/nmeth.2285.
- Matsuoka Y, Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, et al. The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *APMIS*. 2015 Mar;123(3):205-14. doi: 10.1111/apm.12344.
- Maymone MBC, Greer RO, Kasecker J, Sahitya PC, Burdine LK, et al. Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jul;81(1):59-71. doi: 10.1016/j.jaad.2018.09.060.
- Mazzocco M, Maffei M, Egeo A, Vergano A, Arrigo P, Di Lisi R, Ghiotto F, Scartezzini P. The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich (SH3BGR) gene establishes a new family of highly conserved small proteins related to Thioredoxin Superfamily. *Gene*. 2002 May 29;291(1-2):233-9. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00602-9.
- McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):666-71. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.005
- 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. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102986.
- 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*. 2018 Aug;47(7):633-640. doi: 10.1111/jop.12726.
- Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene*. 2018 Jan 30;641:105-110. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.015.
- Mezawa Y, Orimo A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):675-89. doi: 10.1007/s00441-016-2471-1.
- Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Sep;69(5):363-385. doi: 10.3322/caac.21565.
- Mischak H. How to get proteomics to the clinic? Issues in clinical proteomics, exemplified by CE-MS. *Proteomics Clin Appl*. 2012 Oct;6(9-10):437-42. doi: 10.1002/prca.201200027.

- Monteiro L, Mello FW, Warnakulasuriya S. Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: A systematic review. *Oral Dis*. 2021 Nov;27(8):1977-1992. doi: 10.1111/odi.13747.
- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):839-49. doi: 10.1038/nrc1477.
- Müller S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol*. 2017 Mar;11(1):33-40. doi: 10.1007/s12105-017-0792-3.
- Nankivell P, Williams H, Matthews P, Suortamo S, Snead D, et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Jan;115(1):87-94. doi: 10.1016/j.oooo.2012.10.015.
- Nguyen T, Shively JE. Induction of Lumen Formation in a Three-dimensional Model of Mammary Morphogenesis by Transcriptional Regulator ID4: Role of CAMK2D in the epigenetic regulation of id4 gene expression. *J Biol Chem*. 2016 Aug 5;291(32):16766-76. doi: 10.1074/jbc.M115.710160.
- Nickless, A., Bailis, JM & You, Z. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci* 7, 26 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0153-7>.
- Nielsen SR, Quaranta V, Linford A, Emeagi P, Rainer C, et al. Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol*. 2016 May;18(5):549-60. doi: 10.1038/ncb3340. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2016 Jun 28;18(7):822.
- Ning X, Zhang H, Wang C, Song X. Exosomes Released by Gastric Cancer Cells Induce Transition of Pericytes Into Cancer-Associated Fibroblasts. *Med Sci Monit*. 2018 Apr 18;24:2350-2359. doi: 10.12659/msm.906641.
- Nogueira G, Fernandes R, García-Moreno JF, Romão L. Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Mol Cancer*. 2021 Apr 29;20(1):72. doi: 10.1186/s12943-021-01364-0.
- Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT, Ribeiro DA. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012 Sep-Oct;9(5):329-35.
- Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer*. 2020 Feb 15;146(4):895-905. doi: 10.1002/ijc.32193.
- Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*. 2021 Nov;27(8):1947-1976. doi: 10.1111/odi.13993.
- Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1503-23. doi: 10.1084/jem.20140692.
- Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017 Mar 6;214(3):579-596. doi: 10.1084/jem.20162024.

- Öhman J, Magnusson B, Telemo E, Jontell M, Hasséus B. Langerhans cells and T cells sense cell dysplasia in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas--evidence for immunosurveillance. *Scand J Immunol.* 2012 Jul;76(1):39-48. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02701.x.
- Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle.* 2006 Aug;5(15):1597-601. doi: 10.4161/cc.5.15.3112.
- Paluskievicz CM, Cao X, Abdi R, Zheng P, Liu Y, Bromberg JS. T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019 Oct 15;10:2453. doi: 10.3389/fimmu.2019.02453.
- Panayiotou C, Solaroli N, Karlsson A. The many isoforms of human adenylate kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Apr;49:75-83. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.014.
- Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* 2005 Mar;26(3):150-6. doi: 10.1016/j.it.2004.11.014.
- Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlan R, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D516-D519. doi: 10.1093/nar/gky1029.
- Pawlicka K, Kalathiya U, Alfaro J. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Pathologies and the Potential for Novel Therapeutics. *Cancers (Basel).* 2020 Mar 24;12(3):765. doi: 10.3390/cancers12030765.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: *Nat Med.* 2016 Dec 6;22(12):1502.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: *Nat Med.* 2016 Dec 6;22(12):1502.
- Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol.* 2011 Apr;21(2):139-46. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.01.002.
- Pelliccioli ACA, Bingle L, Farthing P, Lopes MA, Martins MD, Vargas PA. Immunosurveillance profile of oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia through dendritic and T-cell analysis. *J Oral Pathol Med.* 2017 Nov;46(10):928-933. doi: 10.1111/jop.12597.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014 Dec;15(12):1243-53. doi: 10.15252/embr.201439246.
- Pletcher MJ, Pignone M. Evaluating the clinical utility of a biomarker: a review of methods for estimating health impact. *Circulation.* 2011 Mar 15;123(10):1116-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943860.

- Principe S, Hui AB, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013 May;13(10-11):1608-23. doi: 10.1002/pmic.201200533.
- Pula B, Jethon A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Owczarek T, et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*. 2011 Dec;59(6):1249-60. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04060.x.
- Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1611-1624.e24. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.044.
- Ramos-García P, González-Moles MÁ, Mello FW, Bagan JV, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2021 Nov;27(8):1896-1907. doi: 10.1111/odi.13831.
- Rana S, Malinowska K, Zöller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*. 2013 Mar;15(3):281-95. doi: 10.1593/neo.122010.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871; PMCID: PMC3575529.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1896-906. doi: 10.1038/nprot.2007.261.
- Reibel J, Gale N, Hille J, et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. *WHO Classification of Tumours of the Head and Neck*. 4. ed. Lyon, France: IARC Press; 2017. p.112–5.
- Reibel J, Gale N, Hille J, Hunt JL, Lingen M, Muller S, et al. Tumours of the oral cavity and mobile tongue. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. editors. *WHO classification of head and neck tumours*, 4th ed. Lyon: IARC press; 2017. p. 112–114.
- Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol*. 2017 Sep;72:38-47. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.003.
- Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep 1;8(9):11884-94.
- Rockey DC, Weymouth N, Shi Z. Smooth muscle α actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One*. 2013 Oct 29;8(10):e77166. doi: 10.1371/journal.pone.0077166.
- Rodrigues PC, DA Costa Miguel MC, DE Aquino SN, Fonseca FP, Silva AR, Leme AF, Coletta RD. Stromal myofibroblasts in potentially malignant and malignant lesions of the oral cavity. *Oncol Lett*. 2015 Feb;9(2):667-670. doi: 10.3892/ol.2014.2763.
- Sá JO, Trino LD, Oliveira AK, Lopes AFB, Granato DC, Normando AGC, Santos ES, Neves LX, Carnielli CM, Paes Leme AF. Proteomic approaches to assist in diagnosis and prognosis of oral cancer. *Expert Rev Proteomics*. 2021 Apr;18(4):261-284. doi: 10.1080/14789450.2021.1924685.

- Saalbach A, Haustein UF, Anderegg U. A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2000 Nov;115(5):882-8. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00104.x.
- Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020 Mar;20(3):174-186. doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
- Sandulache VC, Michikawa C, Kataria P, Gleber-Netto FO, Bell D, et al. High-Risk TP53 Mutations Are Associated with Extranodal Extension in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018 Apr 1;24(7):1727-1733. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0721.
- Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell*. 2011 Aug 16;20(2):229-45. doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.018.
- Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 16;19(8):2413. doi: 10.3390/ijms19082413.
- Scatena M, Giachelli C. The $\alpha(v)\beta3$ integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002 Feb;12(2):83-8. doi: 10.1016/s1050-1738(01)00151-7.
- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003 Jul 15;22(14):3546-56. doi: 10.1093/emboj/cdg342.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163-89. doi: 10.1189/jlb.0603252.
- Schwämmle V, Jensen ON. VSClust: feature-based variance-sensitive clustering of omics data. *Bioinformatics*. 2018 Sep 1;34(17):2965-2972. doi: 10.1093/bioinformatics/bty224.
- Scully C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Dis*. 2014 Jan;20(1):1-5. doi: 10.1111/odi.12208.
- Sebastian A, Hum NR, Martin KA, Gilmore SF, Peran I, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Tumor-Derived Fibroblasts and Normal Tissue-Resident Fibroblasts Reveals Fibroblast Heterogeneity in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 May 21;12(5):1307. doi: 10.3390/cancers12051307.
- Seifi S, Shafaei S, Shafigh E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(2):359-64.
- Sekiguchi R, Yamada KM. Basement Membranes in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol*. 2018;130:143-191. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.005.
- Shaban M, Khurram SA, Fraz MM, Alsubaie N, Masood I, et al. A Novel Digital Score for Abundance of Tumour Infiltrating Lymphocytes Predicts Disease Free Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep*. 2019 Sep 16;9(1):13341. doi: 10.1038/s41598-019-49710-z.

- Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*. 2018 Feb 28;118(4):1917-1950. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00534.
- Shelke GV, Yin Y, Jang SC, Lässer C, Wennmalm S, et al. Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1. *J Extracell Vesicles*. 2019 Sep 20;8(1):1650458. doi: 10.1080/20013078.2019.1650458.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-60. doi: 10.1038/nprot.2006.468.
- Shi P, Liu W, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Podoplanin and ABCG2: malignant transformation risk markers for oral lichen planus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Mar;19(3):844-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0699.
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec 11;7(4):2443-58. doi: 10.3390/cancers7040902.
- Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol Cancer*. 2013 Dec 20;12(1):168. doi: 10.1186/1476-4598-12-168.
- Shoucair I, Weber Mello F, Jabalee J, Maleki S, Garnis C. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Extracellular Vesicles in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 17;21(18):6837. doi: 10.3390/ijms21186837.
- Silva LC, Fonseca FP, Almeida OP, Mariz BA, Lopes MA, Radhakrishnan R, Sharma M, Kowalski LP, Vargas PA. CD1a+ and CD207+ cells are reduced in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Jan 1;25(1):e49-e55. doi: 10.4317/medoral.23177.
- Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, et al. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*. 2001 Aug;128(16):3117-31.
- Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol*. 2009 Aug;45(8):647-53. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.02.006.
- Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*. 2011 Sep;47(9):840-6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.011.
- Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52(Pt 2):228-240. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.008.
- Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010 Oct;10(10):712-23. doi: 10.1038/nri2852.
- Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):612-627. doi: 10.1016/j.oooo.2017.12.011.

Sperandio M, Brown AL, Lock C, Morgan PR, Coupland VH, et al. 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. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0001.

Spiess C, Meyer AS, Reissmann S, Frydman J. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol*. 2004 Nov;14(11):598-604. doi: 10.1016/j.tcb.2004.09.015.

Storey, J. D., Taylor, J. E. & Siegmund, D. Strong control, conservative point estimation and simultaneous conservative consistency of false discovery rates: a unified approach. *Journal of the Royal Statistical Society B* 66, 187–205 (2004).

Sun Q, Zhang B, Hu Q, Qin Y, Xu W, et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*. 2018 Oct 6;8(18):5072-5087. doi: 10.7150/thno.26546.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*. 2017 May 29;18(6):1153. doi: 10.3390/ijms18061153.

Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M, Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Nov;64(11):1407-17. doi: 10.1007/s00262-015-1742-0.

Takahashi H, Sakakura K, Kudo T, Toyoda M, Kaira K, et al. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8633-8647. doi: 10.18632/oncotarget.14374.

Tan HT, Lee YH, Chung MC. Cancer proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2012 Sep-Oct;31(5):583-605. doi: 10.1002/mas.20356.

Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:603740. doi: 10.1155/2011/603740.

Théry C., Witwer K. W., Aikawa E., Alcaraz M. J., Anderson J. D., Andriantsitohaina R., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Tilakaratne WM, Sherriff M, Morgan PR, Odell EW. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med*. 2011 Aug;40(7):533-40. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01033.x.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 May;3(5):349-63. doi: 10.1038/nrm809.

- Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, Wermann H, Westphal S, et al. PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene*. 2003 Dec 4;22(55):8939-47. doi: 10.1038/sj.onc.1207001.
- Tschumperlin DJ. Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiology (Bethesda)*. 2013 Nov;28(6):380-90. doi: 10.1152/physiol.00024.2013.
- Tsukamoto S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Mogushi K, Mizushima H et al (2011) Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 17:2444–4450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2884>
- Tsukamoto S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Mogushi K, Mizushima H, Uetake H, Tanaka H, Sugihara K. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2444-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2884.
- Ueshima E, Fujimori M, Kodama H, Felsen D, Chen J, et al. Macrophage-secreted TGF- β 1 contributes to fibroblast activation and ureteral stricture after ablation injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 Jul 1;317(7):F52-F64. doi: 10.1152/ajprenal.00260.2018.
- Upadhyay J, Rao NN, Upadhyay RB. A comparative analysis of langerhans cell in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma using antibody CD-1a. *J Cancer Res Ther*. 2012 Oct-Dec;8(4):591-7. doi: 10.4103/0973-1482.106565.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.
- van der Waal I, Axéll T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol*. 2002 Sep;38(6):521-6. doi: 10.1016/s1368-8375(01)00125-7.
- van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Jan 1;18(1):e33-7. doi: 10.4317/medoral.18486.
- 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. doi: 10.4317/medoral.20205.
- van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):317-23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr;19(4):213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. *Cancer Microenviron*. 2009 Dec;2(1):49-57. doi: 10.1007/s12307-009-0020-0.
- Vered M, Dobriyan A, Dayan D, Yahalom R, Talmi YP, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci*. 2010 Jan;101(1):274-80. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01357.x.

- Virgone A, Badreh S. The 4P: Preventing Preneoplasia through Patients Partnership. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 31;13(17):4408. doi: 10.3390/cancers13174408.
- Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):453-65. doi: 10.1007/s00441-016-2426-6.
- Wang E, Aifantis I. RNA Splicing and Cancer. *Trends Cancer*. 2020 Aug;6(8):631-644. doi: 10.1016/j.trecan.2020.04.011.
- Wang YP, Chen IC, Wu YH, Wu YC, Chen HM, et al. Langerhans cell counts in oral epithelial dysplasia and their correlation to clinicopathological parameters. *J Formos Med Assoc*. 2017 Jun;116(6):457-463. doi: 10.1016/j.jfma.2017.02.006.
- Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016 Mar;45(3):155-66. doi: 10.1111/jop.12339.
- Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):575-80. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x.
- Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, et al. 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. doi: 10.1111/odi.13704.
- Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*. 2010 Dec 1;70(23):9621-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
- Wen CP, Levy DT, Cheng TY, Hsu CC, Tsai SP. Smoking behaviour in Taiwan, 2001. *Tob Control*. 2005 Jun;14 Suppl 1(Suppl 1):i51-5. doi: 10.1136/tc.2004.008011.
- Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dent Clin North Am*. 2020 Jan;64(1):25-37. doi: 10.1016/j.cden.2019.08.004.
- Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006 Apr;9(4):261-72. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.010.
- Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol*. 2018 Apr 30;9:738. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738.
- Wu CC, Chu HW, Hsu CW, Chang KP, Liu HP. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. *Proteomics*. 2015 Oct;15(19):3394-404. doi: 10.1002/pmic.201500157.
- Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene*. 2010 Apr 8;29(14):2036-46. doi: 10.1038/onc.2009.496.
- Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, et al. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology*. 2009;77(1):53-62. doi: 10.1159/000226112.

- 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. doi: 10.1007/s00405-020-06036-1.
- Yang F, Ning Z, Ma L, Liu W, Shao C, et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer*. 2017 Aug 29;16(1):148. doi: 10.1186/s12943-017-0718-4.
- Yang SW, Lee YS, Wu PW, Chang LC, Hwang CC. A Retrospective Cohort Study of Oral Leukoplakia in Female Patients-Analysis of Risk Factors Related to Treatment Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Aug 6;18(16):8319. doi: 10.3390/ijerph18168319.
- Yang X, Li Y, Zou L, Zhu Z. Role of Exosomes in Crosstalk Between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *Front Oncol*. 2019 May 3;9:356. doi: 10.3389/fonc.2019.00356.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun 18;13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yeon JH, Jeong HE, Seo H, Cho S, Kim K, Na D, Chung S, Park J, Choi N, Kang JY. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomater*. 2018 Aug;76:146-153. doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.001.
- Yu Y, Xiao CH, Tan LD, Wang QS, Li XQ, Feng YM. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br J Cancer*. 2014 Feb 4;110(3):724-32. doi: 10.1038/bjc.2013.768.
- Zaini ZM, McParland H, Møller H, Husband K, Odell EW. Predicting malignant progression in clinically high-risk lesions by DNA ploidy analysis and dysplasia grading. *Sci Rep*. 2018 Oct 26;8(1):15874. doi: 10.1038/s41598-018-34165-5.
- Zhang G, Guo ZL, Gao Y. [Podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia and its correlation with lymph vessels density]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009 Aug;44(8):488-91. Chinese.
- Zhang L, Poh CF, Williams M, Laronde DM, Berean K, et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Sep;5(9):1081-9. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0173.
- Ziani L, Chouaib S, Thiery J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front Immunol*. 2018 Mar 1;9:414. doi: 10.3389/fimmu.2018.00414.

**APÊNDICE 1 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas células (Top 15).
Análise realizada no DAVID, v6.8. aplicando o teste estatístico Benjamini e Hochberg, FDR ≤0,05.**

(continua)

Processo Biológico - Análise do Proteoma das Células	Count	%	p-valor	Genes	Benjamini	FDR
GO:0006413-translational initiation	89	7,355371901	1,53E-67	EIF4A2, EIF4A1, RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, RPL10A, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, RPS14, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, RPL22, RPS6, RPS3A, RPSA, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, PABPC1, RPL29, RPL28, EIF1B, RPL10, RPL12, RPL11, RPL36A, RPS15A, EIF4H, RPS3, RPL14, RPS2, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, EIF4B, RPL19, RPL23A, EIF2S1, EIF1, RPS26, RPS25, RPS28, EIF2S3, EIF5, EIF3L, RPS29, RPL27A, EIF3I, EIF3J, EIF3H, EIF3E, RPS20, FAU, EIF3F, ABCE1, EIF3C, RPS21, EIF3D, EIF4G2, RPS24, EIF3A, EIF4G1, RPS23, EIF3B	5,74E-64	5,60E-64
GO:0006614-SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	73	6,033057851	2,86E-64	RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, RPL10A, SRP14, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, RPS14, SEC61A1, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, RPL22, RPS6, SSR3, RPS3A, RPSA, SRP9, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, RPL29, RPL28, RPL10, RPL12, RPL11, RPL36A, RPS15A, SRP72, RPS3, RPL14, RPS2, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, RPL19, RPL23A, SRP68, RPS26, RPS25, RPS28, RPS29, RPL27A, SRPRB, RPS20, FAU, RPS21, RPS24, RPS23	5,38E-61	5,25E-61
GO:0000184-nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	75	6,198347107	2,31E-55	RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, EIF4A3, PPP2R2A, RPL10A, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, RPS14, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, RPL22, RPS6, RPS3A, RPSA, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, PABPC1, RPL29, RPL28, RBM8A, RPL10, RPL12, RPL11, RPL36A, GSPT1, PPP2CA, RPS15A, RPS3, RPL14, RPS2, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, RPL19, RPL23A, RPS26, RPS25, RPS28, RPS29, RPL27A, EIF3E, RPS20, FAU, RPS21, RPS24, EIF4G1, RPS23	2,90E-52	2,83E-52
GO:0098609-cell-cell adhesion	107	8,842975207	1,75E-52	TES, RPL34, HDLBP, PARK7, BZW1, PCMT1, PPME1, RUVBL1, BSG, TRIM25, TMPO, CAST, SWAP70, TMOD3, SND1, RPL24, CHMP4B, RPL29, DDX6, MACF1, TWF2, TWF1, PPL, NDRG1, RTN4, CORO1B, CNN3, CNN2, SNX1, HIST1H3A, SNX2, CALD1, BAG3, PCBP1, PACSIN2, HIFX, SFN, VASP, HSPA8, PAICS, VASN, RPS26, HNRNPK, EIF2S3, EIF5, EIF4G2, PICALM, EIF4G1, YWHAE, DDX3X, YWHAB, OLA1, CLINT1, SEPT9, RPL7A, LASP1, ATIC, SEPT7, CAPZB, RARS, TNKS1BP1, SPTAN1, EMD, NUDC, DBNL, RANGAP1, YWHAZ, EEF1G, PKM, CTTN, EEF1D, PLIN3, MAPRE1, RAB1A, USO1, CAPG, ADD1, FAM129B, LIMA1, PUF60, EIF4H, RPL14, FLNB, EPS8L2, RPS2, RPL15, PDLIM5, EPS15, PAK2, NOP56, RANBP1, STAT1, RPL23A, KTN1, RAB10, TJP1, RSL1D1, KRT18, VAPA, VAPB, GLOD4, ABI1, SERBP1, EIF3E, ESYT2, RAN, TJP2	1,65E-49	1,61E-49

**APÊNDICE 1 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas células (Top 15).
Análise realizada no DAVID, v6.8. aplicando o teste estatístico Benjamini e Hochberg, FDR ≤0,05.**

(continuação)

Processo Biológico - Análise do Proteoma das Células	Count	%	p-valor	Genes	Benjamini	FDR
GO:0019083~viral transcription	68	5,619834711	1,33E-48	RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, RPL10A, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, RPS14, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, RPL22, RPS6, RPS3A, RPSA, NUP93, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, RPL29, RPL28, RPL10, RPL12, RPL11, RPL36A, RPS15A, TPR, RPS3, RPL14, RPS2, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, RPL19, RPL23A, RPS26, RPS25, RPS28, RPS29, RPL27A, RPS20, FAU, RPS21, RPS24, RPS23	1,00E-45	9,79E-46
GO:0006412~translation	83	6,859504132	9,55E-34	SLC25A1, RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, RPL10A, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, RPS14, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, PABPC4, RPL22, RPS6, SARS, RPS3A, RPSA, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, RPL29, SLC25A5, RPL28, SLC25A4, SLC25A11, SLC25A6, RPL10, MRPS36, RPL12, RPL11, RPL36A, TARS, RPS27L, RRBPI, EGFR, RPS15A, RPS3, RPL14, RPS2, HARS, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, SLC25A24, RPL19, RPL23A, RPS26, RSL1D1, RPS25, RPS28, RPS29, RPL27A, RPS20, RPL22L1, FAU, RPS21, RPS24, EIF4G1, RPS23	5,99E-31	5,84E-31
GO:0006364~rRNA processing	74	6,115702479	8,80E-32	RPL5, RPL30, RPL32, RPL31, RPL34, RPLP1, EIF4A3, RPL10A, RPL8, RPL9, RPL7, RPS4X, RPS15, FBL, RPS14, RPL7A, RPS16, RPS19, RPL18A, RPS18, RPL36, RPLP2, RPL35, RPL38, RPS11, RPS10, RPS13, RPS12, RPS9, RPL21, RPS7, RPS8, RPL23, RPS5, RPL22, RPS6, RPS3A, RPSA, EBNA1BP2, RPL37A, RPL24, RPL27, RPL26, RPL29, RPL28, RPL10, RPL12, RPL11, RPL36A, DDX21, RPS27L, RPS15A, RPS3, RPL14, RPS2, RPL15, RPS27A, RPL18, RPL17, RPL19, NOP56, RPL23A, PA2G4, NPM3, RPS26, RPS25, RPS28, RPS29, RPL27A, RPS20, FAU, RPS21, RPS24, RPS23	4,73E-29	4,61E-29
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	63	5,20661157	5,96E-22	EIF4A3, HNRNPU, HNRNPR, YBX1, PRPF19, ELAVL1, PTBP1, SYNCRIP, SNRPD2, SNRPD1, DHX15, SNRPD3, SRRM2, SNRPN, HNRNPUL1, DDX39B, PSPC1, HNRNPH1, SRSF2, SNRPG, SRSF3, SNRPE, HNRNPH2, PABPC1, HNRNPH3, SRSF6, SNRPC, SNRNP200, SRSF7, SF1, SF3B5, SF3B2, DDX5, SF3B3, RBM8A, DHX9, SRRT, SRSF1, PRPF8, U2AF1L4, PABPN1, FIPIL1, U2AF2, TRA2B, PCBP1, PCBP2, RALY, HNRNPA1, SF3B1, HNRNPA0, HSPA8, SF3A1, PPIL1, HNRNPA3, FUS, ALYREF, NONO, HNRNPL, PHF5A, HNRNPK, HNRNPD, HNRNPC, RBMX	2,80E-19	2,73E-19

**APÊNDICE 1 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas células (Top 15).
Análise realizada no DAVID, v6.8. aplicando o teste estatístico Benjamini e Hochberg, FDR ≤0,05.**

(conclusão)

Processo Biológico - Análise do Proteoma das Células	Count	%	p-valor	Genes	Benjamini	FDR
GO:0043488~regulation of mRNA stability	42	3,47107438	2,66E-21	SET, PSMD11, PSMD14, ANP32A, PSMD13, YWHAB, ELAVL1, PSMA7, PSMD9, PSMD6, PSMB4, XPO1, PSMD4, PSMD5, PSMD2, KHSRP, PSMD3, PSMD1, TNPO1, RPS27A, HSPA8, YTHDF2, YWHAZ, PSMA5, PSMA6, PSMC5, PSMA3, PSMC6, PSMA4, PSMC4, PSMA2, PSMC1, APEX1, PSME3, PSMC2, SERBP1, PSME1, HNRNP, PSME2, PABPC1, HSPA1B, EIF4G1	1,11E-18	1,09E-18
GO:0002479~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	30	2,479338843	1,54E-17	PSMD11, PSMD14, PSMD13, PSMA7, PSMD9, PSMD6, PSMB4, PSMD4, PSMD5, PSMD2, PSMD3, PSMD1, ITGAV, HLA-H, HLA-B, HLA-C, HLA-A, PSMA5, PSMA6, PSMC5, PSMA3, PSMC6, PSMA4, PSMC4, PSMA2, PSMC1, PSME3, PSMC2, PSME1, PSME2	5,78E-15	5,64E-15
GO:0006521~regulation of cellular amino acid metabolic process	26	2,148760331	4,00E-16	PSMD11, PSMD14, PSMD13, PSMA7, PSMD9, PSMD6, PSMB4, PSMD4, PSMD5, PSMD2, PSMD3, PSMD1, NQO1, PSMA5, PSMA6, PSMC5, PSMA3, PSMC6, PSMA4, PSMC4, PSMA2, PSMC1, PSME3, PSMC2, PSME1, PSME2	1,37E-13	1,34E-13
GO:0060071~Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	34	2,809917355	8,90E-16	PSMD11, PSMD14, PSMD13, CLTC, AP2A1, AP2A2, PSMA7, CDC42, PSMD9, PSMD6, PSMB4, PSMD4, PSMD5, PSMD2, PSMD3, PSMD1, RAC1, RPS27A, AP2M1, AP2B1, RHOA, PSMA5, PSMA6, PSMC5, PSMA3, PSMC6, PSMA4, PSMC4, PSMA2, PSMC1, PSME3, PSMC2, PSME1, PSME2	2,79E-13	2,72E-13
GO:0006457~protein folding	48	3,966942149	1,21E-15	FKBP11, FKBP10, LRPAP1, FKBP2, LMAN1, GRPEL1, BAG2, BAG3, RUVBL2, MLEC, CCT7, CCT5, CCT4, TXNDC5, HSPA9, HSPA8, NUDC, HSP90AA1, PPIL1, CSNK2A1, VBP1, TXNL1, CSNK2A2, MOGS, TBCA, HSPE1, PDIA6, PDIA4, FKBP1A, ERP44, TMX4, TMX3, TMX1, CDC37, GNB2, GNB1, DNAJA2, ERP29, FKBP8, PFDN1, PFDN2, FKBP9, FKBP4, PFDN5, PFDN6, PPID, AARS, PPIC	3,50E-13	3,41E-13
GO:0038061~NIK/NF-kappaB signaling	27	2,231404959	7,60E-14	PSMD11, PSMD14, PSMD13, PSMA7, PSMD9, PSMD6, PSMB4, PSMD4, PSMD5, PSMD2, PSMD3, PSMD1, RPS27A, SKP1, PSMA5, PSMA6, PSMC5, PSMA3, PSMC6, PSMA4, PSMC4, PSMA2, PSMC1, PSME3, PSMC2, PSME1, PSME2	2,04E-11	1,99E-11
GO:0006446~regulation of translational initiation	20	1,652892562	2,65E-13	EIF4A2, EIF4A1, DDX1, EIF1, EIF5, EIF3L, EIF3I, EIF3J, EIF4H, EIF3H, EIF3E, EIF3F, EIF3C, EIF1B, EIF3D, EIF3A, EIF4B, EIF4G2, EIF3B, EIF4G1	6,65E-11	6,48E-11

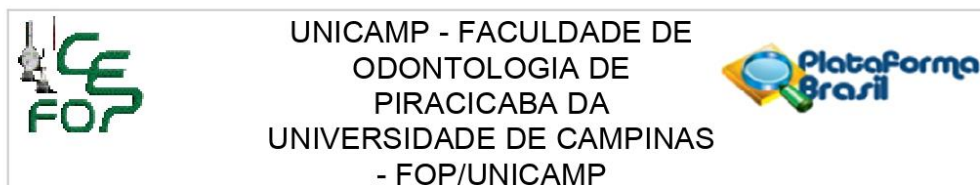
**APÊNDICE 2 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas identificadas e quantificadas nas VEs (Top 15).
Análise realizada no DAVID, v6.8. aplicando o teste estatístico Benjamini e Hochberg, FDR ≤0,05.**

Processo Biológico - Análise do Proteoma das VEs	Count	%	p-valor	Genes	Benjamini	FDR
GO:0030198~extracellular matrix organization	42	9,150326797	1,04E-25	COL18A1, ITGB5, ITGB4, LAMA4, ELN, LAMA3, SERPINE1, TNC, FBLN1, TNFRSF11B, NID1, F11R, NID2, HAPLN1, ACAN, ABI3BP, BSG, ITGAV, ITGB6, ITGA4, LAMB2, ITGA3, ITGA2, ITGA1, FN1, BGN, LAMB1, VCAN, CCDC80, COL4A2, COL5A2, ITGA11, PXDN, COL6A3, COL8A1, ITGA7, ITGA6, CD47, TGFB1, AGRN, CD44, DDR2	2,48E-22	2,44E-22
GO:0007155~cell adhesion	60	13,07189542	7,24E-25	LGALS3BP, COL18A1, SRPX, ITGB5, ITGB4, CTNND1, TNC, F11R, HAPLN1, LOXL2, ALCAM, CDH2, ITGAV, ITGB6, EDIL3, ITGA4, ITGA3, ITGA2, CASK, ATP1B1, AZGP1, VCAN, ADAM17, COL6A3, COL8A1, PKP1, ITGA7, ITGA6, CD47, MFGE8, CD44, VCL, DSC3, DDR2, ENG, COL15A1, CD151, TNXB, LAMA4, LAMA3, THBS2, NID2, ACAN, PODXL, CTNNA1, NCAM1, CTNNA2, CD99, CDSN, LAMB2, FN1, LAMB1, PARVB, FERMT1, CXCL12, FAP, PTK7, ITGA11, ZYX, TGFB1	8,67E-22	8,50E-22
GO:0098609~cell-cell adhesion	31	6,753812636	2,10E-11	RAB1A, DDX3X, F11R, NDRG1, PPL, ADD1, RTN4, FAM129B, CNN2, SDCBP, ATIC, CALD1, RARS, MYO6, BSG, FLNB, EPS8L2, SFN, YKT6, SPTAN1, STAT1, RDX, PAICS, PLCB3, GPRC5A, EHD4, EEFD1, GIPC1, PI4KA, PLIN3, EPHA2	1,68E-08	1,65E-08
GO:0007160~cell-matrix adhesion	17	3,703703704	1,16E-09	CD63, ITGB5, ITGA4, ITGB4, ITGA3, ITGA2, ITGA1, NID1, NID2, ITGA11, ZYX, ITGA7, ITGAV, ITGA6, ITGB6, CD44, VCL	6,94E-07	6,81E-07
GO:0002576~platelet degranulation	17	3,703703704	8,91E-09	SRGN, LGALS3BP, CD63, ECM1, AHSG, ACTN1, SERPINE1, FN1, APOA1, CLU, LAMP2, TIMP3, FLNA, QSOX1, A2M, HRG, VCL	4,27E-06	4,18E-06
GO:0035987~endodermal cell differentiation	10	2,178649237	1,50E-08	COL4A2, ITGA4, ITGB5, MMP2, LAMA3, FN1, COL8A1, ITGA7, ITGAV, LAMB1	5,66E-06	5,55E-06
GO:0050900~leukocyte migration	18	3,921568627	1,65E-08	SLC16A1, ITGA4, MMP1, SRC, ITGA3, FN1, ATP1B3, F11R, ATP1B1, SLC7A5, PODXL, BSG, ITGAV, ITGA6, CD47, APOB, SLC16A3, CD44	5,66E-06	5,55E-06
GO:0007229~integrin-mediated signaling pathway	16	3,48583878	3,68E-08	ITGB5, ITGA4, ITGB4, SRC, ITGA3, ITGA2, ITGA1, APOA1, FBLN1, ITGA11, ZYX, ITGA7, ITGAV, ITGA6, CD47, ITGB6	1,10E-05	1,08E-05
GO:0022617~extracellular matrix disassembly	14	3,050108932	6,86E-08	MMP1, ELN, MMP2, LAMA3, HTRA1, FN1, NID1, ACAN, CAPNS1, BSG, FLOT1, A2M, CD44, ENG	1,82E-05	1,79E-05
GO:0030203~glycosaminoglycan metabolic process	9	1,960784314	5,06E-07	VCAN, SDC4, GPC1, SDC2, BGN, SDC1, CSPG4, AGRN, GPC6	1,21E-04	1,19E-04
GO:0036258~multivesicular body assembly	9	1,960784314	8,89E-07	TSG101, VTA1, VPS4A, MVB12A, VPS37B, STAM, CHMP6, STAM2, VPS28	1,93E-04	1,90E-04
GO:0001525~angiogenesis	21	4,575163399	1,50E-06	COL18A1, NRPI, ECM1, COL15A1, PDGFR, MMP2, SERPINE1, FN1, MAPK14, TYMP, FMNL3, MYDGF, COL4A2, FAP, COL8A1, ITGAV, CSPG4, TGFB1, HRG, MFGE8, S100A7	2,99E-04	2,93E-04
GO:0006914~autophagy	16	3,48583878	1,86E-06	RAB1A, SRPX, TSG101, ITGB4, VTA1, VPS4A, VPS37B, STAM, TMEM59, EVA1A, TOLLIP, MVB12A, ANXA7, CHMP6, STAM2, VPS28	3,42E-04	3,36E-04
GO:0016477~cell migration	18	3,921568627	2,47E-06	RAB1A, CD63, ARF4, CD151, SDC4, SDC2, FMNL3, CDH2, PODXL, PALLD, PTK7, SDC1, CD248, ITGAV, CSPG4, GPC6, ENG, EPHA2	4,22E-04	4,14E-04
GO:0010951~negative regulation of endopeptidase activity	15	3,267973856	3,02E-06	SERPINB3, SERPINB4, CSTA, SERPINB12, SERPINE2, AHSG, SERPINC1, SERPINF1, SERPINE1, SERPINB6, C5, CD109, COL6A3, A2M, HRG	4,81E-04	4,72E-04

**APÊNDICE 3 – Processos biológicos enriquecidos estatisticamente significantes referentes às proteínas compartilhadas entre células e VEs (Top 15).
Análise realizada no DAVID, v6.8. aplicando o teste estatístico Benjamini e Hochberg, FDR ≤0,05.**

Processo Biológico - Análise das Proteínas Compartilhadas entre Cel. e VEs	Count	%	p-valor	Genes	Benjamini	FDR
GO:0098609~cell-cell adhesion	39	13,73239437	2,12E-24	LRRC59, HSP90AB1, AHNK, ARHGAP1, TACSTD2, SLC3A2, ENO1, IQGAP1, EVPL, RPL6, PDLIM1, PSMB6, SDCBP, LDHA, KIF5B, PRDX1, SNX9, CCT8, S100A11, SPTBN1, SH3GL1, HSPA5, ANXA2, IDH1, EEF2, PRDX6, SEPT2, EHD1, MYO1B, PKM, FASN, CAPZA1, FSCN1, TAGLN2, PFN1, ALDOA, DBN1, PFKP, PLEC	3,70E-21	3,59E-21
GO:0061621~canonical glycolysis	9	3,169014085	6,33E-09	GPI, PKM, PGAM1, PGK1, ENO1, ALDOA, GAPDH, PFKP, HK1	4,99E-06	4,85E-06
GO:0006457~protein folding	18	6,338028169	8,57E-09	CCT3, PDIA3, CCT2, HSP90AB2P, HSP90AB1, ST13, PRKCSH, TXN, HSP90B1, GNAI2, CCT6A, GANAB, TCP1, CANX, CCT8, CALR, CRYAB, PPIA	4,99E-06	4,85E-06
GO:0050821~protein stabilization	15	5,281690141	6,13E-08	CCT3, CCT2, CRTAP, HSP90AB1, PHB2, HSPD1, CCT6A, LAMP1, TCP1, FLNA, CCT8, CALR, PFN1, PPIB, GAPDH	2,68E-05	2,60E-05
GO:0006094~gluconeogenesis	9	3,169014085	5,54E-07	GPI, GOT1, MDH2, PGAM1, PGK1, ENO1, ALDOA, GAPDH, PCK2	1,94E-04	1,88E-04
GO:0030198~extracellular matrix organization	16	5,633802817	1,01E-06	ITGB1, POSTN, LAMC1, HSPG2, THBS1, SERPINB5, ICAM1, COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL6A2, COL6A1, ITGA8, EMILIN1, ITGA5, RECK	2,60E-04	2,52E-04
GO:0030574~collagen catabolic process	10	3,521126761	1,05E-06	COL1A1, MRC2, COL3A1, MMP14, COL1A2, CTSK, COL6A2, COL12A1, COL6A1, CTSB	2,60E-04	2,52E-04
GO:0006096~glycolytic process	8	2,816901408	1,19E-06	GPI, LDHA, PGAM1, PGK1, ENO1, ALDOA, GAPDH, HK1	2,60E-04	2,52E-04
GO:0018149~peptide cross-linking	9	3,169014085	1,54E-06	COL3A1, ANXA1, F13A1, THBS1, EVPL, IVL, SPRR1B, TGM2, SPRR2D	2,78E-04	2,70E-04
GO:0006928~movement of cell or subcellular component	11	3,873239437	1,59E-06	TPM4, ARPC2, TPM3, CAPZA1, CD9, HSPB1, MSN, VIM, TXN, TLN1, SERPINB5	2,78E-04	2,70E-04
GO:0042542~response to hydrogen peroxide	9	3,169014085	1,80E-06	PDGFRB, COL1A1, LDHA, CAT, ADAM9, EEF2, CRYAB, HSPD1, SOD1	2,86E-04	2,78E-04
GO:0000302~response to reactive oxygen species	8	2,816901408	3,16E-06	PRDX2, GSTP1, PRDX1, CAT, P4HB, TXN, PRDX6, SOD1	4,61E-04	4,48E-04
GO:1904871~positive regulation of protein localization to Cajal body	5	1,76056338	4,95E-06	CCT3, CCT6A, CCT2, TCP1, CCT8	6,66E-04	6,47E-04
GO:0001666~response to hypoxia	14	4,929577465	6,16E-06	POSTN, CAV1, PLOD1, ACTN4, THBS1, HSPD1, HSP90B1, PDLIM1, MMP14, LDHA, PKM, CAT, CAPN2, CRYAB	7,69E-04	7,47E-04
GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	8	2,816901408	1,33E-05	PSMB6, PSMB5, PSMA1, HSPA5, CTSK, PSMB1, CAPN2, CTSB	1,55E-03	1,51E-03

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito de vesículas extracelulares de câncer oral na diferenciação de macrófagos

Pesquisador: Ana Karina de Oliveira

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 51762415.5.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.056.198

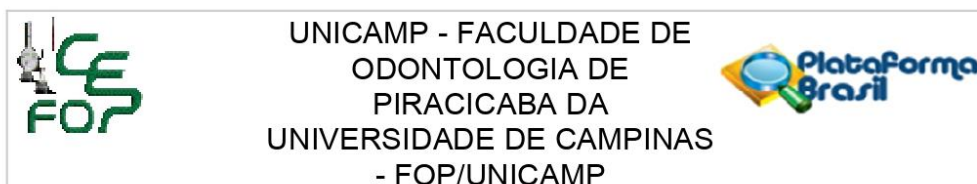
Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E2) AO PROTOCOLO originalmente aprovado em 08/08/2016, emendado (E1) em 12/05/2017, para inclusão de novo pesquisador e extensão do cronograma. O parecer foi atualizado de acordo com a documentação apresentada. A solicitação está detalhadamente descrita ao final do parecer.

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui ANA KARINA DE OLIVEIRA (Graduada em Biomedicina, Bolsista PNPd/CAPES no Laboratório Nacional de Biociências LNBio/CNPq, Pesquisadora responsável), ADRIANA FRANCO PAES LEME (Cirurgiã Dentista, Coordenadora do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências – CNPq, Supervisora), CAROLINA MORETTO CARNIELLI (Graduada em Biologia, Pesquisadora de Pós-Doutorado junto ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências – CNPq), JAMILE DE OLIVEIRA SA (Cirurgiã Dentista, Doutoranda no PPG em Estomatopatologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), o que é confirmado na declaração dos

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



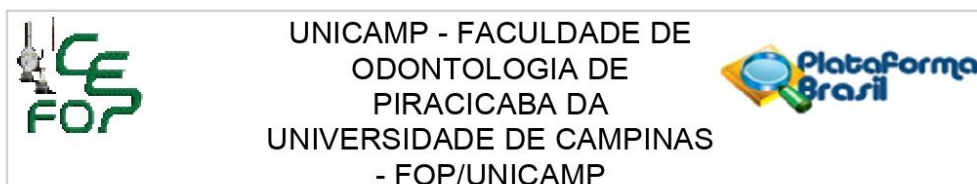
Continuação do Parecer: 5.056.198

pesquisadores e na PB.

DELINEAMENTO DA PESQUISA: Trata-se de estudo laboratorial, a partir de amostras de sangue de um banco de sangue e de material de biópsias de lesões bucais do banco de material biológico da área de Patologia da FOP que envolverá material de 110 indivíduos com idade entre 40 e 60 anos, sem distinção de sexo, distribuídos nos seguintes grupos, todos com n=22: Pacientes com carcinoma espinocelular oral (CEC), Pacientes hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), Pacientes com leucoplasia convencional (LC), Pacientes com eritroplasia (ER) e Pacientes com hiperplasia fibrosa (HF). **Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o papel de vesículas extracelulares, na diferenciação e na modulação da atividade de macrófagos e no desenvolvimento tumoral. Além disso, pretendemos avaliar o papel dos diferentes subtipos de macrófagos e de suas VEs derivadas na progressão tumoral, assim como avaliar o papel de VEs derivadas de fibroblastos/CAFs. **Metodologia:** Os macrófagos que serão utilizados neste estudo serão obtidos a partir de células mononucleares isoladas de camaras de leucorredução doadas pela COLSAN. Os monócitos isolados serão diferenciados/polarizados em macrófagos M0, M1 e M2 após cultura com fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. Os macrófagos associados a tumores (TAM) serão diferenciados com vesículas extracelulares derivadas de linhagens de células, ou de derivadas dos lavados de biópsias de pacientes com diferentes patologias: (hiperplasia fibrosa (HF), hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), lesões potencialmente malignas – leucoplasia convencional (LC) e eritroplasia (ER) - e carcinoma espinocelular oral (CEC). As peças de biópsias serão cedidas pelo Biobanco de Patologia Celular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, e também serão mantidas em cultura de células para obtenção de fibroblastos/CAFs. As vesículas extracelulares (VEs) provenientes de linhagens celulares, de cultura primária de fibroblastos/CAFs e de lavado de peça tumoral serão caracterizadas quanto ao número, tamanho e forma utilizando o equipamento Nanosight, microscopia eletrônica de transmissão e western blot para reconhecimento de marcadores específicos de membrana. Funcionalmente as VEs serão avaliadas quanto a capacidade de modular e alterar o fenótipo de macrófagos, que serão avaliados pela presença ou ausência de marcadores específicos de membrana, aumento de citocinas inflamatórias, capacidade fagocitária e ativação de linfócitos. Além disso, também as vesículas dos macrófagos diferenciados in vitro nos subtipos M0, M1, M2 e TAM, serão avaliadas quanto ao seu conteúdo proteico e capacidade de transferir informações a células adjacentes. **Local:** Todos os ensaios serão realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio/CNPEM. As coletas

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

das biopsias serão realizadas na Clínica Orocentro/FOP/Unicamp, em um prazo de 24 meses. Resultados esperados: Utilizando abordagens proteômicas pretendemos identificar proteínas envolvidas na modulação/comunicação intercelular, assim como, o papel de proteínas de VEs envolvidas na diferenciação de macrófagos, contribuindo na elucidação dos mecanismos moleculares do desenvolvimento do câncer oral.

METODOLOGIA PROPOSTA:

Local: Todos os ensaios serão realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio/CNPq, com exceção da coleta de sangue que será realizada no Hemocentro da Unicamp e a coleta de Biopsia tumoral que será realizada na Clínica Orocentro/FOP/Unicamp, em um prazo de 24 meses.

Obtenção de monócitos a partir de câmaras de leucorredução: Os monócitos serão obtidos do expurgo de bolsas de sangue coletadas na Associação Beneficente de Coleta de Sangue - COLSAN, no qual os doadores voluntários assinam no momento do atendimento o Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE) cujo conteúdo, de acordo com a legislação brasileira, prevê a possibilidade de uso de produtos da doação excedentes para produção de reagentes, medicamentos ou pesquisa (modelo do TCLE em anexo). Todo o material biológico (série vermelha e branca do sangue, assim como o plasma e debris) que não for utilizado nos ensaios, será descartado de acordo com a Resolução Nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005.

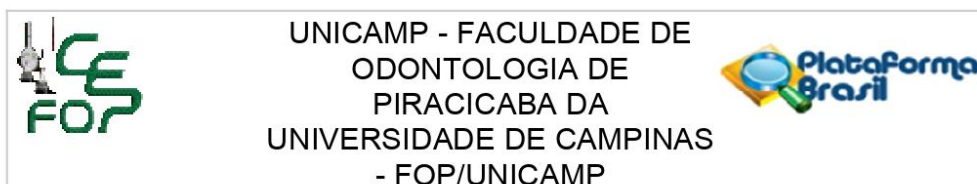
Obtenção de peças de biopsias de pacientes com diferentes patologias: As peças de biopsias de pacientes com diferentes patologias serão fornecidas pela Clínica Orocentro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, no qual os doadores voluntários já autorizaram seu uso via TCLE da Instituição (modelo do TCLE em anexo) no ato do procedimento, sem que isso lhe traga algum prejuízo durante o tratamento

Serão coletas biopsias de pacientes com as seguintes patologias: hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), como controle de lesão inflamatória livre de neoplasias; leucoplasia convencional (LC) e eritroplasia (ER), lesões potencialmente malignas importantes no estudo da progressão tumoral; hiperplasia fibrose (HF), como controle de lesão oral livre de inflamação e neoplasia; carcinoma espinocelular oral (CEC)

Calculo do número de amostras para estudo: Para esta nova proposta serão necessários 22

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

pacientes para cada caso clínico (patologia), isto é, 22 amostras de HF, 22 de LC, 22 de ER, 22 HFI e 22 de CEC. Este N foi definido pelo seguinte cálculo de amostragem:

O tamanho da amostra para este estudo, nas análises de modulação de macrófagos e nas análises proteômicas, foi determinado usando uma hipótese unilateral considerando $\alpha = 0,05$ e $1 - \beta = 0,8$, que representam as escolhas comuns para significância e poder de análise. O efeito do tamanho (alterações na abundância de proteínas) foi definido pelo $\log_2(2)$ para proteínas com variância biológica não superior a 70 %. Considerando cinco grupos (hiperplasia inflamatória, hiperplasia fibrosa, leucoplasia, eritroplasia e carcinoma epidermóide oral) e 1 repetição técnica. Assim, o tamanho de amostra necessário foi calculado de acordo com a equação:

$$= 5 [2 +] 2 (2) = 21,648 \text{ 22 pacientes por diagnóstico}$$

n = número de pacientes $Z/2 = 1.645$ $Z = 0.842$ = efeito do tamanho, 2 fold change no nível de expressão, $\log_2(2) = 1$. $2p$ = variação biológica, 0.7 m = replicata técnica, 1

Crêterios de inclusão: Peças de biopsia provenientes de pacientes, homens e mulheres, com diagnóstico de hiperplasia fibrosa (HF), hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), lesões potencialmente malignas – leucoplasia convencional (LC) e eritroplasia (ER) - e carcinoma espinocelular oral (CEC), entre 40-60 anos, que são as idades de maior prevalência de câncer oral. As câmaras de leucorredução serão usadas como fonte (insumo) de células mononucleares, não serão estudadas características individuais ou de grupo. Mesmo com o acesso aos prontuários, não se fará a divulgação do nome ou de dados pessoais dos pacientes na publicação dos resultados ou na apresentação de trabalhos referentes a pesquisa.

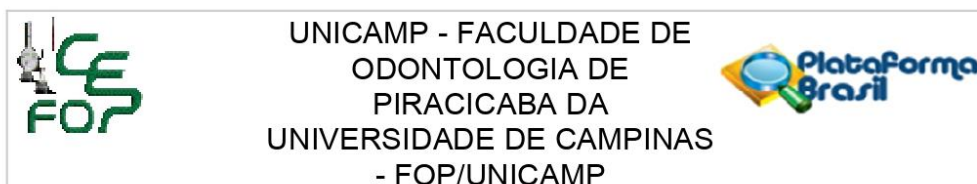
Crêterios de exclusão: Crianças e adolescentes, população de rua e pessoas com sofrimento mental.

Pendência 1 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores caracterizaram os indivíduos envolvidos na pesquisa quanto a (a) número envolvidos, 40; (b) quanto à faixa etária, de 40 a 60 anos e (c) quanto à distribuição por sexo, que será casual.

Obtenção de fibroblastos/CAFs a partir de peças de biopsias: Os fragmentos de HF, HFI, LPM (LC e ER) e CEC serão lavados com solução com de PBS na presença de antibióticos e antifúngico (estreptomina, penicilina e anfotericina B) para remoção do excesso de sangue, e em seguida as peças serão mantidas em meio DMEM (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) por 18 h a temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante será removido e congelado para obtenção de VES, e os fragmentos de biopsias serão lavados 2x com meio DMEM com antibióticos

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

e antifúngico, suplementado com 10% de soro de vitelo, cortados em fragmentos de ~1mm e colocados enfileirados em garrafas de cultura de células de 25 cm² contendo 1 ml do mesmo meio. As culturas serão mantidas em estufa a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ para obtenção e cultivo de fibroblastos/CAFs. Caracterização de Fibroblastos:

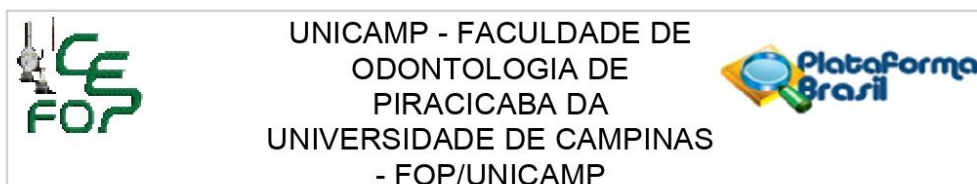
Imunofluorescência: Para os ensaios de imunofluorescência as células (fibroblastos/CAFs) serão previamente fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Para permeabilização as células serão incubadas em solução de PBS 1x contendo Triton X-100 0,2 % por 5 minutos. Após este período as células serão incubadas em solução de bloqueio e permeabilização (PBS 1x contendo BSA 1%, Triton X-100 0,1%, glicina 50 mM e 10% de soro de vitelo) por 1 hora em câmara úmida. Após este período as células serão incubadas com o anticorpo primário anticorpos (anti-SMA ou anti-vimentina ou anti-pan-citoqueratina ou antiCD34, Dako Co. Carpinteria, CA, EUA) por 2 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida as células serão incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 568 (Thermo) por 2 horas em câmara úmida e escura a temperatura ambiente. Para marcação do núcleo e do citoplasma serão utilizados 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Cell tracker Green CMFDA (Thermo). As imagens serão adquiridas utilizando o equipamento Operetta High Content Imaging System (PerkinElmer).

Western blot: A presença das proteínas anti-SMA ou anti-vimentina ou anti-pan-citoqueratina ou anti-CD34, serão verificadas por ensaio de western blot. Extratos de fibroblastos/CAFs serão submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), que será bloqueada em 1% de BSA durante 2 h a temperatura ambiente, seguido pela incubação com o anticorpo primário por 2h e com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1h a temperatura ambiente. A detecção das proteínas será obtida por quimioluminescência utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences, NJ, EUA).

Diferenciação in vitro de macrófagos derivados de monócitos utilizando citocinas: Células mononucleares serão isoladas do expurgo de bolsas de sangue cedidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp. Para a obtenção de monócitos o produto da aférese será submetido a separação com Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) por 30 min, a 900 g a 18°C. Células mononucleares serão coletadas e centrifugadas a 600 g por 10 min a 18 °C em meio Roswell Park Memorial Institute - RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 a 300 g e 200 g, respectivamente. As células

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

mononucleares serão então ressuspensas em meio R10 (RPMI + 10% de soro fetal bovino) suplementado com 1% de Antibiotic-Antimycotic (Gibco, Grand Island, NY, EUA), plaqueadas em placa de 6 poços ($1,8 \times 10^7$ cels/mL de suspensão) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ atmosférico por 2h. Após este período células não aderentes serão removidas e o meio celular será suplementado para polarização em M1 ou M2 ou TAM:

Macrófagos do tipo TAM: Para obtenção de macrófagos do tipo TAM células mononucleares aderidas a placas de 6 poços serão incubadas por 7 dias ou com VES derivadas das linhagens celulares HaCaT, SCC9 e HSC-3 ou com as VEs derivadas de biopsias de HF, HFI, ER, LC e CEC.

Macrófagos diferenciados em M1 e M2: Para diferenciação em macrófago do tipo M1 células mononucleares serão incubadas com 50 ng/mL de fator estimulante de colônias de monócitos e granulócitos – (GM-CSF) por 7 dias, sendo que no 5º dia o meio será suplementado com 20 ng/ml de IFN-gama. Para polarização em M2 o meio será suplementado com 50 ng/mL de fator estimulante de colônias de macrófago (M-CSF) por 7 dias, com adição no 5º dia de 20 ng/ml da citocina IL-4. Será usado como controle monócitos não diferenciados, isto é, incubado somente em meio RPMI-1640. Todas as citocinas que serão utilizadas são oriundas da PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA.

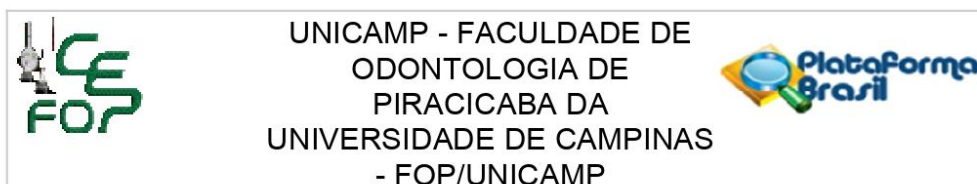
Avaliação do fenótipo dos macrófagos diferenciados: Após este período as células serão avaliadas quanto ao seu perfil fenotípico por citometria de fluxo para identificação dos marcadores de superfície CD14, CD64, CD163, CD80 e CD86, o aumento de citocinas inflamatórias no sobrenadante será monitorado por ensaio de ELISA para detecção de TNF-alfa e IL-10. Serão também avaliadas a capacidade fagocitária dos macrófagos diferenciados e a capacidade de ativação de linfócitos.

Isolamento de vesículas extracelulares: As linhagens celulares HaCaT, SCC-9 e HSC-3 serão cultivadas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos. As células serão mantidas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO₂.

O isolamento de VEs será realizado segundo método descrito por Gallo et al, 2012 e Xiao & Wong, 2012. O sobrenadante resultante do cultivo celular e do lavado de peças de biopsias serão centrifugados em etapas consecutivas: 4.000 g por 10 min, 10.000 g por 30 min e ultracentrifugação final de 100.000 g por 90 min. Todas as etapas de centrifugação serão realizadas a 4°C. VEs isoladas serão mantidas a -80°C em PBS para análises de microscopia e Nano Tracking Analysis (NTA) e para os ensaios de diferenciação de macrófagos. Uma alíquota das VEs

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

isoladas serão ressuspensas em tampão ureia (50mM Tris HCl pH 7.5, 8M ureia, 2M thiourea, 1mM DTT) seguida de sonicação por 5 min, a temperatura ambiente para extração proteica. A quantificação proteica será determinada utilizando o método de Bradford (1976) (Bio-Rad, São Paulo, Brasil).

Western blot: A presença de flotilina-1, um marcador VEs, será verificada por ensaio de western blot. Extratos de VEs isoladas serão submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), que será bloqueada em 1% de BSA durante 2 h a temperatura ambiente, seguido pela incubação com o anticorpo primário anti-flotilina-1 (1: 5000) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 2h e com o anticorpo secundário antiIgG de coelho (1:2000) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A detecção das proteínas será obtida por quimiluminescência utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences, NJ, EUA).

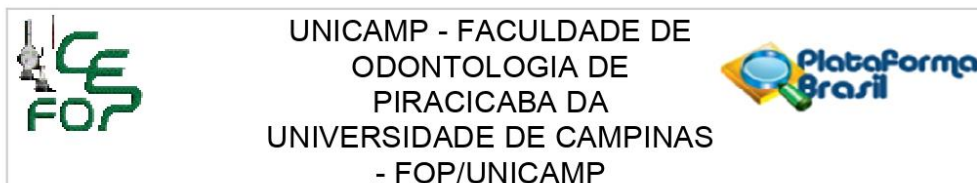
Nano particle tracking analysis (NTA): O tamanho e a concentração das VEs serão determinados com o auxílio do NanoSight NS300 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido), equipado com uma câmara de amostra contendo um laser verde de 532 nm. As medidas serão determinadas baseadas no movimento Browniano das partículas individuais e de dispersão de luz, à temperatura ambiente em PBS e durante 60 s com ajustes de ganho da câmara suficiente para focar as VEs. O software NTA 2.3 Build 0013 será usado para captura de dados e análises.

Microscopia eletrônica de transmissão: 1 x 10E8 partículas mL⁻¹ de VEs isoladas serão ressuspensas em PBS e adsorvidas por 25 s a 15 mA sobre um filme de carbono ultrafino com várias perfurações e revestido de cobre. A coloração negativa será realizada com 2% de acetato de uranila aquoso. As VEs serão fotografadas usando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-3010 equipado com um filamento de tungstênio e operado a uma voltagem de aceleração de 300kV. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Nanotecnologia do CNPEM.

Análise de proteínas de VEs por espectrometria de massas: 2 µg de proteínas de extratos de VEs serão reduzidas, alquiladas, digeridas com tripsina e dessalinizadas de acordo com métodos já descritos na literatura (Rappsilber et al, 2003; Villen & Gygi, 2008). Os peptídeos tripsínicos resultantes serão secos em Speed vac e analisados por LC-MS/MS em sistema nanoProxiom/LTQ Orbitrap Velos ETD mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Os peptídeos serão separados por um gradiente de acetonitrila de 2-30 % em 0,1 % de ácido fórmico usando uma coluna analítica PicoFrit Column (20 cm x 75 µm e 5 µm de tamanho de partícula - New objective) em fluxo de 300 nL/min durante 40 min. A voltagem e a temperatura da fonte de

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



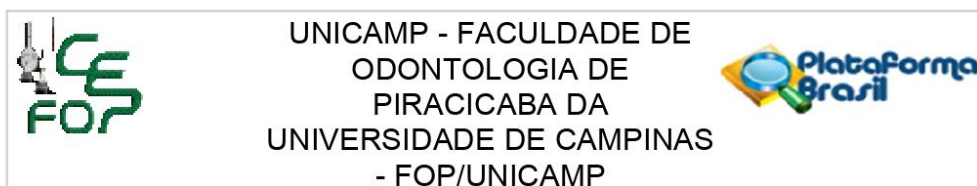
Continuação do Parecer: 5.056.198

ionização serão ajustadas para 2,2 kV e 275 °C, respectivamente, e o espectrômetro será operado no modo Data Dependent Acquisition (DDA), no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 1600 é realizada com resolução de 60.000 no modo FTMS, após acumulação de um target value de $1e6$, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 20 íons mais intensos com carga 2 e target value de 5.000. O espectrômetro será ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 60 segundos, lista de exclusão de 500 e tempo de ativação de 10 ms.

Análise de dados: Os dados brutos (Raw files) referentes às análises de MS/MS serão analisados utilizando o software MaxQuant, v.1.3.0.5 (Cox e Mann, 2008; Cox et al. 2009) que utiliza como ferramenta de busca o algoritmo Andromeda v.1.3.0.5 (Cox et al., 2011) utilizando o banco de dados Uniprot Human Protein Database. Os parâmetros de busca serão definidos com no máximo duas clivagens perdidas pela tripsina, tolerância de erro para MS de 6 ppm e de 0.5 Da para MS/MS; serão consideradas como modificações variáveis a oxidação de resíduos de metionina (+16 Da) e acetilação do Nterminal (+42 Da) e modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteínas (+57 Da). A quantificação de proteínas será realizada utilizando o algoritmo implementado no MaxQuant (versão 1.5.3.17) descrito como Label-free quantification (LFQ) assumindo uma janela de tempo de correspondência entre as corridas de 2 min e 1 % de falsos positivos (False Discovery Rate – FDR) para peptídeos e proteínas (Cox & Mann, 2008; Lubner et al, 2010). A análise estatística dos dados será realizada utilizando o software Perseus v.1.5.2.6. Anotações funcionais de proteínas identificadas serão realizadas através do IPA (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). Quantificação de citocinas por ELISA: Placas de ELISA (Costar) serão sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato pH 9,5 (IL-10 e VEGF-A) ou tampão fosfato pH 6,5 (TNF-alfa e CXCL9), incubadas por 18 horas à 4 °C e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS+5% gelatina, por 90 minutos. Após este período, as placas serão lavadas 4 vezes com PBST e, em seguida, adicionados 100 µL/poço de PBST + 0,1% de BSA nas duas primeiras fileiras, onde será diluído, na razão de 1:2 os padrões das citocinas e quimiocina recombinantes, assim como o VEGF-A. Nas fileiras seguintes, as amostras (sobrenadante da cultura de macrófagos) serão distribuídas e diluídas. As placas serão, então, incubadas por 18 horas a 4 °C. Terminada a incubação, as placas serão lavadas com PBST e 100 µL/poço do segundo anticorpo biotilado (VEGF-A, IL-10, CXCL9 e TNF-alfa) diluído em PBST + 0,1% BSA serão adicionados, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período mais 4 lavagens com PBST serão

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

realizadas e 100 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase diluído em PBST + 0,1% BSA serão adicionados às placas e incubadas por mais 1 hora. Novo ciclo de lavagens será realizado e a reação será revelada pela adição de 100 µL/poço de TMB/H₂O₂, seguida de bloqueio da reação com ácido cítrico 0,2 M e a leitura em leitor de ELISA a 450 nm. A quantidade das diversas citocinas e da quimiocina nas amostras será calculada a partir das curvas-padrão obtidas com a seguinte concentração das proteínas recombinantes: de 7,81 a 1000 pg/mL.

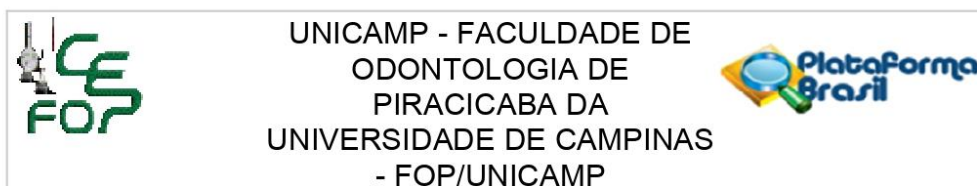
Ensaio de proliferação de linfócitos: A avaliação da proliferação celular será realizada através da marcação com o corante CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (CFSE Cell Proliferation Kit – C34554–Invitrogen, Molecular Probes). O CFSE consiste em uma molécula fluorescente que contém succinimidy ester functional group que se difunde pelo citoplasma sem afetar as funções celulares em baixas concentrações. Durante cada ciclo de divisão celular, o fluoróforo será distribuído igualmente entre as células filhas. Os linfócitos obtidos no isolamento de monócitos (item 4.3.1) serão contados e ressuspensos em PBS na concentração de 5 x 10⁶ células/mL. Será adicionado o mesmo volume de CFSE no tubo, atingindo a concentração final de 1,25 µM. A amostra será incubada a temperatura ambiente por 5 min com agitação periódica. O processo de marcação será interrompido com a adição de SFB 5%. Serão adicionados 10 mL de PBS, centrifugado a 300 g por 5 min e o sobrenadante descartado. As células serão novamente lavadas com RPMI e o pellet resultante após centrifugação será ressuspensos em RPMI na concentração de 5 x 10⁶ células/mL.

Os macrófagos diferenciados serão co-cultivados em placas de 96 poços com os linfócitos marcados na proporção 1 macrófago/10 linfócitos. As células serão incubadas por 5 dias a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂. Após 5 dias as células serão retiradas das placas e centrifugadas por 5 min a temperatura ambiente, o sobrenadante será descartado. As células serão ressuspensas em 200 µL de PBS e analisadas por FACS.

Ensaio de migração em câmaras transwell: Para os ensaios de migração as VEs derivadas dos macrófagos diferenciados (M0, M1, M2 e TAM) serão dispostas na parte inferior da câmara. Na porção superior da câmara transwell (24 poços, tamanho de poro de 8 µm, Corning, Costar), as células SCC-9, HSC3 e HACaT serão colocadas na concentração de 3 x 10⁵ células/mL em meio RPMI-1640 sem SFB e deixadas migrar durante 16 horas, e o cassete será incubado durante 6h a 37°C, CO₂ 5%. Ao final do ensaio as células remanescentes na parte superior da câmara serão delicadamente removidas enquanto que as células na parte inferior do filtro serão fixadas com 10%

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

de formaldeído, durante 10 min, lavadas com PBS e coradas com 0,1% de cristal de violeta e a contagem será realizada em microscópio Axiovert 100, Zeiss em magnificação de 20x

Ensaio de Fagocitose: Para o ensaio de fagocitose, os macrófagos serão utilizados na concentração de 106/ml e o zimosan sensibilizado (com plasma normal fresco a 10%) será utilizado como partícula fagocítica. As partículas de zimosan serão pesadas e diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Desta suspensão serão pipetados 10 µl e colocados em 1,0 ml de plasma (10%) e incubado (37°C) sob agitação constante para sensibilização das partículas. Esta mistura será centrifugada a 150 g por 10 min e adicionada sobre o concentrado de células (1,0 ml). A solução de células e partículas será incubada durante 60 min (37°C, 5% CO₂) e após esse tempo as células serão centrifugadas e coradas. Serão contadas 100 células em cada lâmina, com e sem fagocitose, e também o número de partículas fagocitadas. Os resultados serão expressos através do Índice Fagocítico (IF): IF = % de células mononucleares em fagocitose x número médio de partículas fagocitadas.

Resultados Esperados: Espera-se que esse estudo envolvendo a combinação das técnicas de imunologia, espectrometria de massas e bioinformática indique proteínas que possam elucidar os mecanismos de modulação de células do sistema imune e seu possível papel na progressão tumoral, podendo revelar novas estratégias terapêuticas no prognóstico e no tratamento do câncer oral.

O cronograma proposto para a pesquisa em E1 no projeto informa o início em 2017, o término em 2022 e prevê cerca de 72 meses para conclusão do estudo. O cronograma descrito na PB em E2 indica que a pesquisa foi iniciada em 20/01/2016 e será concluída em 29/07/2022, em cerca de 79 meses. Considerando a duração prevista inicialmente para realização da pesquisa, houve uma extensão de 57 meses.

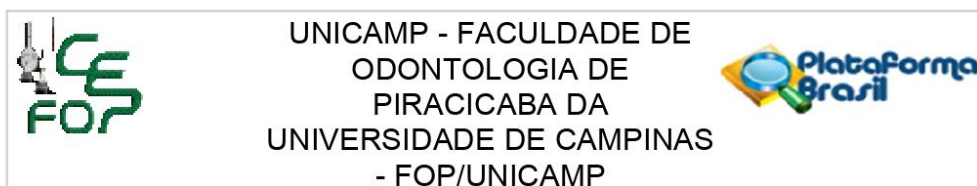
Desfecho Primário: Espera-se que esse estudo envolvendo a combinação das técnicas de imunologia, espectrometria de massas e bioinformática indique proteínas que possam elucidar os mecanismos de modulação de células do sistema imune e seu possível papel na progressão tumoral, podendo revelar novas estratégias terapêuticas no prognóstico e no tratamento do câncer oral.

Desfecho Secundário: Contribuir como estudo e com a caracterização de macrófagos associados ao câncer oral

Pendência 2 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores confirmaram que as

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

de formaldeído, durante 10 min, lavadas com PBS e coradas com 0,1% de cristal de violeta e a contagem será realizada em microscópio Axiovert 100, Zeiss em magnificação de 20x

Ensaio de Fagocitose: Para o ensaio de fagocitose, os macrófagos serão utilizados na concentração de 106/ml e o zimosan sensibilizado (com plasma normal fresco a 10%) será utilizado como partícula fagocítica. As partículas de zimosan serão pesadas e diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Desta suspensão serão pipetados 10 µl e colocados em 1,0 ml de plasma (10%) e incubado (37°C) sob agitação constante para sensibilização das partículas. Esta mistura será centrifugada a 150 g por 10 min e adicionada sobre o concentrado de células (1,0 ml). A solução de células e partículas será incubada durante 60 min (37°C, 5% CO₂) e após esse tempo as células serão centrifugadas e coradas. Serão contadas 100 células em cada lâmina, com e sem fagocitose, e também o número de partículas fagocitadas. Os resultados serão expressos através do Índice Fagocítico (IF): IF = % de células mononucleares em fagocitose x número médio de partículas fagocitadas.

Resultados Esperados: Espera-se que esse estudo envolvendo a combinação das técnicas de imunologia, espectrometria de massas e bioinformática indique proteínas que possam elucidar os mecanismos de modulação de células do sistema imune e seu possível papel na progressão tumoral, podendo revelar novas estratégias terapêuticas no prognóstico e no tratamento do câncer oral.

O cronograma proposto para a pesquisa em E1 no projeto informa o início em 2017, o término em 2022 e prevê cerca de 72 meses para conclusão do estudo. O cronograma descrito na PB em E2 indica que a pesquisa foi iniciada em 20/01/2016 e será concluída em 29/07/2022, em cerca de 79 meses. Considerando a duração prevista inicialmente para realização da pesquisa, houve uma extensão de 57 meses.

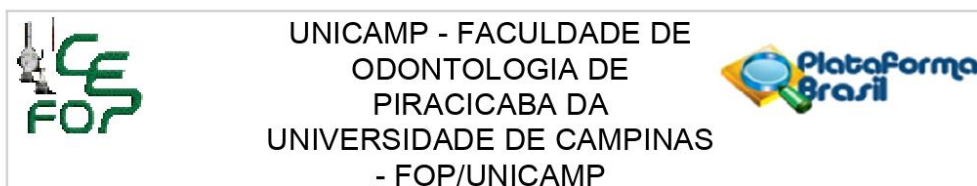
Desfecho Primário: Espera-se que esse estudo envolvendo a combinação das técnicas de imunologia, espectrometria de massas e bioinformática indique proteínas que possam elucidar os mecanismos de modulação de células do sistema imune e seu possível papel na progressão tumoral, podendo revelar novas estratégias terapêuticas no prognóstico e no tratamento do câncer oral.

Desfecho Secundário: Contribuir como estudo e com a caracterização de macrófagos associados ao câncer oral

Pendência 2 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores confirmaram que as

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

atividades propostas para o projeto foram efetiva e inteiramente descritas no protocolo e que serão realizadas dentro do cronograma proposto, a partir da data aprovada pelo CEP.

Pendência 3 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores confirmaram que as atividades serão iniciadas após a aprovação pelo CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa: O carcinoma de células escamosas é o tipo histopatológico frequentemente evidenciado nos cânceres da cavidade oral. Com alta taxa de morbidade associada a uma baixa sobrevida, este carcinoma representa 10% de todos os tumores malignos registrados no mundo. Avanços terapêuticos no tratamento desta enfermidade são tímidos e ainda pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento. Nos últimos anos, muitos estudos vêm apontando para um importante papel do microambiente tumoral, tanto no desenvolvimento do câncer quanto na metástase, contribuindo de forma decisiva na modulação nas características de agressividade e resistência ao tratamento. Desta forma, se faz muito oportuno o estudo do papel de células imunológicas e de fibroblastos/CAFs, comumente residentes no microambiente tumoral, assim como a participação de vesículas extracelulares na transferência de informações intercelulares concorrendo no desenvolvimento e progressão tumoral.

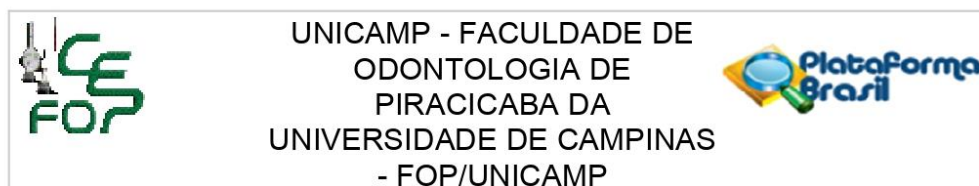
Hipótese: Vesículas extracelulares derivadas de cultura de células tumorais (SCC9 e HSC-3) e de lavado de peça de biopsia oriundas de diferentes tipos patológicos podem modular e alterar o fenótipo de macrófagos, que passam a contribuir com o desenvolvimento e a metástase tumoral.

Objetivo primário: Avaliar o papel de VES derivadas de linhagens de células tumorais e também presentes no lavado de peça de biopsia de cabeça e pescoço na diferenciação de macrófagos do tipo TAM. Avaliar o papel de VES derivadas de cultura primária de fibroblastos/CAFs oriundos de peças de biopsias na alteração do microambiente tumoral

Objetivos secundários: Avaliar as alterações do fenótipo/genótipo de macrófagos diferenciados após cultura com VES derivadas de linhagens celulares (HaCaT, SCC-9 e HSC-3). Avaliar as alterações do fenótipo/genótipo de macrófagos diferenciados após cultura com VES derivadas de tecidos oriundos de peças de biopsias. Avaliar o papel de VEs derivadas de fibroblastos/CAFs na alteração do fenótipo de células residentes no microambiente tumoral. Avaliar funcionalmente estas vesículas quanto a capacidade de internalização, transferência de informação (peptídeo, proteína), alteração do fenótipo/genótipo celular e desenvolvimento tumoral. Avaliar

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

comparativamente o perfil proteômico das VES e identificar os possíveis marcadores biológicas em cada tipo vesicular envolvidos na diferenciação e modulação de macrófagos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “Não haverá riscos aos participantes na pesquisa. A participação na pesquisa é um evento secundário a coleta de sangue, que tem como objetivo primordial a obtenção de hemocomponentes para a transfusão, e a biópsia de lesão tumoral, que tem como objetivo o diagnóstico do paciente. Doadores de sangue: O doador tem desconforto no ato da retirada do sangue (por punção com agulha). O sangue doado é utilizado para fins terapêuticos. Nós iremos utilizar um insumo derivado do processamento do sangue doado (que é descartado ao final do fracionamento sanguíneo). Biópsia de lesões tumorais de pacientes com câncer oral: Estes pacientes sofrem desconforto no ato da retirada do tecido tumoral que é retirado para diagnóstico clínico, uma pequena parte do material retirado será direcionado a pesquisa sem que haja prejuízo ao seu diagnóstico”.

Pendência 4 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores descreveram os desconfortos associados aos procedimentos primários de coleta de material biológico, mas também explicaram que os mesmos não serão causados pela participação na pesquisa e sim pelo tratamento clínico ou exame que originalmente determinou a coleta de material, e que não foi a pesquisa.

Quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “Não haverá benefícios diretos aos participantes já que se trata de estudo inicial e básico sobre a modulação células do sistema imune em processos tumorais, e prevê benefícios somente a longo prazo”.

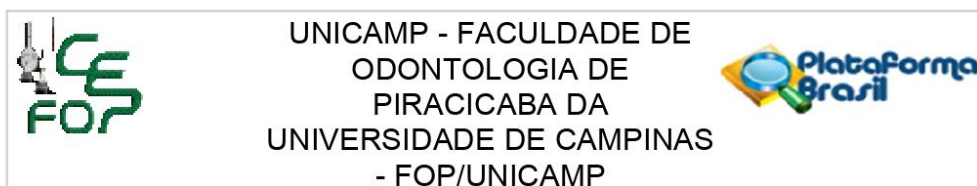
Pendência 5 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores informaram que não há previsão de benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quanto ao modo de abordagem dos participantes da pesquisa para a obtenção do TCLE os pesquisadores informaram que “Obtenção de monócitos de bolsas contendo células leucoplaquetárias (Buffy coat): Os monócitos serão obtidos do expurgo de bolsas de sangue coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, no qual os doadores voluntários assinam no momento do atendimento um Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE) cujo

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

conteúdo, de acordo com a legislação brasileira, prevê a possibilidade de uso de produtos da doação excedentes para produção de reagentes, medicamentos ou pesquisa (modelo do TCLE em anexo). Obtenção de peças de biopsias tumorais: As peças de biopsias tumorais serão fornecidas pelo Biobanco da Clínica Orocentro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, no qual os doadores voluntários já autorizaram seu uso via TCLE da Instituição (modelo do TCLE em anexo) no ato do procedimento, sem que isso lhe traga algum prejuízo durante o tratamento”.

Pendência 6 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores informaram que fizeram alteração na metodologia do projeto visando utilizar, ao invés das bolsas de sangue originalmente descritas (bolsas de BuffCoatde150mL) as câmaras de leucorredução (com 7 a 10 mL). Estas últimas serão cedidas pela Associação Beneficente de Coleta de Sangue (COLSAN) de São Paulo, que é uma organização não governamental que promove a doação de sangue em prol de hospitais e instituições de saúde. As câmaras são, segundo os pesquisadores, um subproduto da plaquetaférese e normalmente são descartadas.

Pendência 7 (atendida)- Em sua resposta de 05/08/16, os pesquisadores apresentaram modelo de TCLE a ser aplicado aos participantes.

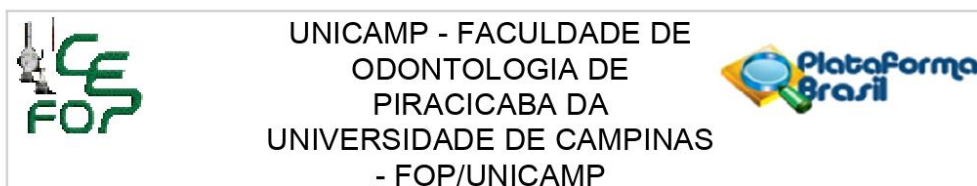
Pendência 8 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores informaram que utilizarão as amostras do Biobanco que, a partir do TCLE próprio, permitiram o uso do material estocado sem nova autorização.

Quanto à justificativa para participação de grupos vulneráveis os pesquisadores informaram que “Este projeto não prevê a participação de grupos vulneráveis”.

Quanto às medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos previsíveis os pesquisadores informaram que “Para o pesquisador, em caso de acidente ou contato com material biológico: Após exposição a material biológico, cuidados locais com a área exposta devem ser imediatamente iniciados. Recomenda-se lavagem exaustiva com água e sabão em caso de exposição percutânea. O uso de solução antisséptica degermante (PVP-Iodo ou clorexidina) pode também ser recomendado, embora não haja nenhuma evidência objetiva de vantagem em relação ao uso do sabão. Após exposição em mucosas, está recomendado a lavagem exaustiva com água ou solução fisiológica. É importante ressaltar que informações sobre a triagem clínica e laboratorial dos doadores de sangue podem ser obtidas no sistema de gestão da hemoterapia (sisGHemot), sem que para isso seja quebrado o anonimato do doador. Informações clínicas

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

adicionais dos pacientes submetidos a biopsia também pode ser obtidas no Biobanco do Orocentro de Piracicaba. Para os doadores: Não haverá previsão de medidas de proteção, pois não há risco ou desconforto previsível".

Quanto às medidas de proteção à confidencialidade os pesquisadores informaram que "Doadores Hemocentro: Embora os pesquisadores possam ter acesso as informações do atendimento aos doadores (cadastrais e triagem clínica e laboratorial) obtidos do sistema de gestão da hemoterapia (SisGHemot), o anonimato do doador será preservado pelo Hemocentro. Doadores Biobanco: Informações pessoais serão mantidas em sigilo e privacidade pelo Biobanco da Clínica Orocentro de Piracicaba, pois os estudos serão analisados em conjunto com as respostas de todos os outros voluntários".

Quanto à previsão de ressarcimento de gastos os pesquisadores informaram que "Esta pesquisa não prevê gasto para o participante e tão pouco previsão de ressarcimento".

Quanto à previsão de indenização e/ou reparação de danos os pesquisadores informaram que "Como não há previsão de riscos pela participação na pesquisa consequentemente, não há previsão de indenização e/ou reparação de dano".

Quanto aos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa os pesquisadores informaram que "Não há previsão de suspensão da pesquisa sendo que a mesma será encerrada quando as informações desejadas forem obtidas".

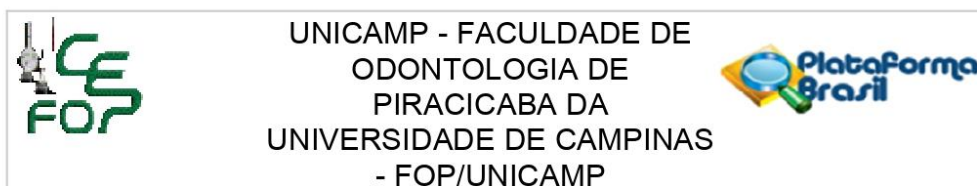
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas e estão adequadas a FR, carta de envio, as declarações dos pesquisadores, da instituição, descrição dos itens do orçamento (não mais solicitado pelo CEP-FOP), autorização de acesso aos arquivos de fichas do Orocentro, autorização de uso da área de Semiologia (neste caso desnecessária, pois as amostras estão na área de Patologia e as metodologias serão executadas em outro local), autorização de uso do CNPEM, autorização de acesso e uso das bolsas de sangue do Hemocentro, lista de links dos CVs Lattes dos pesquisadores e lista de checagem dos itens do protocolo. Pendência 9 (atendida)- Em sua resposta de 24/06/16, os pesquisadores apresentaram a autorização para uso das amostras do Biobanco da área de Patologia, o termo de doação das amostras pela COLSAN e um modelo de termo de consentimento informado para doação de sangue utilizado pela COLSAN.

A FR foi apresentada preenchida (110 participantes, sem patrocinador principal) e assinada pela pesquisadora responsável (Ana Karina de Oliveira) e pelo Diretor da FOP-UNICAMP (Dr. Guilherme

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

Elias Pessanha Henriques). A FR foi datada de 08/05/2017.

A capa do projeto cita os dados solicitados pelo CEP-FOP.

Foi apresentada a declaração dos pesquisadores, adequadamente preenchida e assinada.

Em 21/10/21 (E2) foi apresentada a declaração dos pesquisadores, adequadamente preenchida e assinada por todos os pesquisadores.

Em 21/10/21 (E2) foi apresentado arquivo isolado com o cronograma da pesquisa, informando que a mesma foi iniciada em 2017 e será concluída em 2022 (cronograma em anos).

Foi apresentada a declaração da instituição, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentado o modelo de TCLE.

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 266.000,00, referente a bolsa e despesas de custeio.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 2 (Ciências Biológicas) e tem como título público "Efeito de vesículas extracelulares de câncer oral na diferenciação de macrófagos".

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais.

A Instituição proponente da pesquisa é a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e a Colsan Sociedade Beneficente de Coleta de Sangue e o CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS foram listadas Instituições coparticipantes.

Em 01/05/17 OS PESQUISADORES SOLICITARAM EMENDA (E1) AO PROTOCOLO para: alteração 1- Mudar metodologia, ajustando os grupos do estudo para incluir outras patologias orais tais como a hiperplasia fibrosa inflamatória, como controle de lesão inflamatória livre de neoplasias; leucoplasia convencional (LC) e eritroplasia (ER), lesões potencialmente malignas importantes no estudo da progressão tumoral; hiperplasia fibrose (HF), como controle de lesão oral livre de inflamação e neoplasia; carcinoma espinocelular oral (CEC). As coletas já previstas serão realizadas (lesões de CEC e HF). Os pesquisadores justificam a inclusão dos novos grupos pela possibilidade de entendimento das alterações imunológicas que ocorrem ao longo da evolução do câncer oral e em diferentes patologias. Os pesquisadores apresentaram o arquivo "projeto" com a inserção dos novos grupos a serem coletados. Alteração 2- Mudar metodologia para aumentar o número de participantes da pesquisa. Os pesquisadores informaram que o cálculo amostral (descrito na solicitação) recomenda que sejam envolvidos 22 indivíduos por doença a ser avaliada, isto é, 22 amostras de HF, 22 de LC, 22 de ER, 22 HFI e 22 de CEC. De acordo com o texto o total de participantes passará de 40 para 110. Alteração 3- Mudar metodologia para incluir o uso das

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

UF: SP

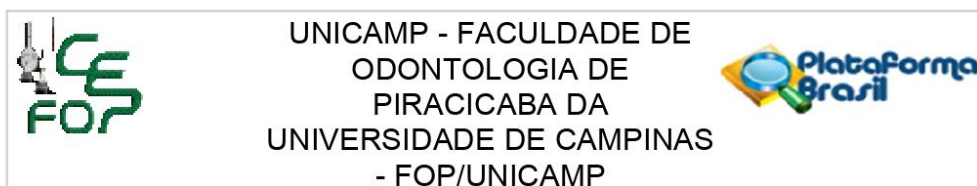
Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

E-mail: cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).

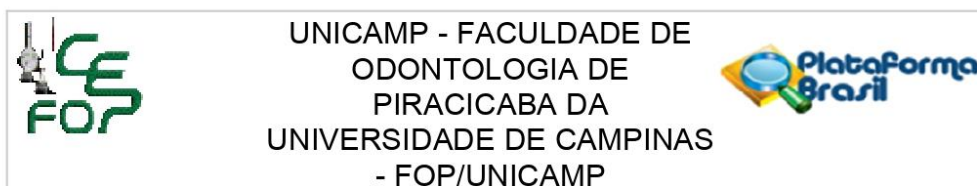


Continuação do Parecer: 5.056.198

peças de biopsias em cultura de células para obtenção de fibroblastos/CAFs. O método foi descrito na solicitação de emenda. Os pesquisadores informaram que a pesquisa ainda não foi iniciada e não há atividades a relatar. Pendência 1 de emenda 1 (atendida)-Em sua resposta de 12/05/17 os pesquisadores confirmaram o novo número de participantes e apresentaram o cálculo amostral que determinou o novo número, 110. Nova FR com o número ajustado (110) foi apresentada. Pendência 2 de emenda 1 (atendida)- Em sua resposta de 12/05/17 os pesquisadores encaminharam o arquivo "projeto" com as modificações em destaque no texto. Pendência 3 de emenda 1 (atendida)- Em sua resposta de 12/05/17 os pesquisadores confirmaram que não há solicitação de extensão de cronograma. Esclarece-se aos pesquisadores que o cabeçalho do cronograma cita que as atividades listadas são aquelas dos primeiros 24 meses da pesquisa, o que pode levar a acreditar que existam outros períodos já programados para a pesquisa. Com a resposta dos pesquisadores, entende-se que este não é o caso. Pendência 4 de emenda 1 (atendida)- Em sua resposta de 12/05/17 os pesquisadores apresentaram o modelo ajustado de TCLE, expressando as mudanças solicitadas nesta emenda.

Em 21/10/21 OS PESQUISADORES SOLICITARAM EMENDA (E2) AO PROTOCOLO para ALTERAÇÃO 1: "Inclusão de Pesquisador Participante Solicitamos por meio desta carta de emenda a inclusão da estudante Jamile de Oliveira Sá como parte da equipe de pesquisa do projeto. Jamile integra o Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio desde 2017 quando começou a atuar intensamente nos processos de coletas de biopsias junto a equipe de profissionais do Orocentro da FOP e na padronização e execução de cultura de células primárias obtidas a partir de fragmentos de biopsias. A estudante é responsável pelo projeto "Associação de proteínas de vesículas extracelulares derivadas de fibroblastos com a progressão do carcinoma espinocelular oral", que tem por objetivo caracterizar o perfil proteômico diferencial de vesículas extracelulares secretadas de fibroblastos primários isolados do tecido controle não maligno de hiperplasia fibrosa, leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral por meio da proteômica baseada em espectrometria de massas e avaliar os seus efeitos por meio de estudos funcionais sobre diferentes linhagens celulares. Em maio de 2017 submetemos uma Emenda ao Projeto (versão 5) na qual incluímos os processos de obtenção de fibroblastos a partir de tecidos oriundos da cavidade oral e o isolamento de vesículas extracelulares destas células. Também incluímos a estudante Jamile como pesquisadora participante no projeto de pesquisa e na Plataforma Brasil, mas não fizemos este requerimento oficialmente por meio da Carta de Emenda ao Projeto. Assim,

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).

Continuação do Parecer: 5.056.198

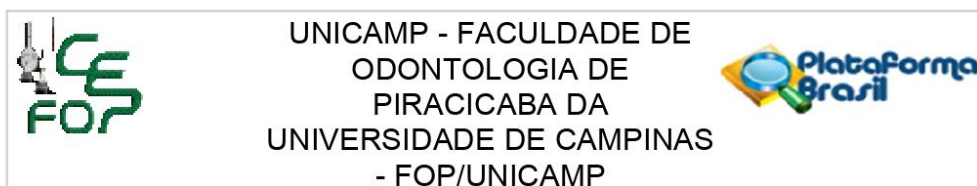
peço cordialmente que a Coordenação do CEP-FOP que deferi em favor da inclusão da estudante no projeto". ALTERAÇÃO 2: "Alteração do Cronograma de Execução e Finalização do Estudo Em virtude do baixo número de coletas de biopsias do tecido da cavidade oral realizados nos anos de 2017- 2018 e da Pandemia do Covid19 nos anos 2020-2021, nosso estudo sofreu atraso considerável em seu processo de execução e análise. Parte deste atraso já foi restabelecido, e no momento os dados obtidos encontram-se em fase de análise. Neste sentido, pedimos a extensão do Cronograma de Atividades para que seja possível a conclusão da defesa de tese de doutorado da aluna Jamile de Oliveira Sá e produção dos artigos científicos gerados por este estudo". Os pesquisadores também informaram que "Está emenda não apresenta alterações nos protocolos de coleta de matéria e dados, nos protocolos científicos descritos anteriormente e nos TCLEs". Foram apresentados o relatório parcial de atividades, a declaração dos pesquisadores, um arquivo com o cronograma ajustado e a carta de solicitação de emenda ao protocolo. O relatório parcial de atividades informa que a pesquisa está em andamento, que a previsão de término é em 30/07/2022, que foram envolvidos 60 participantes, que não houve evento adverso, que os resultados parciais foram apresentados em Congressos Científicos (AACR Annual Meeting - Driving Innovative Cancer Science to Patient Care. Chicago, USA, 2018; AACR Annual Meeting - Integrative Cancer Science - Global Impact - Individualized Patient Care. Atlanta, USA, 2019; 55º Congresso Anual SBFIS OnLine | Encontro Luso Brasileiro de Fisiologia | Symposium Miguel Covian | Latin American DOHaD Chapter. Outubro de 2020, Ribeirão Preto, SP), que os resumos foram publicados e que ainda não houve publicação dos resultados em artigos ou livros.

Pendência 1 de emenda 2 (atendida em 22/10/22): O cronograma de realização da pesquisa foi harmonizado no protocolo.

Recomendações:

As recomendações a seguir não são pendências e podem ou não ser aplicáveis ao protocolo em tela. Não há necessidade de resposta às mesmas. RECOMENDAÇÃO 1- É obrigação do pesquisador desenvolver o projeto de pesquisa em completa conformidade com a proposta apresentada ao CEP. Mudanças que venham a ser necessárias após a aprovação pelo CEP devem ser comunicadas na forma de emendas ao protocolo por meio da PB. RECOMENDAÇÃO 2- Após a aprovação do protocolo de pesquisa os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios parciais de atividade (no mínimo um a cada 12 meses) e do relatório final de atividade (ao término da pesquisa). Os pesquisadores devem informar e justificar ao CEP a eventual necessidade de

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).

Continuação do Parecer: 5.056.198

interrupção ou interrupção total ou parcial da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 3- Reforça-se a necessidade do registro de Biorrepositórios para as amostras biológicas coletadas e que não sejam de uso imediato. A intenção deve ser registrada no projeto, no Regulamento do Biorrepositório e no TCLE que será assinado pelo participante. RECOMENDAÇÃO 4- Os pesquisadores devem atentar para a necessidade de aplicação de TCLE para coleta de amostras a serem estocadas em Biobancos e Biorrepositórios e para a necessidade de aplicação de novo TCLE quando da realização de novas pesquisas com o material estocado. RECOMENDAÇÃO 5- Pesquisas com dentes doados por profissionais de saúde ainda são toleradas em hipótese pelo CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal ético de consulta direta ao participante por meio de TCLE específico da pesquisa ou da obtenção dos dentes a partir de um Biobanco de dentes e que estas últimas situações deveriam ser escolhidas em substituição à primeira. RECOMENDAÇÃO 6- Os pesquisadores devem manter os arquivos de fichas, termos, dados e amostras sob sua guarda por pelo menos 5 anos após o término da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 7- Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, após a aprovação final do protocolo, só têm valor simbólico e devem ser evitados. RECOMENDAÇÃO 8- Intercorrências e eventos adversos devem ser relatados ao CEP-FOP por meio da PB. RECOMENDAÇÃO 9- Os pesquisadores devem encaminhar os resultados da pesquisa para publicação e divulgação, com devido crédito a todos que tenham colaborado com a realização da pesquisa. RECOMENDAÇÃO 10- O parecer do CEP-FOP é fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos pesquisadores e pode conter inclusive trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo. Caso algum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no protocolo, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepância. A não manifestação dos pesquisadores será interpretada como concordância com a fidedignidade do texto do parecer no tocante à proposta do protocolo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

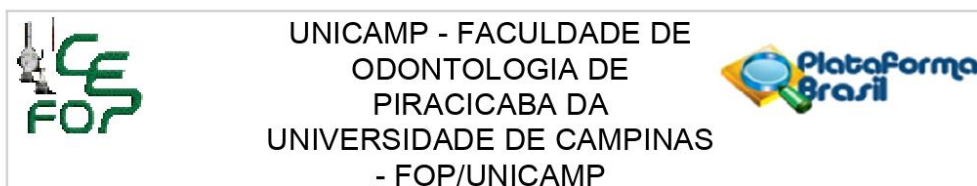
Não há mais pendência por resolver em relação à solicitação de Emenda E2. Não há pendências em relação ao relatório parcial de atividades.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer de aprovação de Emenda a protocolo emitido "ad referendum" conforme autorização do

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52	CEP: 13.414-903
Bairro: Areião	
UF: SP	Município: PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349
	E-mail: cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

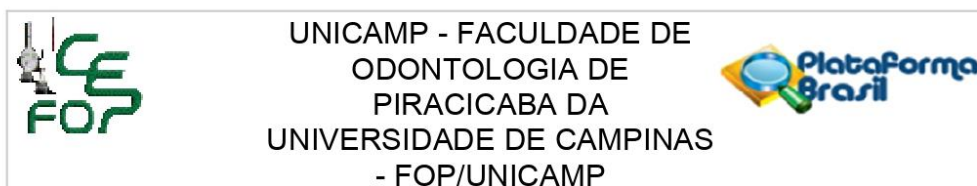
Colegiado na reunião de 03/02/2021. O parecer será submetido para homologação na reunião de 03/11/2021.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1099462_E2.pdf	22/10/2021 11:33:00		Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_E2_V06.pdf	22/10/2021 11:30:49	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Outros	Relatorio_de_Acompanhamento_.pdf	21/10/2021 09:25:59	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_dos_Pesquisadores_.pdf	21/10/2021 09:25:27	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_Atividades.pdf	21/10/2021 09:24:57	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Outros	Carta_Emenda_V06.pdf	21/10/2021 09:24:01	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Outros	8LinksCV_Emenda.pdf	12/05/2017 13:20:45	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLE_Emenda.pdf	12/05/2017 13:19:45	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	3Projeto_Emenda.pdf	12/05/2017 13:19:09	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	1Folhaderosto_Emenda.pdf	12/05/2017 13:18:13	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLEe.pdf	05/08/2016 16:51:33	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	6_6TermoDoacao_2.pdf	24/06/2016 08:24:26	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLEd.pdf	24/06/2016 08:23:05	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Declaração de	6_DecUsoBioancoFOP.pdf	24/06/2016	Ana Karina de	Aceito

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).



Continuação do Parecer: 5.056.198

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	6_DecUsoBioancoFOP.pdf	08:20:06	Oliveira	Aceito
Outros	CEPCompleto155_15.pdf	10/12/2015 10:09:48	Felippe Bevilacqua Prado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	6_6TermoDoacao.pdf	09/12/2015 10:36:35	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	6_5Autarq.pdf	09/12/2015 10:36:12	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	6_4Declnfra.pdf	09/12/2015 10:35:31	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Orçamento	6_3Orcamento.pdf	09/12/2015 10:35:04	Ana Karina de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	6_2Declnst.pdf	09/12/2015 10:34:40	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLEc.pdf	09/12/2015 10:30:14	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLEb.pdf	09/12/2015 10:29:49	Ana Karina de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLEa.pdf	09/12/2015 10:29:33	Ana Karina de Oliveira	Aceito

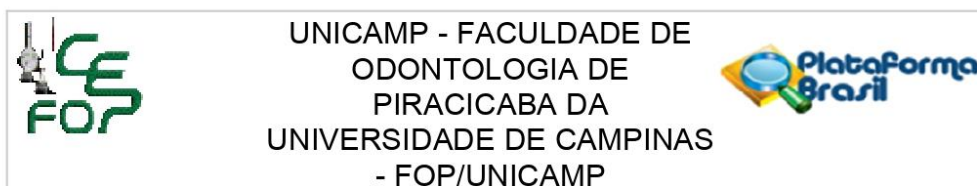
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52**Bairro:** Areião**CEP:** 13.414-903**UF:** SP**Município:** PIRACICABA**Telefone:** (19)2106-5349**Fax:** (19)2106-5349**E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação).

Continuação do Parecer: 5.056.198

PIRACICABA, 22 de Outubro de 2021

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO 2 - Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio

Tese Jamile

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

19% ÍNDICE DE SEMELHANÇA	16% FONTES DA INTERNET	9% PUBLICAÇÕES	3% DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	--------------------------	------------------------------------

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	6%
2	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	1%
3	docplayer.com.br Fonte da Internet	1%
4	posnf.sites.uff.br Fonte da Internet	1%
5	bdt.d.unifal-mg.edu.br:8080 Fonte da Internet	1%
6	repositorio.ufba.br Fonte da Internet	1%
7	Moraes, Flávia Melissa de Souza(Ricart, Carlos André Ornelas). "Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae)", RIUnB, 2006. Publicação	<1%