

JAQUELINE VAZ VANINI

Carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: análise da plasticidade do citoesqueleto das células neoplásicas frente ao processo de invasão tumoral

São Paulo
2022

JAQUELINE VAZ VANINI

Carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: análise da plasticidade do citoesqueleto das células neoplásicas frente ao processo de invasão tumoral

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Vanini, Jaqueline Vaz.

Carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: análise da plasticidade do citoesqueleto das células neoplásicas frente ao processo de invasão tumoral / Jaqueline Vaz Vanini; orientadora Silvia Vanessa Lourenço; co-orientadora; Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo. -- São Paulo, 2022.

147 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Citoqueratinas. 2. Invasão angiolímfática. 4. Invasão perineural. 5. Invasão vascular. I. Lourenço, Silvia Vanessa. II. Coutinho-Camillo, Cláudia Malheiros. III. Título.

Vanini J.V. Carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: análise da plasticidade do citoesqueleto das células neoplásicas frente ao processo de invasão tumoral. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 04/10/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

Instituição: Universidade de Michigan

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Cláudio Costa

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho ao querido professor Maurício e a todos os outros mestres com quem aprendi ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, a quem muito admiro, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos e por acreditar em meu potencial.

À Profa. Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, pela coorientação neste trabalho, confecção das lâminas brancas, e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo Koyama, pelas estatísticas e outras contribuições importantes neste trabalho.

À Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho, pela orientação nas etapas de cultura celular e por gentilmente ceder o espaço do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Leandro Matos, pela parceria, pelo levantamento dos casos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do ICESP e importantes contribuições e conselhos.

À Profa. Dra. Cristina Massoco, por gentilmente compartilhar seus conhecimentos e seu laboratório para a realização e análise da citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Ana Paula Lepique, por gentilmente doar um *vial* da linhagem celular utilizada nos ensaios *in vitro*.

Aos alunos de Iniciação Científica, José, Andrey, Luzia, Mayara, Amanda e Giovanna, pela imensa ajuda nas etapas laboratoriais, amizade e convívio no laboratório.

À CAPES, pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FOUSP, por toda a estrutura do curso de pós-graduação.

Ao Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Faculdade de Medicina Veterinária e funcionários, onde foram realizadas algumas etapas laboratoriais deste trabalho.

Às técnicas Kátia, Juciara e Nalva, por toda a ajuda e suporte nas etapas laboratoriais.

Às colegas de pós-graduação, da FOUSP e FMUSP, pelo convívio, apoio e conselhos ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus pais, família e amigos pelo apoio e suporte ao longo dessa jornada.

À Marcella e Ray, pela amizade, carinho e cuidado ao longo da minha trajetória.

Ao José, pela ajuda, paciência, amor, cuidado e por dividir essa caminhada comigo, no trabalho e na vida.

*“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”
Isaac Newton*

RESUMO

Carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: análise da plasticidade do citoesqueleto das células neoplásicas frente ao processo de invasão tumoral [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Original.

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais comum da cavidade oral, sendo a língua e assoalho as estruturas mais afetadas. A invasão angiolímfática e perineural por células neoplásicas, em decorrência da exuberante vascularização e inervação regional facilitam, nesse tipo tumoral, a disseminação metastática e agravam o prognóstico da doença exigindo terapias mais agressivas para controle da doença. Os mecanismos de invasão pelo carcinoma de células escamosas ainda são pouco esclarecidos, mas aparentemente dependem da interação do aparato celular com o seu microambiente, sendo a plasticidade do citoesqueleto processo importante nesse cenário. As citoqueratinas, filamentos intermediários do citoesqueleto, desempenham, além da manutenção da estrutura de células epiteliais, diversas outras funções que podem ter impacto no processo de invasão das células neoplásicas. Acredita-se que as células tumorais mantêm a expressão das citoqueratinas semelhante ao epitélio de origem; uma mudança no padrão de expressão das citoqueratinas em resposta ao processo de invasão tumoral pode ser uma hipótese para explicar a invasão em estruturas específicas. O objetivo deste estudo foi analisar se existe alteração na expressão de diferentes citoqueratinas no carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal no processo de invasão tumoral. Foi realizada análise imunistoquímica para CK5, CK7, CK10, CK13, CK14, CK16, CK18, CK19, D2-40, CD31 e S-100 de 29 tumores primários e 20 metástases regionais. Foram realizados experimentos *in vitro* utilizando a linhagem SCC-9, para a investigação da migração e proliferação sob efeito dos fatores de crescimento FGF, NGF e VEGF. A expressão da CK14, CK16 e CK18 sob efeito dos mesmos fatores foi avaliada por citometria de fluxo. Os tumores, em geral, expressaram na massa tumoral as citoqueratinas primárias do epitélio (CKs 5/14), com alguns casos apresentando redução ou perda de sua expressão. As citoqueratinas CK10, CK13 e CK16 apresentaram alteração no seu padrão de expressão em comparação com o padrão normal, e foi observada a positividade de citoqueratinas de epitélio simples (CKs 7, 18 e 19) que não aparecem na mucosa normal. Foram encontradas associações entre a

ausência da expressão da CK16 no tumor primário e invasão perineural ($p=0,0001$); CK19 positiva e focal na massa tumoral e invasão perineural ($p=0,038$) e recidiva nos casos positivos para CK19 no tumor primário ($p=0,014$). Também foram encontradas outras associações entre a expressão dessas proteínas em metástases regionais e variáveis clínicas, prognósticas e histopatológicas. As metástases regionais apresentaram, em sua maioria, alteração na expressão das proteínas analisadas em comparação com o tumor primário. Também foi possível observar a expressão positiva das proteínas D2-40 e S-100 nas células tumorais, ausentes nos queratinócitos mucosa oral. Os resultados dos experimentos *in vitro* sob estímulo dos fatores de crescimento mostraram um aumento no número de células positivas e intensidade de expressão das CKs 14, 16 e 18, sendo que as alterações foram mais acentuadas no intervalo de tempo de 24h. Foi observado um aumento significativo da migração celular sob estímulo do VEGF. As taxas de proliferação celular apresentaram um aumento significativo sob estímulo do FGF e NGF após o período de 48 horas e 72 horas de incubação. Os resultados encontrados, em conjunto, fornecem evidências de uma alteração no padrão de expressão das citoqueratinas no processo de invasão e metástase.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Citoqueratinas. Invasão angiolinfática. Invasão perineural. Invasão vascular.

ABSTRACT

Vanini J.V. Tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma: analysis of tumor cells cytoskeleton plasticity in tumoral invasion process [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Original version.

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common neoplasm of the oral cavity and the tongue and floor of the mouth are the most affected structures. Angiolymphatic and perineural invasion by tumor cells are common in this neoplasm, once these organs present rich vascularization, innervation, and lymphatic drainage. The metastatic dissemination worsens the disease's prognosis, requiring aggressive treatments to control the disease. Nevertheless, the invasion mechanisms of SCC evolution are still unclear but seem to depend on the interaction of tumor cells and their surrounding microenvironment. The cytoskeleton plasticity is an important process in this scenery. Cytokeratins (CKs) are cytoskeleton intermediate filaments, maintaining the tridimensional structure of epithelial cells and playing a lot of other functions that could impact the invasion process by tumor cells. The tumor cells generally keep the cytokeratin expression similar to the original epithelial tissue. Modifications in CKs expression patterns in response to the invasion process could be a hypothesis to explain the invasion in specific structures, once these proteins have functions in other cellular mechanisms. The objective of this study was to analyze possible alterations in the cytokeratins expression in the invasion process of the tongue and floor of the mouth SCC. Immunohistochemical analysis was performed for CK5, CK7, CK10, CK13, CK14, CK16, CK18, CK19, D2-40, CD31, and S-100 in 29 primary tumors and 20 regional metastasis of oral SCC. *In vitro* cell culture assays were performed using SCC-9 cells to investigate tumor cell migration and proliferation under the effect of growth factors FGF, NGF, and VEGF. The expression of CK14, CK16, and CK18 under the growth factors effect was evaluated by flow cytometry. Cytokeratins CK10, CK13, and CK16 presented modifications in their expression pattern compared to the normal pattern, as well the simple epithelial keratins (CK7, CK18, and CK19) presented positive expression, which is not observed in normal mucosa. We found associations between negative CK16 expression and perineural invasion ($p=0,0001$); focal and positive CK19 and perineural invasion ($p=0,038$) and relapse in positive cases ($p=0,014$). We also found associations between the expression of these proteins in regional metastasis and clinical, histopathological, and prognostic parameters. Mostly

regional metastasis presented different protein expression compared to primary tumors. D2-40 and S-100 positivity was detected in tumor cells, which is absent in normal keratinocytes of the oral mucosa. *In vitro* assays results showed an increase in the number of positive cells and in the expression intensity of CK14, CK16, and CK18. These alterations were more expressive after 24-hour incubation. We observed a significant increase in cell migration under the effect of VEGF. Proliferation cell rates increased significantly under the effect of FGF and NGF after 48-hour and 72-hour incubation. These results show evidence of important alterations in cytokeratin expression in the invasion and metastasis process.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Cytokeratins. Angiolymphatic invasion. Perineural invasion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil habitantes de neoplasias da cavidade oral, estimadas para o ano de 2020	30
Figura 2.2 - Proteínas que compõem a estrutura do citoesqueleto celular.....	38
Figura 2.3 - Desmossomo e suas estruturas	40
Figura 2.4 - Diferentes critérios de classificação das citoqueratinas	41
Figura 2.5 - Variação na expressão das citoqueratinas de acordo com as camadas do epitélio queratinizado e não queratinizado.....	42
Figura 4.1 - Desenho do estudo.....	51
Figura 4.2 - Fluxograma da casuística	52
Figura 4.3 - Resultados dos PCRs para micoplasma	56
Figura 4.4 - Desenho do ensaio de migração celular.....	58
Figura 4.5 - Desenho do ensaio de proliferação celular.....	59
Figura 5.1 - Características histopatológicas da amostra analisada.....	64
Figura 5.2 - Imunoexpressão de CK5, CK7, CK10 e CK13 na amostra analisada	68
Figura 5.3 - Imunoexpressão de CK14, CK16 e CK19 na amostra analisada.....	70
Figura 5.4 - Imunoexpressão de CD31, citoqueratinas e S-100 na amostra analisada	72

Figura 5.5 - Imunoexpressão de D2-40 e citoqueratinas em corte seriado 74

Figura 5.6 - Imagens representativas do ensaio de migração com fatores de crescimento 77

Figura 5.7 - Resultados do ensaio de proliferação celular 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Classificação de acordo com a diferenciação histopatológica.....	34
Quadro 2.2 - Classificação TNM, segundo a AJCC	35
Quadro 2.3 - Expressão de citoqueratinas na cavidade oral	44
Quadro 4.1 - Anticorpos e padronização para imunistoquímica simples	53
Quadro 4.2 - Anticorpos e padronização para dupla marcação	55
Quadro 4.3 - Fatores de crescimento utilizados e veículos de diluição	57
Quadro 4.4 - Anticorpos e padronização para citometria de fluxo	60
Quadro 5.1 - Dados epidemiológicos e histopatológicos da amostra	63
Quadro 5.2 - Resultado da imunexpressão das proteínas analisadas nos tumores primários e metástases.....	65
Quadro 5.3 - Resultados dos testes post-hoc (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 3 horas.....	79
Quadro 5.4 - Resultados dos testes post-hoc (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 6 horas.....	79
Quadro 5.5 - Resultados dos testes post-hoc (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 24 horas.....	80
Quadro 5.6 - Resultados médios da citometria de fluxo para experimentos de 24h..	83
Quadro 5.7 - Resultados médios da citometria de fluxo para experimentos de 48h..	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 - Frequência de tumores malignos nas estruturas da cavidade oral segundo estudo multicêntrico	31
Gráfico 5.1 - Expressão das proteínas analisadas nos tumores primários	66
Gráfico 5.2 - Proteínas alteradas em metástases regionais comparadas com o tumor primário	66
Gráfico 5.3 - Resultados do ensaio de migração celular.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	carcinoma de células escamosas
CK	citoqueratina
HPV	papilomavírus humano
HE	coloração por hematoxilina-eosina
IF	filamento intermediário
SFB	soro fetal bovino
OMS	Organização Mundial da Saúde
TNM	<i>tumor node metastasis</i>
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
μl	microlitro
ml	mililitro
μm	micrometro
ng	nanograma
μg	micrograma
mg	miligrama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Carcinoma de células escamosas: aspectos epidemiológicos	29
2.2	Carcinoma de células escamosas: aspectos clínico-patológicos ..	32
2.2.1	Microambientes de invasão e fatores de crescimento	36
2.3	Estrutura do epitélio normal da mucosa oral	37
2.3.1	Citoesqueleto e filamentos intermediários	38
2.3.2	Citoqueratinas	40
2.4	Citoqueratinas e CCE oral	43
2.4.1	CK 5/14	44
2.4.2	CK 7	45
2.4.3	CK 10	46
2.4.4	CK 13	46
2.4.5	CK 16	47
2.4.6	CK 18 e CK 19	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivos gerais	49
3.2	Objetivos específicos	49
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	51
4.1	Casuística	51
4.2	Análise histológica descritiva	52
4.3	Imunoistoquímica	53
4.4	Imunoistoquímica dupla marcação	54
4.5	Cultura celular	56
4.5.1	Ensaio de migração celular	57
4.5.2	Ensaio de proliferação celular	58
4.5.1	Citometria de fluxo	60
4.6	Avaliação dos resultados	61
4.6.1	Dados clínico-epidemiológicos incluídos no estudo	61
4.6.2	Imunoistoquímica	61

4.6.3	Cultura celular.....	62
4.6.2.1	<i>Ensaio de migração</i>	62
4.6.2.2	<i>Ensaio de proliferação</i>	62
4.6.2.3	<i>Citometria de fluxo</i>	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Imunoexpressão das proteínas analisadas	65
5.1.1	CK 5 e CK 14.....	67
5.1.2	CK 7.....	67
5.1.3	CK 10.....	67
5.1.4	CK 13.....	67
5.1.5	CK 16.....	69
5.1.6	CK 18.....	69
5.1.7	CK 19.....	69
5.1.8	CD31.....	71
5.1.9	S-100	71
5.1.10	D2-40	73
5.1.11	Estatística	75
5.2	Cultura celular	76
5.2.1	Ensaio de migração celular	76
5.2.2	Ensaio de proliferação celular	80
5.2.3	Citometria de fluxo.....	83
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICES	111
	ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas que acometem a região da cabeça e pescoço, atualmente, constituem um problema relevante de saúde pública em nível mundial. Trata-se de um grupo específico de tumores, sendo o mais comum o carcinoma de células escamosas (CCE), que é uma neoplasia maligna originada nas células componentes do epitélio de revestimento, que possuem a capacidade de romper a membrana basal e invadir os tecidos adjacentes e órgãos distantes (invasão secundária e metástase) (1,2).

Quando a neoplasia invade outras estruturas, como osso, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, o prognóstico da doença se agrava, e, conseqüentemente, são necessárias grandes ressecções cirúrgicas e tratamentos mais agressivos, causando limitações funcionais e estéticas importantes aos pacientes, com impactos psicossociais, na alimentação e fala, entre outros (3). Mesmo com todas as estratégias terapêuticas, a resposta ao tratamento é heterogênea, com altas taxas de recidivas e óbitos (3). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer da cavidade oral ocupa a quinta posição entre as neoplasias mais frequentes entre os homens, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.

O diagnóstico precoce se mantém como principal fator na evolução dos casos, mas a falta de informações dos pacientes e mesmo dos profissionais da saúde dificulta muito essa possibilidade. As lesões iniciais são muitas vezes assintomáticas ou em regiões de difícil acesso visual, o que retarda a sua detecção. Estima-se que pelo menos 30% dos casos de neoplasias orais já apresentam metástases cervicais, palpáveis ou ocultas, no momento da avaliação clínica inicial (4).

A biologia do CCE é bem estudada, mas diversos fatores permanecem por serem elucidados na busca da compreensão de mecanismos que possam auxiliar em estratégias terapêuticas. Durante a evolução da doença, existe uma grande alteração na expressão das proteínas celulares, que podem ser utilizadas como biomarcadores. Sua aplicação tanto se dá no diagnóstico, aumentando o seu grau de precisão e confiabilidade, quanto no desenvolvimento de novos fármacos no conceito de terapias-alvo, com efeito apenas nas células tumorais, o que aumenta a sua eficácia e diminui a toxicidade e os potenciais efeitos colaterais.

O CCE possui origem no tecido epitelial da mucosa oral, que é um tecido com fenótipo, arquitetura e expressão de proteínas altamente específicos. Esse tecido

possui uma organização característica em camadas celulares estratificadas com presença ou não de queratinização nas camadas superficiais. Suas células são justapostas, com abundantes sistemas de adesão e um complexo citoesqueleto, composto por filamentos intermediários, microfilamentos e microtúbulos.

As citoqueratinas (CKs) são filamentos intermediários presentes no citoesqueleto de células epiteliais, possuindo diversas funções, que vão muito além da manutenção da estrutura tridimensional da célula e do tecido. Elas também estão envolvidas no transporte de proteínas, sinalização, adesão, motilidade e proliferação celular (5). O epitélio oral normal expressa algumas citoqueratinas específicas, como a CK5, CK10, CK13 e CK14. Essas citoqueratinas são utilizadas na rotina diagnóstica para se confirmar a histogênese tumoral, especialmente em casos de tumores pouco diferenciados ou de metástases para outros órgãos.

Acredita-se que as células do CCE mantenham a expressão de citoqueratinas semelhante ao epitélio de origem. Porém, sabendo que a frente de invasão do tumor possui características moleculares peculiares, a mudança de expressão nas citoqueratinas das células dessa região é uma hipótese que pode explicar a invasão em estruturas específicas, como vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Isso aumenta as possibilidades de aprimorar os métodos de detecção mais precisa do grau de agressividade do tumor, desenvolvimento de novos fármacos e tomada de decisões clínicas e terapêuticas mais efetivas para o tratamento da doença.

Levando esses dados em consideração, o presente estudo visa responder às seguintes perguntas: existe uma mudança na expressão das citoqueratinas pelas células tumorais nos diferentes processos de invasão? A expressão das diferentes citoqueratinas está relacionada a características mais agressivas do CCE da cavidade oral?

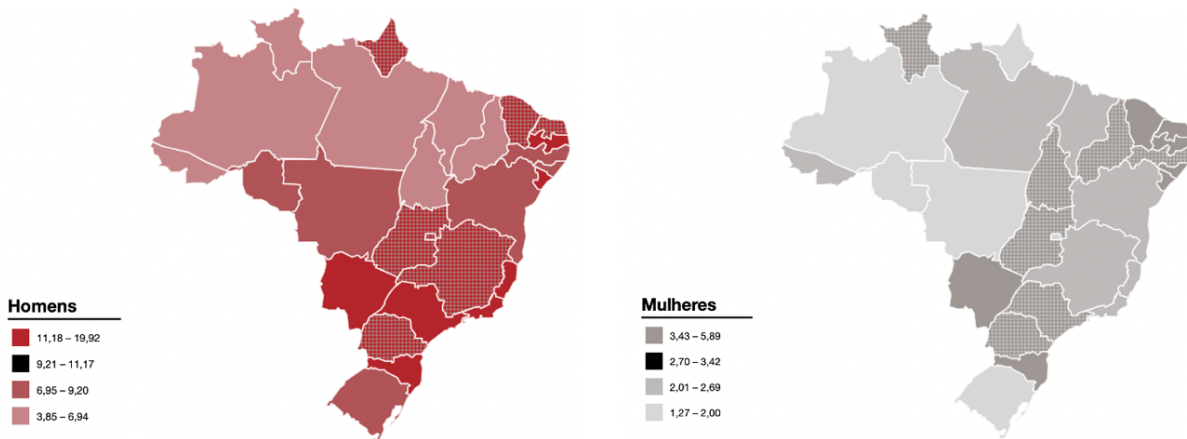
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas: aspectos epidemiológicos

O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais comum das neoplasias malignas de cabeça e pescoço (2,6), apresenta uma incidência maior em homens do que mulheres, e está entre as 10 neoplasias mais frequentes no mundo (1), sendo a sexta mais frequente causa de morte por câncer no Brasil (7). O tabagismo e o etilismo crônicos e associados são os fatores de risco ambientais mais comuns, fazendo com que a incidência da doença seja elevada tanto em países em desenvolvimento, quanto em desenvolvidos, porém a mortalidade é menor nestes últimos, reflexo da desigualdade social (1,8). A taxa de sobrevivência em 5 anos de pacientes acometidos pela doença gira em torno de 50% (2).

Em 2020, no Brasil, cerca de 15210 novos casos de câncer da cavidade oral foram diagnosticados, sendo 11200 homens e 4010 mulheres (proporção H/M 2,8:1), correspondendo a uma incidência de 10,7 casos a cada 100 mil homens e 3,71 a cada 100 mil mulheres. Excluindo-se os tumores de pele não-melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quinto mais frequente nas regiões Sudeste (13,58/100 mil), Centro-Oeste (8,94/100 mil) e Nordeste (7,65/100 mil), e nas regiões Sul (13,32/100 mil) e Norte (3,98/100 mil) ocupa a sexta posição, conforme ilustrado na Figura 2.1.

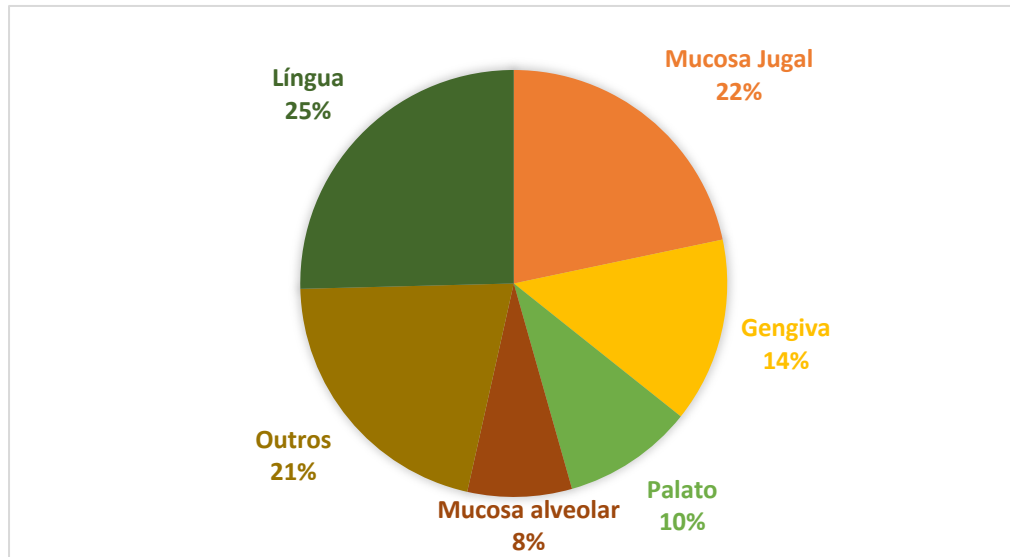
Figura 2.1 - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil habitantes de neoplasias da cavidade oral, estimadas para o ano de 2020



Fonte: adaptado de <http://www.inca.gov.br>

A língua é a estrutura da cavidade oral com maior incidência de CCE (1), conforme ilustrado no Gráfico 2.1, e tumores malignos em língua possuem um índice de mortalidade maior quando comparado a outras estruturas da cavidade oral (9). A região anatômica da língua e assoalho bucal é ricamente inervada e vascularizada, o que, em termos biológicos, pode facilitar a infiltração tumoral e, como consequência aumentar as chances de desenvolvimento de metástases, mesmo em neoplasias de menores dimensões. A presença de metástase em um único linfonodo reduz a taxa de sobrevivência do paciente em mais 50% (10) e estima-se que pelo menos 30% a 47% dos casos de CCEs orais apresentam metástases cervicais, palpáveis ou ocultas, no momento da avaliação clínica inicial (4,11).

Gráfico 2.1 – Frequência de tumores malignos nas estruturas da cavidade oral, segundo estudo multicêntrico



Fonte: adaptado de Dhanuthai et al. (12)

Segundo um estudo transversal de base populacional realizado no Brasil (7), a maioria dos casos da doença é diagnosticada tardiamente, com presença de metástases, o que tem como consequência um prognóstico mais reservado, bem como tratamentos mais agressivos. Esses dados demonstram a deficiência em medidas efetivas de prevenção ou de diagnóstico precoce em nosso país, o que torna o CCE da cavidade oral um problema de saúde pública.

O tratamento da doença é complexo e tem como consequência diversas morbidades ao paciente. Lesões mais avançadas requerem cirurgias extensas, quimioterapia e radioterapia associadas, com importantes efeitos de toxicidade sistêmicos. Isso tudo leva à uma piora na qualidade de vida do paciente, devido às deformidades e dificuldades de fala e mastigação, frequentemente levando também a distúrbios psicossociais (6).

Mesmo com o desenvolvimento de novas terapias-alvo, como os anticorpos monoclonais para receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e inibidores de *checkpoint* imunológicos, a sobrevida geral da doença permanece em um patamar insatisfatório, tornando-se um importante objetivo para a clínica e pesquisa (6). O desenvolvimento de técnicas avançadas de análises biomoleculares trouxe novas descobertas e possibilidades para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença, com o potencial de desenvolvimento de novos biomarcadores e terapias-alvo personalizadas.

2.2 Carcinoma de células escamosas: aspectos clínico-patológicos

O carcinoma de células escamosas da cavidade oral tem origem no epitélio estratificado que reveste a mucosa oral. O desenvolvimento da neoplasia se sucede em decorrência do acúmulo de mutações que promovem a perda da regulação do ciclo celular. O início da capacidade invasiva é detectado pelo rompimento da membrana basal e migração das células tumorais para o tecido conjuntivo subjacente, progredindo para o tecido adiposo, muscular e ósseo, em um processo que é orquestrado por um grande número de alterações moleculares (6).

O CCE, assim como outros tumores malignos, apresenta uma série de alterações genéticas e epigenéticas que culminam em importantes modificações no comportamento celular, incluindo a presença de mutações específicas, alterações em micro RNAs, redução ou superexpressão de proteínas e produção de proteínas aberrantes. Essas alterações altamente específicas são um importante tópico de estudo e pesquisas que buscam biomarcadores para diagnóstico e para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (13).

Especificamente a frente de invasão do tumor possui uma população celular distinta da massa tumoral, com características mais invasivas, como alta capacidade de motilidade e secreção de proteínas que degradam a matriz extracelular e outros tecidos. O padrão da frente de invasão parece ser um importante fator para determinar o prognóstico da doença, e geralmente segue dois padrões: coesivo, apresentando uma linha de invasão bem definida, com grandes blocos de células tumorais com pouco ou nenhum estroma entre eles; e não coesivo, apresentando pequenos grupos de células tumorais, cordões, ou mesmo células individuais, sendo associado a um pior prognóstico(14). A invasão de vasos linfáticos e sanguíneos permite a disseminação das células tumorais para outras estruturas distantes da região anatômica do tumor primário (13,15).

O processo invasivo se associa aos sinais clínicos clássicos da doença: lesão com aspecto endurecido à palpação e fixada aos tecidos adjacentes. Nos casos mais iniciais, as lesões podem apresentar-se como lesões brancas, vermelhas ou heterogêneas. A progressão da lesão neoplásica, em geral cursa com ulceração superficial e aspecto infiltrado em sua periferia. Além desses sinais clássicos, sua apresentação clínica é muito variada: pode desenvolver-se um aumento de volume, em alguns casos de aspecto verrucoso, ou em um padrão endofítico, no qual a lesão

geralmente apresenta uma área central deprimida, com bordas elevadas e áreas de ulcerações (15).

O CCE pode ser indolor, especialmente nos estágios iniciais, o que contribui para o atraso em sua detecção. A dor geralmente ocorre quando a lesão infiltra nervos locais, o que se traduz como um grau mais avançado e pior prognóstico da doença. Em casos mais graves, dependendo da localização, a lesão pode atingir a pele, formando fístulas e áreas de necrose e sangramento, limitar a abertura bucal, causar dificuldades e dor na mastigação e deglutição, alterações na salivação, perdas dentárias e reduzir a mobilidade lingual (16).

Quando o tumor atinge o tecido ósseo, podem surgir alterações radiográficas na região afetada, caracterizadas por um padrão irregular de áreas radiolúcidas com bordas indefinidas. Porém, a radiografia isoladamente não é suficiente para se determinar se existe ou não invasão óssea, sendo necessários outros exames de diagnóstico por imagem mais específicos, notadamente a tomografia computadorizada. A ressonância magnética complementa o diagnóstico da extensão da doença, detalhando o grau de envolvimento dos tecidos moles (16,17).

As lesões recebem uma classificação histopatológica de acordo com o seu grau de diferenciação: bem diferenciadas, moderadas ou pouco diferenciadas, de acordo com a sua semelhança com o epitélio de origem. Casos bem diferenciados apresentam evidências de formação de camadas estratificadas, produção de queratina (pérolas córneas) e formação de uma pseudo camada basal ao redor das ilhas de células tumorais, que são bem definidas. Geralmente esses casos apresentam uma frente de invasão coesa. Casos moderadamente diferenciados mostram pouca formação de queratina, com uma frente de invasão menos coesiva. Casos pouco diferenciados possuem pouca semelhança com o tecido epitelial original, podendo ser necessário investigar a histogênese tumoral por meio da técnica de imunoistoquímica, sendo o padrão-ouro a positividade para citoqueratinas 5/14 (18). Esses casos apresentam numerosas atipias celulares, figuras de mitose proeminentes e anormais, frente de invasão pouco coesiva, com cordões, pequenos grupos ou mesmo células individuais infiltrando os tecidos adjacentes. As principais características histológicas estão resumidas no Quadro 2.1. Estima-se que 60% dos tumores são moderadamente diferenciados, 30% bem diferenciados e 10% pouco diferenciados (15).

Quadro 2.1 - Classificação de acordo com a diferenciação histopatológica

Classificação	Características
Bem diferenciado	Arquitetura tecidual semelhante ao epitélio normal, com formação de pérolas córneas Frente de invasão coesa e bem definida
Moderadamente diferenciado	Pleomorfismos nucleares distintos Pouca queratinização Atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas Frente de invasão menos coesa
Pouco diferenciado	Predomínio de células imaturas e atípicas Mitoses numerosas, típicas e atípicas Ausência de queratinização Frente de invasão não-coesiva

Fonte: adaptado de: Barnes et al. p.170(19).

Em geral, as atipias celulares observadas são: células e núcleos aumentados, nucléolos grandes e proeminentes, núcleos hiper Cromáticos, pleomorfismo celular e nuclear, disqueratose, atividade mitótica aumentada e figuras de mitose anormais. Além disso, também é comum a formação de cristas epiteliais em formato bulbar, perda da polarização celular e formação de pérolas de queratina nos tumores bem diferenciados (17).

Um dos sistemas mais utilizados de classificação dos tumores é o TNM (*tumor node metastasis*), desenvolvido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)(20), que leva em consideração o seu tamanho, invasão de tecidos adjacentes e metástases. Foi proposta uma classificação específica para os tumores primários da cavidade oral, de acordo com o Quadro 2.2. Tumores da cavidade oral e orofaringe HPV+ são tratados como uma entidade à parte, devido às suas características clínicas e histopatológicas peculiares. O estadiamento determinado pelos critérios TNM irá orientar o tratamento e planejamento da estratégia terapêutica.

Quadro 2.2 - Classificação TNM, segundo a AJCC

T – TUMOR PRIMÁRIO			
TX	Tumor primário não pode ser avaliado		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	Tumor de 2 cm ou menos em sua maior dimensão / Tumor com até 5mm de profundidade de invasão		
T2	Tumor maior que 2 cm e menor que 4 cm em sua maior dimensão / Tumor com até 10mm de profundidade de invasão		
T3	Tumor maior que 4 cm em sua maior dimensão / Tumor com mais de 10mm de profundidade de invasão		
T4a (lábio)	Invasão tumoral através da cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho bucal ou pele (queixo ou nariz)		
T4a (cavidade oral)	Invasão tumoral através da cortical óssea até os músculos extrínsecos/profundos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso, e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face		
T4b (lábio e cavidade oral)	Invasão tumoral no espaço mastigatório, fossa pterigoidea, ou base do crânio; ou envolve a artéria carótida interna		
<i>Nota: Erosão superficial isolada do osso/alvéolo dentário por tumor primário gengival não é suficiente para classificar um tumor como T4.</i>			
N – LINFONODOS REGIONAIS (CERVICAIS)			
NX	Linfonodos não puderam ser avaliados		
N0	Sem evidência de metástases para linfonodos		
N1	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, <3 cm, EC(-)		
N2a	Metástase em um único linfonodo ipsilateral entre 3–6 cm, EC(-) / Metástase em um único linfonodo <3cm, EC(+)		
N2b	Metástases em múltiplos linfonodos ipsilaterais, <6 cm, EC(-)		
N2c	Metástases em linfonodos bilaterais ou contralaterais, <6 cm, EC(-)		
N3a	Metástase em linfonodo >6 cm. EC(-)		
N3b	Metástase em um único linfonodo >3cm, EC(+) Metástase em múltiplos linfonodos com EC (+)		
<i>EC= extravasamento capsular / Nota: Linfonodos na linha média são considerados como ipsilaterais.</i>			
M – METÁSTASES À DISTÂNCIA			
MX	Metástases à distância não puderam ser avaliadas		
M0	Sem metástases à distância		
M1	Presença de metástases à distância		
ESTADIAMENTO			
ESTÁDIO 0	Tis	N0	M0
ESTÁDIO I	T1	N0	M0
ESTÁDIO II	T2	N0	M0
ESTÁDIO III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
ESTÁDIO IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
ESTÁDIO IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
ESTÁDIO IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Metástases (regionais e à distância) agravam o estadiamento e, conseqüentemente, o prognóstico da doença, exigindo tratamentos mais agressivos. O tamanho do linfonodo com metástase e o extravasamento capsular são fatores determinantes para a classificação da neoplasia, sendo que um único linfonodo com metástase maior que 3 centímetros ou com extravasamento capsular já classifica um Estádio IV. A cura dos pacientes em estágio III ou IV gira em torno de 30%, sendo que pacientes com doença metastática sem tratamento possuem uma sobrevida média de 4 meses (1).

Existem evidências de que somente o TNM e grau de diferenciação não são suficientes para se determinar com precisão o risco de recidiva e taxa de sobrevida dos pacientes. Outros fatores como presença de resposta inflamatória e proporção entre massa tumoral e estroma foram associados ao prognóstico da doença; nessa área, algoritmos baseados em aprendizado de máquina com capacidade de avaliar as diferentes variáveis histopatológicas e prever o risco de metástase e recidiva têm sido desenvolvidos (14). O microambiente tumoral, que é alterado conforme a neoplasia evolui, exerce intensa influência no comportamento das células tumorais.

2.2.1 Microambientes de invasão e fatores de crescimento

A habilidade de invadir tecidos e estruturas adjacentes é uma das propriedades que mais afeta a morbidade e mortalidade dos pacientes com câncer. A região da cavidade oral é complexa, com diversas inserções musculares, estrutura óssea, e abundante vascularização e inervação. Quando essas estruturas são invadidas, fornecem um novo microambiente a ser desafiado pelas células tumorais, com diferentes tipos celulares, fatores de crescimento, citocinas e componentes extracelulares (21).

Estima-se que a invasão perineural está presente em 9 a 44% dos casos de CCE oral, sendo que estudos específicos em casos de CCE de língua encontraram 27% e 43,6% dos casos com esse tipo de invasão (22,23). Já a invasão angiolinfática pode variar entre 2% e 52% dos casos de CCE oral, aparecendo em 16% e 23% dos casos de CCE de língua (22,23). A presença de qualquer um dos tipos de invasão está associada a um pior prognóstico e maior chance de desenvolvimento de metástase: cerca de 80% dos pacientes com invasão angiolinfática apresentam

metástases regionais (22), enquanto a invasão perineural foi associada a metástases à distância (23).

Quando as células tumorais invadem o perineuro e bainhas neurais, encontram um microambiente favorável para o seu crescimento, e no caso do CCE de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral, podem crescer ao longo dos nervos, até invadir a base do crânio e se estender intracranialmente (21). O fator de crescimento neural (NGF) está presente nos feixes nervosos, e facilita a invasão perineural através da afinidade com receptores de tirosina-kinase (TrkA), presentes nas células tumorais de CCE oral e outros tipos de câncer (24). Além disso, o NGF parece aumentar a sobrevivência das células tumorais em linhagens celulares de CCE (25).

Conforme descrito anteriormente, a língua e assoalho bucal, especificamente, são intensamente vascularizados, favorecendo a invasão de vasos linfáticos e sanguíneos pelas células tumorais. Além disso, conforme o tumor evolui, as células neoplásicas adquirem a capacidade de secretar fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, notadamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (26–28) e fator de crescimento fibroblástico (FGF)(28), aumentando ainda mais a densidade de vasos na massa tumoral.

2.3 Estrutura do epitélio normal da mucosa oral

A mucosa oral é revestida por epitélio pavimentoso estratificado, com áreas de especialização e diferentes graus de queratinização, conforme a região da cavidade oral. A organização estrutural desse tecido se apresenta com a camada basal na região mais profunda, composta por uma a três camadas de células de aspecto cúbico ou colunar. O estrato seguinte, em direção à superfície, denominado espinhoso, é composto por três a oito camadas de células poliédricas, os queratinócitos, justapostos por meio de intensa adesão mútua. Essa adesão é mantida por diferentes sistemas de adesão associados à membrana plasmática, como junções aderentes, comunicantes e desmossomos, promovendo a coesão e comunicação entre as células (29).

Nas regiões queratinizadas, acima do estrato espinhoso, os queratinócitos possuem um leve achatamento, e apresentam grânulos de querato-hialina, razão pelo qual esse estrato é denominado granuloso. Na região mais superficial, os queratinócitos apresentam um grau ainda maior de achatamento e citoplasma repleto

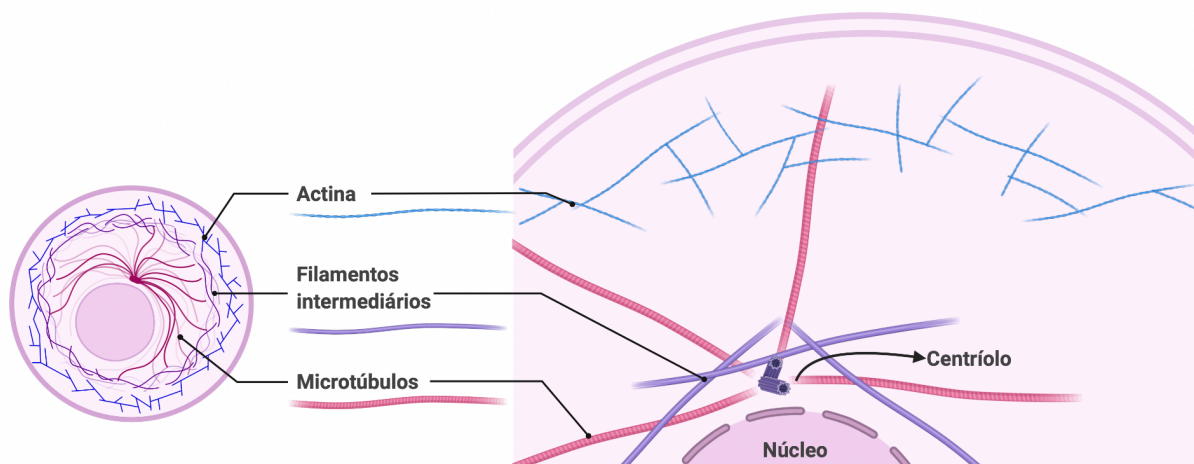
de filamentos de citoqueratinas, compondo o estrato córneo. Esse estrato pode apresentar uma queratinização completa, denominada ortoqueratinizada, ou incompleta, denominada paraqueratinizada, onde é possível identificar os núcleos picnóticos dos queratinócitos mais superficiais. O epitélio estratificado de mucosa não-queratinizada apresenta apenas uma camada superficial de células logo acima do estrato espinhoso (29).

Semelhante aos demais tecidos epiteliais do corpo humano, o epitélio oral é caracterizado por uma intensa proliferação celular, que ocorre na camada basal. Em seguida, as células vão se deslocando gradativamente para a superfície do epitélio, sofrendo um processo de maturação caracterizado pelo acúmulo de filamentos intermediários (29).

2.3.1 Citoesqueleto e filamentos intermediários

A forma tridimensional da célula depende de proteínas estruturais e motoras, que não só mantém a arquitetura tecidual, como também possibilitam movimentos de organelas, vesículas citoplasmáticas, contração celular e até movimentação da célula inteira. Essa estrutura é fundamentada pelo citoesqueleto, que consiste em uma rede complexa de microtúbulos (25nm diâmetro), filamentos de actina (6-8nm de diâmetro) e filamentos intermediários (10nm diâmetro) (30), ilustrada na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Proteínas que compõem a estrutura do citoesqueleto celular



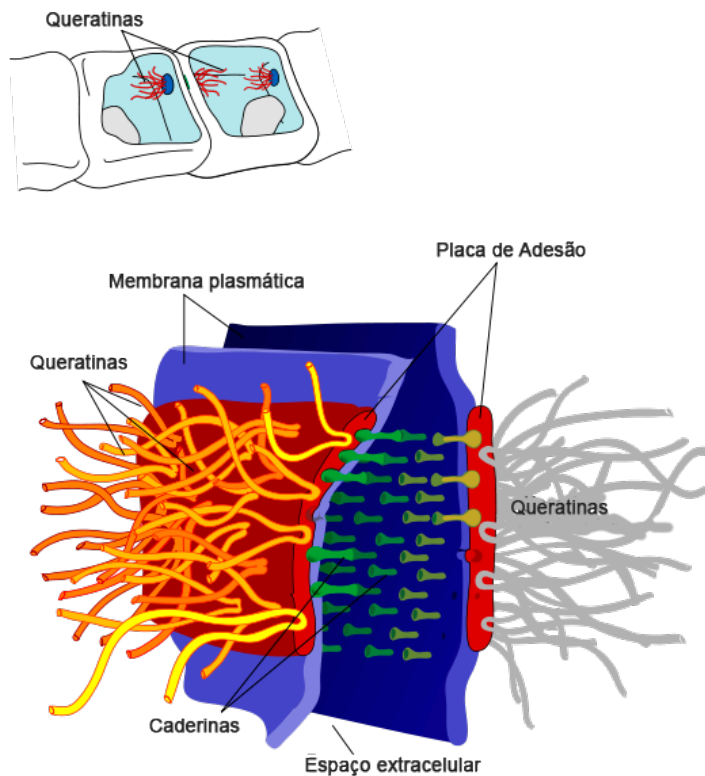
Fonte: adaptado de biorender.com

Os filamentos intermediários (IF) são compostos por diferentes proteínas, de acordo com o tipo celular, mas compartilham uma estrutura comum composta por um domínio central, quatro domínios α -helicoidais e dois domínios terminais não helicoidais. Sua classificação é organizada em famílias: Tipo I e II incluem as citoqueratinas, IF característicos do tecido epitelial; Tipo III inclui a vimentina (células de origem mesenquimal), desmina (células musculares), GFAP (células gliais) e periferinas (sistema nervoso periférico); Tipo IV inclui as proteínas dos neurofilamentos (NF-L, NF-M e NF-H) e α -internexina; Tipo V inclui as lamininas (envolpe nuclear) e o Tipo VI inclui a nestina (embriogênese) (31).

Os filamentos intermediários possuem um comportamento dinâmico, interagindo com outras proteínas intra e extracelulares, atuando como importantes mediadores de sinalização celular. Essas interações podem levar à reorganização, solubilização ou mesmo colapso do citoesqueleto celular (31).

Além de compor o citoesqueleto, os IF também fazem parte do sistema de adesão celular por desmossomos nas células epiteliais. O desmossomo é uma estrutura de adesão complexa que se liga na placa de ancoragem do citoplasma, na qual as citoqueratinas e outros filamentos se aderem fortemente (Figura 2.3) (18,20).

Figura 2.3 – Desmossomo e suas estruturas



Fonte: adaptado de <http://commons.wikimedia.org/>

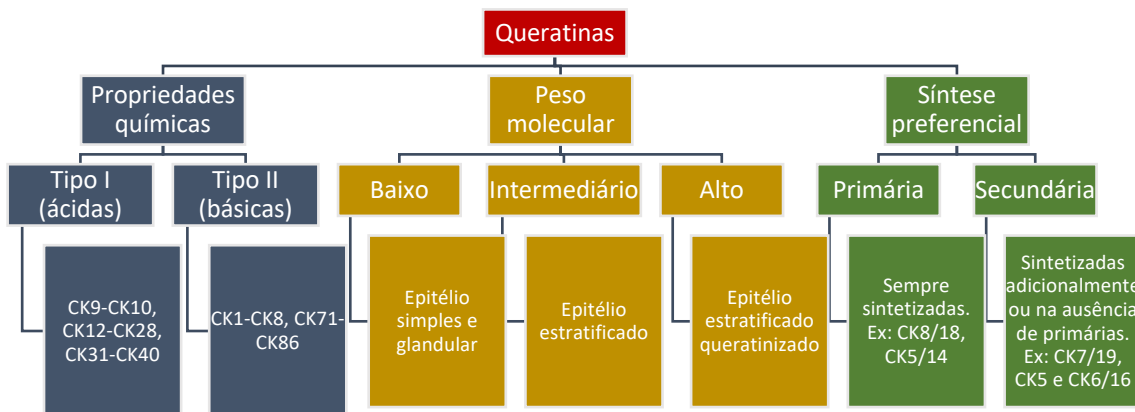
2.3.2 Citoqueratinas

As citoqueratinas (CKs) são o grupo de proteínas mais expressivo de filamentos intermediários, e foram inicialmente catalogadas por Moll et al (32). Seu peso molecular varia de 40 a 70 kDa, sendo componentes fundamentais e exclusivos das células epiteliais, em todos os tipos de epitélio (simples, glandular, estratificado). As CKs fundamentam estruturalmente o citoesqueleto celular, e possuem participação essencial na embriogênese e diferenciação epitelial terminal. São proteínas com alta especificidade, sendo que cada tipo de epitélio apresenta um padrão característico de expressão das CKs de acordo com suas demandas funcionais (33).

As citoqueratinas promovem um arcabouço que mantém a estrutura tridimensional do tecido epitelial, a fim de resistir ao estresse mecânico, manter a integridade e resiliência tecidual, polarização celular e proteção contra variações de pressão hidrostática. Também possuem função na estabilização celular, sinalização, transporte, modulação da síntese de proteínas, atividade mitótica e apoptótica e reparo tecidual, participando fortemente na expressão e ativação de mediadores inflamatórios e imunes (30,34).

Estruturalmente, as citoqueratinas formam filamentos heteropoliméricos compostos pelo pareamento de moléculas do tipo I (ácidas) e tipo II (básicas). Na espécie humana existem 54 genes de citoqueratinas, que se expressam em um padrão específico de acordo com o tipo de epitélio e estágio de diferenciação celular (18,35). Elas recebem diferentes critérios de classificação, que estão resumidas na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Diferentes critérios de classificação das citoqueratinas



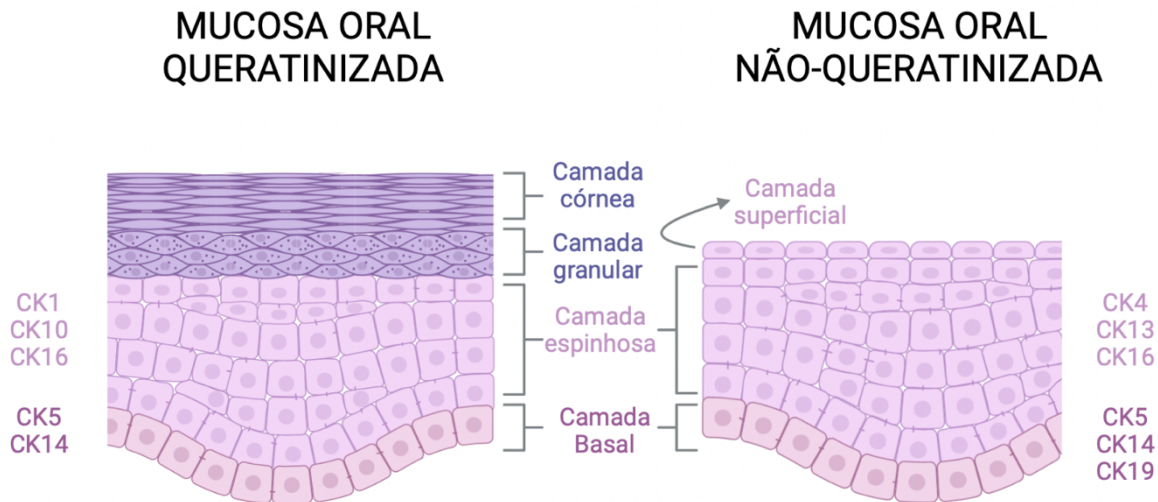
Fonte: adaptado de: Rao et al. (35)

Existem células epiteliais que apresentam uma composição simples de citoqueratinas, como por exemplo os hepatócitos, que expressam apenas a CK18 (tipo I) e CK8 (tipo II). Outros tipos de células epiteliais apresentam um padrão complexo e variado dessas proteínas, que varia conforme a localização da célula e grau de diferenciação, como o epitélio estratificado da mucosa oral (30,33).

As citoqueratinas primárias são produzidas regularmente, enquanto as secundárias são produzidas adicionalmente às primárias de acordo com a localização da célula ou sua demanda funcional. Na mucosa oral, as CKs 5/14 formam o principal par primário presente nos queratinócitos do epitélio estratificado e possuem grande importância funcional na estabilidade física do tecido(18). As citoqueratinas secundárias variam conforme a região da cavidade oral: regiões queratinizadas expressam as CKs 1, 10 e 16 e regiões não queratinizadas apresentam as CKs 4 e

13 e CK19 na camada basal (Figura 2.5) (30,34). O epitélio mastigatório, que envolve a mucosa do palato duro e epitélio gengival, expressa especificamente a CK76 (18,35).

Figura 2.5 - Variação na expressão das citoqueratinas de acordo com as camadas do epitélio queratinizado e não queratinizado



Fonte: adaptado de biorender.com

As citoqueratinas têm participação fundamental no processo de migração das células epiteliais, que pode ocorrer em situações fisiológicas, como no processo de embriogênese e reparo tecidual, ou patológicas, como no caso dos tumores malignos. Essa interação acontece por meio da ativação de processos fosforilativos que levam à uma reorganização do citoesqueleto, com o colapso das CKs próximas ao núcleo e consequente expansão citoplasmática. Além disso, as citoqueratinas possuem uma interação funcional com os filamentos de actina, responsáveis pela motilidade celular. Essa interação ocorre por meio das proteínas da família das plaquininas, que também promovem a integração da célula com outras células e com a matriz extracelular (30).

Alterações no padrão de expressão das citoqueratinas podem desencadear mudanças na expressão de genes e proteínas, bem como modificarem o comportamento celular nos processos dos quais participam (5,18,33). Esses aspectos ainda permanecem por serem elucidados. Traumas crônicos, infecções, mutações genéticas e neoplasias são alguns dos fatores que podem alterar o padrão normal de expressão das CKs do epitélio (34).

2.4 Citoqueratinas e CCE oral

No processo de carcinogênese, as células sofrem modificações moleculares que se traduzem também em mudanças fenotípicas. No CCE, essas mudanças podem refletir em alterações nos sistemas de adesão, levando à perda da coesão celular. Em CCEs bem diferenciados, é comum as células tumorais depositarem citoqueratinas de maneira concêntrica, o que forma as chamadas pérolas de queratina (34).

Apesar das mudanças fenotípicas, moleculares e funcionais, acredita-se que células de tumores malignos epiteliais tendem a manter o padrão de expressão das citoqueratinas no citoesqueleto semelhante ao do epitélio de origem. Em geral, carcinomas originados em epitélios simples mantêm a expressão das citoqueratinas primárias CK7 e CK20, e são negativos para CK5/14; em carcinomas de origem em epitélio estratificado ocorre o oposto (33). Por esse motivo as citoqueratinas são o padrão-ouro para diagnóstico imunohistoquímico e classificação de carcinomas, bem como para diagnóstico de metástases indefinidas. Uma das principais características das citoqueratinas que as torna particularmente úteis no diagnóstico é a sua relativa estabilidade, mesmo após o desenvolvimento de processos patológicos e processamento de amostras por diferentes técnicas (33,35). No Quadro 2.3 estão listadas as principais citoqueratinas presentes na cavidade oral, bem como sua expressão nos tecidos normais e nos tumores malignos de origem epitelial (22,24).

Quadro 2.3 – Expressão de citoqueratinas na cavidade oral

Citoqueratina	Expressão em tecidos normais	Expressão em tumores malignos epiteliais	Referências
CK5/14	Camada basal da mucosa oral e epiderme Células mioepiteliais de glândulas salivares	Carcinoma de células escamosas Mesotelioma Carcinoma de células basais Carcinoma de células de transição Células com diferenciação escamosa em adenocarcinomas	(6,18,33,36)
CK7	Ductos e ácinos de glândulas salivares Epiderme	Tumores malignos de glândula salivar Carcinoma de células escamosas de orofaringe HPV+	(18,35–39)
CK10	Queratinócitos da mucosa queratinizada e epiderme	Focalmente e em pérolas córneas em carcinoma de células escamosas	(18,40–42)
CK13	Queratinócitos da mucosa não queratinizada	Expressão variada em carcinoma de células escamosas	(18,37,43,44)
CK16	Queratinócitos hiperproliferativos Mucosa e epiderme em processo de reparo Ductos de glândulas salivares	Expressão variada em carcinoma de células escamosas	(11,18,41)
CK18/19	Glândulas salivares	Tumores malignos de glândula salivar Expressão variada em carcinoma de células escamosas	(18,33,35,36,45–50)

Fonte: A autora.

2.4.1 CK 5/14

As CKs 5 e 14 são as citoqueratinas primárias do epitélio estratificado, e são expressas com maior intensidade nas células indiferenciadas da camada basal, perdendo intensidade ao longo das camadas do epitélio. Possuem função importante na estabilidade física desse tecido, sendo também expressas em tecidos glandulares e células mioepiteliais (18).

Em tumores malignos, a CK5 aparece na maioria dos casos de mesotelioma, CCE, carcinoma de células basais e carcinoma de células de transição. Em adenocarcinomas sua expressão aparece apenas focalmente em células com diferenciação escamosa. Já a CK14 é expressa na maioria dos casos de CCE e

carcinoma de células basais, sendo ausente em adenocarcinoma(18). Contudo sua expressão é observada em alguns tumores de glândula salivar e de glândula tireóide (33).

A expressão das CKs 5/14 nos tumores parece ser semelhante aos padrões no epitélio normal, aparecendo com expressão mais intensa nas camadas externas das formações de células tumorais, correspondendo à sua expressão basal no epitélio estratificado normal. São utilizadas como biomarcadores padrão-ouro do CCE, auxiliando no diagnóstico em casos de CCE pouco diferenciados e na identificação de micrometástases em linfonodos (6,18).

Estudos sugerem que as CK5/14 podem ter um efeito inibitório nos mecanismos de invasão pelas células tumorais, embora a CK14 pareça ser necessária no processo de migração celular coletiva (36).

2.4.2 CK 7

A CK7 é uma citoqueratina secundária de epitélio simples, em alguns tecidos fazendo par com a CK19. Sua expressão é observada na pele, epitélio renal e alguns epitélios glandulares, sendo ausente no trato digestivo(18). Na cavidade oral aparece em abundância no epitélio dos ductos e ácinos de glândulas salivares, sendo pouco identificada no epitélio estratificado da mucosa (35,37).

Em neoplasias epiteliais, sua expressão é marcante em adenocarcinomas, com exceção dos adenocarcinomas gástricos, onde aparece apenas em um pequeno número de casos. CCEs de pele geralmente são negativos para CK7, mas CCEs de origem em epitélios não queratinizados podem expressar essa citoqueratina, notadamente os de colo uterino (33).

Na cavidade oral, a CK7 aparece em tumores de glândula salivar(33,35). Sua expressão em CCE oral em geral foi descrita como negativa(18,35), sendo que um estudo associou a expressão da CK7 positiva com casos de CCE de orofaringe HPV+(38) e outro estudo apontou um aumento na sua expressão em casos avançados (39). Não existem outros estudos analisando especificamente a expressão CK7 em CCEs da cavidade oral.

2.4.3 CK 10

A CK10 é um marcador de diferenciação terminal dos queratinócitos(18). Sua expressão é observada nas camadas superficiais (suprabasal) do epitélio estratificado queratinizado da mucosa oral e epiderme (18,40,41).

Essa proteína, em geral, aparece focalmente em carcinomas de células escamosas, notadamente em pérolas córneas (18). A expressão de CK10 já foi relacionada com o desfecho do CCE oral (morte/remissão), a presença de metástases, o estadiamento clínico e o grau histológico. Por ser uma proteína de diferenciação epitelial terminal, possui intensa relação com os sistemas de adesão celular, abundantes em queratinócitos normais. Por esse motivo, sua expressão em células neoplásicas impede que essas células adquiram a capacidade de se separar do tumor primário, iniciando o processo de migração e metástase (41,42). Autores também correlacionam a expressão da CK10 com o tamanho de CCEs da mucosa oral (51).

Um estudo descreveu a expressão de CK10 em um padrão que diminui gradativamente proporcionalmente ao acúmulo de alterações displásicas das células escamosas da mucosa oral. O desaparecimento gradual de CK10 foi detectado em todo o epitélio atípico, sendo que os autores consideraram a CK10 como um possível biomarcador para a detecção precoce do carcinoma de células escamosas da cavidade oral (41). Outro estudo descreveu a expressão da CK10 como característica de CCEs orais bem diferenciados (5).

2.4.4 CK 13

A CK13 (em conjunto com CK4) é um marcador específico do epitélio escamoso estratificado de mucosas internas não-queratinizadas, não sendo expressa na epiderme. Na cavidade oral, essa citoqueratina é presente nas camadas suprabasais da mucosa não queratinizada, sendo totalmente ausente na mucosa queratinizada (18).

Interessantemente, apesar de ser uma CK básica da mucosa, a expressão dessa citoqueratina não se mantém nos CCEs de cabeça e pescoço(18). Especificamente no CCE oral, os resultados ainda são controversos, com estudos utilizando diferentes técnicas apontando tanto uma redução na sua expressão, quanto

expressão semelhante ao epitélio normal. A expressão também parece variar de acordo com a localização do tumor primário (37). A perda da expressão da CK13 em CCE de língua foi associada à recorrência local (43) e pior prognóstico (44).

2.4.5 CK 16

A CK16, especificamente, está presente em queratinócitos hiperproliferativos do epitélio estratificado. Estudos experimentais mostram que as CK6 e CK16 são expressas nos queratinócitos da pele durante o processo de reparo de lesões, imediatamente antes da migração e regeneração tecidual. Essa citoqueratina também aparece em algumas estruturas glandulares, como ductos (18).

No CCE foi relatada sua expressão em camadas de células na região mais central do tumor, onde as células neoplásicas estão em processo de multiplicação e maturação. Em adenocarcinomas possui baixa expressão, exceto pelos de colo uterino e adenocarcinomas de mama invasivos (18).

A expressão da CK16 no CCE oral é controversa, sendo reportada tanto ausência de expressão dessa proteína (41), quanto sua expressão associada a uma melhor taxa de sobrevida (11).

2.4.6 CK18 e CK19

A CK18 é uma das citoqueratinas primárias do epitélio simples, formando par com a CK8, sendo as primeiras CKs a surgirem na embriogênese(18). Essa citoqueratina possui também função importante na regulação do ciclo celular. A CK19 é a menor citoqueratina, sendo uma das secundárias do epitélio simples, com expressão principalmente em ductos (18).

No epitélio estratificado não-queratinizado, as CK8, CK18 e CK19 podem ser expressas focalmente na camada basal, mas são ausentes em queratinócitos normais diferenciados(18,35,45). A expressão da CK19 é negativa nos queratinócitos da mucosa oral normal, com positividade observada no epitélio displásico e em processos inflamatórios (46).

As CK18 e 19 são frequentemente utilizadas como marcadores para identificar tumores de origem em epitélio simples, não sendo observada em tumores de origem em epitélio estratificado (33).

As CK8/18 podem se expressar na carcinogênese, mimetizando o comportamento de expressão dessas citoqueratinas durante a embriogênese(35). Estudos experimentais em cultura de células epiteliais demonstraram que a indução na expressão das CK8/18 leva à mudança de fenótipo das células do epitélio estratificado, resultando na sua transformação maligna (48). É comum observar a expressão de CK18 e CK19 em vários tipos de adenocarcinomas (18,47) e em CCEs pouco diferenciados (18). Fragmentos proteicos de CK18 e CK19 no sangue têm sido utilizados para diagnóstico e monitoramento de alguns tipos de câncer (18).

Apesar de já terem sido observadas associações entre a expressão das CKs 18 e 19 e a disseminação metastática, essas citoqueratinas parecem ter um efeito inibitório na migração e invasão de células tumorais em vários tipos de câncer (36).

Estudos sugerem que a expressão das CKs 8/18 e 19, que ocorre em alguns casos específicos de CCE, pode ter relação com uma maior hipóxia e maior desregulação do ciclo celular (5), e em CCE de língua, especificamente, a expressão das CKs 18 e 19 foi associada a um pior prognóstico da doença (49,50).

Dado o seu envolvimento em tantos processos celulares fundamentais, alterações nos padrões de expressão das citoqueratinas observadas em células tumorais se traduzem não só em mudanças fenotípicas e estruturais, mas também em alterações em diversos mecanismos celulares. Além disso, o citoesqueleto faz a conexão entre o ambiente extra e intracelular, sendo que estímulos, interações e fatores presentes nos diferentes microambientes desafiados pelas células tumorais nos processos de invasão e metástase promovem em resposta remodelações estruturais do citoesqueleto e sistemas de adesão, e importantes modificações nos diferentes processos mediados pelas citoqueratinas. Por esse motivo, as citoqueratinas e outras proteínas do citoesqueleto tem sido alvo de pesquisa para o desenvolvimento de novas e promissoras terapias antimetastáticas (36).

Levando em consideração todos esses dados, o presente estudo visa responder às seguintes perguntas: existe uma alteração no padrão de expressão das citoqueratinas pelas células do CCE da cavidade oral no processo de invasão tumoral? O padrão de expressão das citoqueratinas das células tumorais está associado a variáveis clínicas, histopatológicas e prognósticas da doença?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Analisar o padrão de expressão das citoqueratinas CK5, CK7, CK10, CK13, CK14, CK16, CK18 e CK19 no processo de invasão tumoral do carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal.

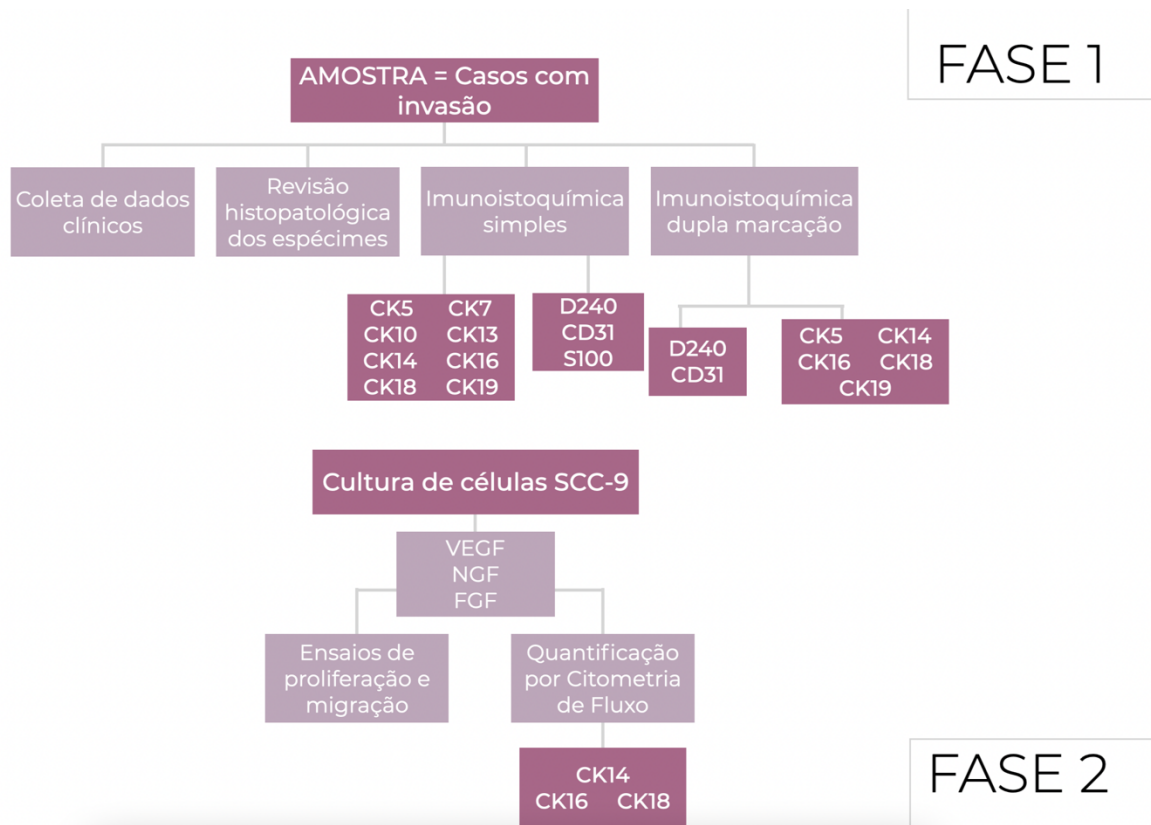
3.2 Objetivos específicos

- Analisar e detalhar o padrão de expressão de diferentes citoqueratinas em casos com invasão linfática, vascular e perineural, por meio da técnica de imunistoquímica;
- Analisar o padrão histológico da frente de invasão e verificar possíveis associações com os aspectos clínicos e evolução da doença;
- Análise imunistoquímica comparativa das citoqueratinas entre o tumor primário e metástases regionais;
- Realizar estudos exploratórios *in vitro* simulando microambientes dos diferentes tipos de invasão, observando alterações no comportamento celular e expressão de citoqueratinas;
- Buscar possíveis associações entre os aspectos epidemiológicos, clínicos e evolução da doença e a expressão das citoqueratinas analisadas.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O estudo foi desenhado em duas fases, com análise da casuística e análise *in vitro*, conforme ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Desenho do estudo



Fonte: A autora.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP) e aprovado pelo parecer número 3.565.457, com cópia contida no Anexo A.

4.1 Casuística

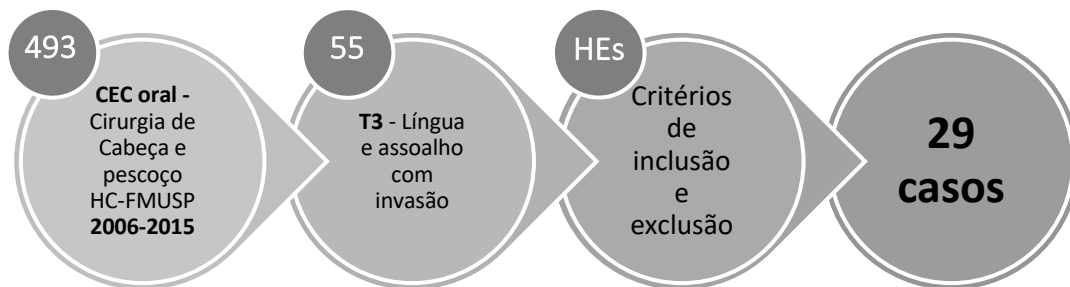
Inicialmente, foi feito o levantamento de todos os casos de CCE oral operados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMUSP no período de 2009 a 2015, totalizando 493 casos. Foram selecionados todos os casos T3 de CCE de língua com invasão linfática descrita no relatório anatomopatológico, totalizando 15 casos. Para ampliar o número da amostra foi decidido incluir casos de neoplasias T3 de

assoalho bucal, por ser uma região anatomicamente relacionada com a língua e com rica drenagem linfática e vascularização. Com isso o levantamento totalizou 55 casos, com seus respectivos dados clínicos.

Foram solicitadas as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) a fim de selecionar os blocos parafinados das peças cirúrgicas que apresentassem os critérios de inclusão: presença de carcinoma de células escamosas com invasão angiolinfática e perineural. O critério de exclusão foi quantidade de material insuficiente para o estudo. Além das peças cirúrgicas, também foram selecionados blocos de linfonodos cervicais com metástases.

Dos 55 casos selecionados, 26 casos não possuíam material disponível ou suficiente para as análises, totalizando uma amostra final de 29 tumores primários e 20 linfonodos com metástases, conforme ilustrado na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Fluxograma da casuística



Fonte: A autora.

4.2 Análise histológica descritiva

As lâminas coradas por HE foram examinadas ao microscópio de luz e classificadas quanto ao padrão da frente de invasão (coesiva e não coesiva), tipos de invasão presentes (linfática, vascular, perineural, outras estruturas) e grau de diferenciação das células tumorais (bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas, pouco diferenciadas).

4.3 Imunoistoquímica

Todos os casos foram submetidos a reação de imunoistoquímica. Foram realizadas reações de imunoistoquímica para cada um dos marcadores nos tumores primários e linfonodos com metástases. Os detalhes dos anticorpos primários utilizados, procedência e clones, controles e título de utilização estão descritos no Quadro 4.1, e o protocolo utilizado foi o seguinte:

Quadro 4.1 - Anticorpos e padronização para imunoistoquímica simples

Anticorpo	Fabricante/Clone	Controle	Título
CK5	Cell Marque (EP1601Y)	Tonsila/Pele	1:200
CK7	Cell Marque (OV-TL 12/30)	Rim	1:200
CK10	Cell Marque (EP97)	Pele	1:100
CK13	Abcam	Pele	1:100
CK14	Cell Marque (LL002)	Tonsila/Pele	1:200
CK16	Abcam	Tonsila/Pele	1:100
CK18	Abcam (DC10)	Fígado	1:50
CK19	Novocastra (B170)	Estômago	1:50
CD31	Dako (JC70A)	Rim	1:40
D2-40	Dako (D2-40)	Linfangioma	Pré-diluído
S-100	Dako	Rim	Pré-diluído

Fonte: A autora.

A reação se iniciou pela desparafinização, reidratação e recuperação dos epítomos antigênicos por imersão em solução específica (Trilogy™ - Cell Marque, 6600 Sierra College Blvd. Rocklin, CA 95677 USA, ref. 920P-06), em *steamer* por 60 minutos, com resfriamento de 5 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagens em água corrente e destilada. Em seguida realizou-se bloqueio da peroxidase endógena tecidual em dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes no escuro e lavagens em água corrente, água destilada e banho em PBS. Procedeu-se à incubação do primeiro anticorpo primário, com as concentrações descritas no Quadro 4.1, em câmara úmida e escura em temperatura ambiente por 1h, seguida de lavagens em solução tampão Tris HCl pH 7,4.

A reação continuou com a aplicação do anticorpo secundário - sistema Novolink® (Novocastra, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Ref. RE7159/RE7161) para coloração final castanho/DAB, sendo: incubação Post Primary Block por 30 minutos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente, duas lavagens de 5 minutos cada em solução Tris HCl pH 7,4 e incubação Polymer por 30 minutos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente, seguida de lavagens em solução Tris HCl pH 7,4. A

revelação da reação foi realizada por meio do cromógeno diaminobenzidina – DAB (DAB Substrate Kit - Cell Marque, 6600 Sierra College Blvd. CA95677 USA) que evidenciou a reação por meio de coloração acastanhada, de acordo com protocolo do fabricante (1ul de cromógeno para 50ul de buffer), seguida de lavagens em água corrente e destilada.

A contra-coloração das reações foi realizada com hematoxilina de *Carazzi* filtrada por 3 minutos, seguida de lavagens em água corrente e água destilada. A desidratação dos cortes foi realizada em cadeia ascendente de álcoois (50%, 80%, 95% e 3x100%) em banhos de 2 minutos em cada, seguida da diafinização em 3 banhos de xilol, por 2 minutos em cada. Para finalizar, os espécimes foram conservados com resina Permount (SP15-500 Fisher Chemicals, Fair Lawn, New Jersey, USA) sob uma lamínula de vidro, para serem visualizados em microscópio de luz.

4.4 Imunoistoquímica dupla marcação

Para as reações de imunoistoquímica dupla marcação, foram utilizados os marcadores D2-40 para vasos linfáticos e CD31 para vasos sanguíneos, em conjunto com anticorpos para as citoqueratinas que apresentaram maiores alterações em sua expressão na análise da imunoistoquímica: CK5, CK14, CK16, CK18, CK19.

O protocolo utilizado para dupla marcação foi:

A reação se iniciou pela desparafinização, reidratação e recuperação dos epítomos antigênicos por imersão em solução específica (Trilogy™ - Cell Marque, 6600 Sierra College Blvd. Rocklin, CA 95677 USA, ref. 920P-06), em *steamer* por 60 minutos, com resfriamento de 5 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagens em água corrente e destilada. Em seguida procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena tecidual em dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes no escuro e lavagens em água corrente, água destilada e banho em PBS. A incubação do primeiro anticorpo primário foi realizada de acordo com as informações do Quadro 4.2, em câmara úmida e escura em temperatura ambiente por 1h, seguida de lavagens em solução tampão Tris HCl pH 7,4.

A reação continuou com a aplicação do anticorpo secundário - sistema Novolink® (Novocastra, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Ref. RE7159/RE7161) para coloração final castanho/DAB, sendo: incubação Post Primary Block por 30 minutos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente, duas lavagens de 5 minutos cada em solução Tris HCl pH 7,4 e incubação Polymer por 30 minutos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente, seguida de lavagens em solução Tris HCl pH 7,4. A revelação foi feita pelo cromógeno diaminobenzidina – DAB (DAB Substrate Kit - Cell Marque, 6600 Sierra College Blvd. CA95677 USA), que evidencia a reação por meio de coloração acastanhada, de acordo com protocolo do fabricante (1ul de cromógeno para 50ul de buffer), seguida de lavagens em solução tampão Tris HCl pH 7,4.

Em seguida, o segundo anticorpo primário foi aplicado aos cortes, sendo mantidos por 16 horas em câmara úmida e escura à 4°C, seguida de lavagens em solução Tris Hcl pH7,4. Procedeu-se à aplicação do sistema de revelação por fosfatase alcalina (Envision G2 - Dako, ref. K5355) de coloração vermelha, sendo: incubação Rabbit/mouse (Link-1) por 30 minutos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente, lavagem em solução TrisHcl pH7,4 - dois banhos de 5 minutos cada e incubação Ap enzyme (Enhancer-2) por 30 minutos em câmara úmida e escura em temperatura ambiente, seguida de lavagens em solução Tris Hcl pH7,4. A revelação é feita com o cromógeno e *substrate buffer* do kit citado, conforme protocolo do fabricante (1ul do cromógeno e 3ul de *Levamisole* para 100ul de *substrate buffer*), seguida de lavagens em água corrente e água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de *Carazzi* filtrada por 3 minutos, lavagens em água corrente e água destilada, secagem das lâminas em temperatura ambiente e montagem das lamínulas em resina *permount* para o exame ao microscópio de luz.

Quadro 4.2 - Anticorpos e padronização para dupla marcação

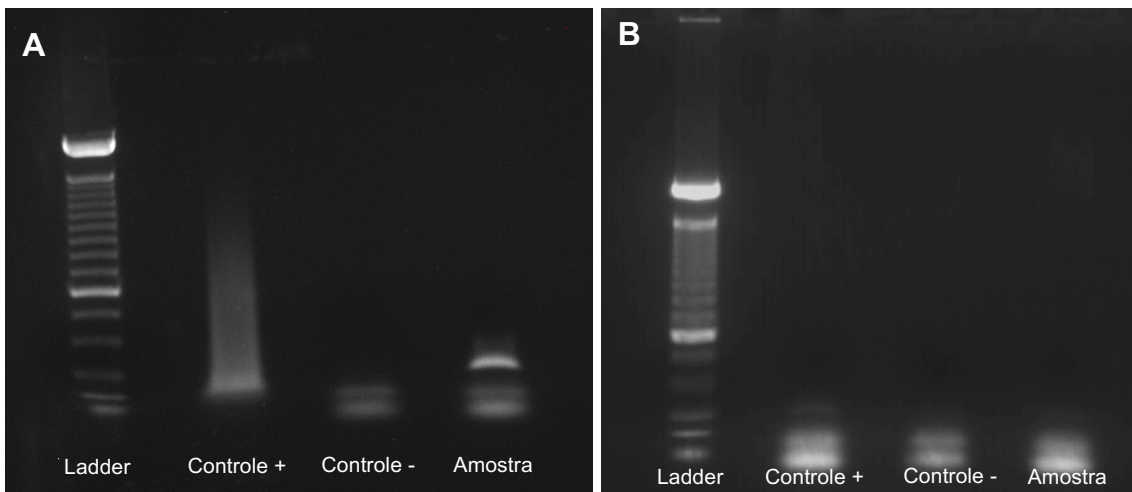
Anticorpo	Fabricante/Clone	Controle	Concentração
CK5	Cell Marque (EP1601Y)	Tonsila/Pele	1:50
CK14	Abcam (LL002)	Tonsila/Pele	1:50
CK16	Abcam	Tonsila/Pele	1:50
CK18	Abcam (DC10)	Fígado	1:50
CK19	Novocastra (B170)	Estômago	1:50
CD31	Dako (JC70A)	Rim	1:40
D2-40	Dako (D2-40)	Linfangioma	Pré-diluído

Fonte: A autora.

4.5 Cultura celular

Foram utilizadas células de carcinoma de células escamosas de língua de linhagem SCC-9, gentilmente doadas pela profa. Dra. Ana Paula Lepique (ICB-USP). Procedeu-se ao teste para detecção de Micoplasma, utilizando o kit MycoScope PCR Mycoplasma Detection Kit (Uniscience, ref. MY01050). Inicialmente o teste foi positivo (Figura 4.5.1 - A). Com o objetivo de se eliminar a infecção, as células foram tratadas com Plasmocin™ (Invivogen, ref. ant-mpt) a 0,5µl por ml em dias alternados por 10 dias. O teste foi repetido e conforme resultado negativo, (Figura 4.3 - B), foi feito o processo de autenticação celular, utilizando o kit Kit GenePrint® 10 System for human cell line authentication (Promega, ref. B9510), com resultado de 89% (DSMZ) de similaridade com a linhagem SCC-9 de acordo com o banco de dados da ATCC (TH01: 8,9 D5S818: 12,12 D13S317: 9,9 D7S820: 10,11 D16S539: 10,11 CSF1PO: 11,11 vWA: 17,17 Amel: X,X).

Figura 4.3 – Resultados dos PCRs para micoplasma



Fonte: A autora.

As células foram cultivadas em uma mistura 1:1 de meio DMEM e meio Ham's F12 (ThermoFisher, ref. 11330057), suplementado com 10% de soro fetal bovino (ThermoFisher, ref. 12657029), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (ThermoFisher, ref. 15140122), em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 48h, os ensaios foram feitos quando a

confluência atingiu 80% e a contagem das células foi feita utilizando-se a câmara de Neubauer.

4.5.1 Ensaio de migração celular

A fim de se analisar o comportamento migratório e fenótipo das células frente aos diferentes microambientes, foi realizado um ensaio de cicatrização de feridas (*scratch*) em duas placas de 24 poços, utilizando três concentrações dos fatores de crescimento FGF, NGF e VEGF (10ng/ml, 20ng/ml e 40ng/ml) e controles (meio e veículos), em triplicatas, conforme ilustrado na Figura 4.3. Os fatores de crescimento foram preparados conforme as instruções do fabricante, utilizando diferentes veículos para diluição, com os dados detalhados no Quadro 4.3.

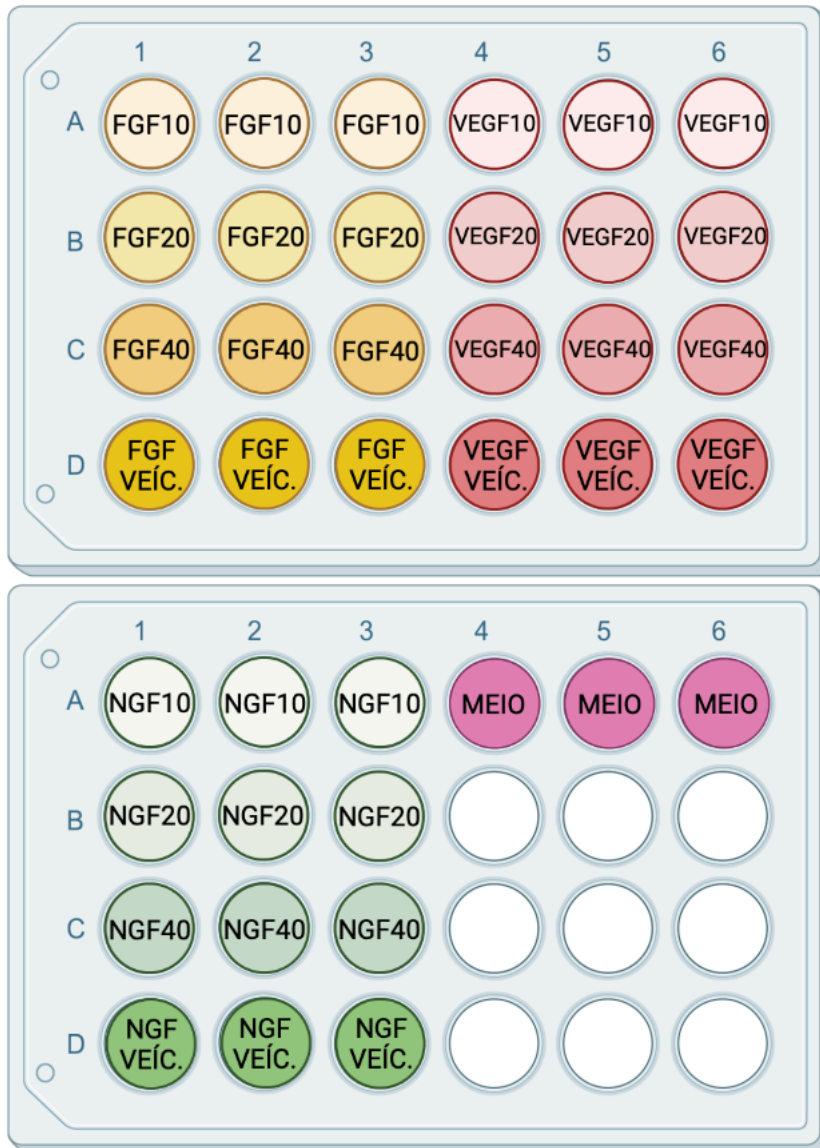
Quadro 4.3 – Fatores de crescimento utilizados e veículos de diluição

Fator de crescimento	Fabricante e Referência	Veículo
FGF	Sigma-Aldrich (N1408)	PBS
NGF	Sigma-Aldrich (F0291)	Tris 20mM pH 7.0
VEGF	Sigma-Aldrich (V7259)	Água ultrapura

Fonte: A autora.

Foram semeadas 4×10^4 células por poço, e após a confluência total (48h) foi feita uma ferida com ponteira estéril de 200 μ l em cada poço, seguindo o protocolo descrito por Liang et al(52). O meio de cultura foi aspirado e foram adicionados os fatores de crescimento e controles, conforme ilustrado na Figura 4.4. Para evitar interferências no metabolismo celular, utilizou-se o meio com concentração reduzida de SFB (0,1%) e sem agentes antimicrobianos. Os poços foram fotografados no momento inicial do experimento e após 3h, 6h, 24h e 27h.

Figura 4.4 – Desenho do ensaio de migração celular



Fonte: adaptado de biorender.com

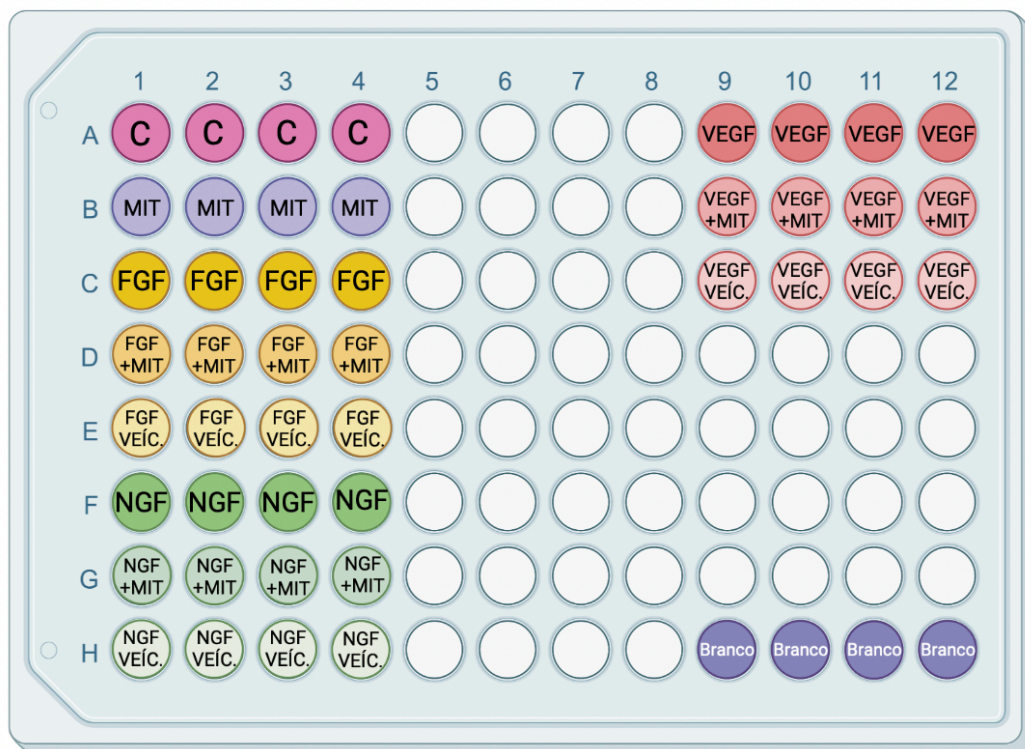
4.5.2 Ensaio de proliferação celular

A fim de se analisar o comportamento proliferativo das células frente aos diferentes microambientes, foi realizado um ensaio de proliferação celular, avaliado nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h. Foram utilizadas 5 placas de 96 poços, com a concentração intermediária (20ng/ml) dos fatores de crescimento FGF, NGF e VEGF, já detalhados anteriormente no Quadro 4.3. Foram semeadas 2×10^4 células por poço em quadruplicatas para cada fator, controles (meio, meio+agente antiproliferativo e veículos) e cada um dos fatores+agente antiproliferativo, conforme

ilustrado na Figura 4.5. Para se evitarem interferências no metabolismo celular, utilizou-se o meio com concentração reduzida de SFB (0,1%) e sem agentes antimicrobianos.

Os poços destinados ao agente antiproliferativo receberam o pré-tratamento com o agente Mitomycin C (Sigma Aldrich, ref. M0503), a 10ug/ml, incubado por 1h a 37°C antes do experimento. Após os tempos determinados (0h, 24h, 48h, 72h e 96h), os poços receberam o reagente de viabilidade celular PrestoBlue™ (ThermoFisher, ref. P50200), na concentração 1:10, com quatro poços “brancos” para controle da autofluorescência da placa, a ser subtraída das medidas. As placas foram incubadas por 2h a 37°C, e em seguida congeladas a -20°C. Após todos os ensaios, as placas foram descongeladas e feita a contagem das células viáveis por fluorescência no leitor de microplacas Glomax Plus® (ProMega, EUA).

Figura 4.5 – Desenho do ensaio de proliferação celular



Fonte: adaptado de biorender.com

4.5.3 Citometria de fluxo

A avaliação da expressão das citoqueratinas pelas células tumorais em diferentes microambientes foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo. O número de 2×10^6 células foi semeado em garrafas de 25cm^2 , e após aderência, foram cultivadas com cada um dos fatores de crescimento descritos anteriormente (FGF, VEGF e NGF) na concentração de 20ng/ml e controle, em meio reduzido (0,1% SFB) e sem agentes antimicrobianos, por 24 e 48 horas. As células foram então tripsinizadas e fixadas com paraformaldeído 2% (incubação 15 minutos em temperatura ambiente, lavagem com PBS e ressuspensão em PBS+2% SFB).

Para análise no citômetro de fluxo, as células foram lavadas com PBS+BSA 0,1%, permeabilizadas com saponina+BSA 0,1% (PermWash™ - BD Sciences, ref. 554722), incubadas por 20 minutos a 4°C com anticorpos primários para CK14, CK16 e CK18 (Quadro 4.4), lavadas com PBS+BSA 0,1%, incubadas com anticorpos secundários por 20 minutos a 4°C e lavadas com PBS+BSA 0,1%. A concentração dos anticorpos primários e secundários encontra-se no Quadro 4.6.3.1. Por fim, a leitura foi feita no citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD, New Jersey), previamente ajustado e calibrado para a linhagem celular analisada. As análises foram realizadas em dois experimentos independentes. Foram realizados testes para citometria com todos os anticorpos das citoqueratinas analisadas neste trabalho, sendo selecionados somente os que obtiveram resultados viáveis nesta técnica, listados no Quadro 4.4.

Quadro 4.4 - Anticorpos e padronização para citometria de fluxo

Anticorpo	Fabricante/Clone	Concentração
CK14	Abcam (LL002)	1:400
CK16	Abcam (EP1615Y)	1:400
CK18	Abcam (DC10)	1:400
Anticorpos secundários		
Alexa Fluor® 657	Abcam (Goat anti-mouse)	1:400
Alexa Fluor® 488	Abcam (Goat anti-mouse)	1:400
Alexa Fluor® 488	Abcam (Goat anti-rabbit)	1:400

Fonte: A autora.

4.6 Avaliação dos resultados

4.6.1 Dados clínico-epidemiológicos dos casos incluídos no estudo

Os dados dos prontuários da amostra selecionada foram tabulados, a fim de serem realizados testes de associação com os dados histopatológicos e imunoistoquímicos, conforme descrito a seguir. Foram colhidos dados referentes a idade do paciente, sexo, sítio do tumor primário, óbito, tamanho do tumor, tabagismo e/ou etilismo relatados, metástases regionais e à distância, extravasamento capsular, recidiva e tempo de sobrevida livre de doença.

4.6.2 Imunoistoquímica

Os casos submetidos à técnica de imunoistoquímica foram avaliados em microscópio de luz por 2 observadores. As reações foram avaliadas de forma semi-quantitativa para cada citoqueratina nos cortes de tumores primários e em focos de metástase nos linfonodos. O padrão de positividade (positivo, negativo e focal) foi aplicado, sendo considerados como positividade focal os casos apresentando até 30% de células tumorais marcadas) e a distribuição da marcação em 10 campos de grande aumento (x400).

Nas lâminas submetidas à técnica imunoistoquímica de dupla marcação os resultados foram observados em regiões de invasão ou em êmbolos neoplásicos, corados pelo anticorpo secundário (D2-40 em vasos linfáticos e CD31 em vasos sanguíneos).

A análise entre a associação da expressão das proteínas e características demográficas, clínicas e histológicas foi realizada utilizando-se o teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p \leq 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 25.0 (SPSS, Chicago, IL).

4.6.3 Cultura celular

4.6.3.1 *Ensaio de migração celular*

As fotos foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.53, National Institutes of Health, USA), e a área das feridas foi medida utilizando a conversão da escala do equipamento fotográfico (2,2 pixels/ μm). Os dados foram tabulados, calculadas as médias para cada concentração, fator e controles, e foi realizado o teste estatístico ANOVA de um fator e testes *post-hoc* (Tukey's HSD), utilizando o software R (ambiente RStudio 2021.09.1+372 "Ghost Orchid" Release). O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p \leq 0.05$.

4.6.3.2 *Ensaio de proliferação celular*

A contagem das células de cada poço foi tabulada e calculadas as médias para cada fator e controles. Foram realizados os seguintes testes: Shapiro-Wilk para verificação de normalidade, testes T e testes de U-Mann Whitney (nos grupos que violaram a normalidade), utilizando o software R (ambiente RStudio 2021.09.1+372 "Ghost Orchid" Release). O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p \leq 0.05$.

4.6.3.3 *Citometria de fluxo*

Foram avaliadas a frequência de células positivas (em porcentagem) e a intensidade média de fluorescência em unidades arbitrárias (MFI). O *gate* foi determinado utilizando a estratégia de análise baseada em SSC versus CK+. As análises foram feitas utilizando o software FlowJo (Versão 10).

5 RESULTADOS

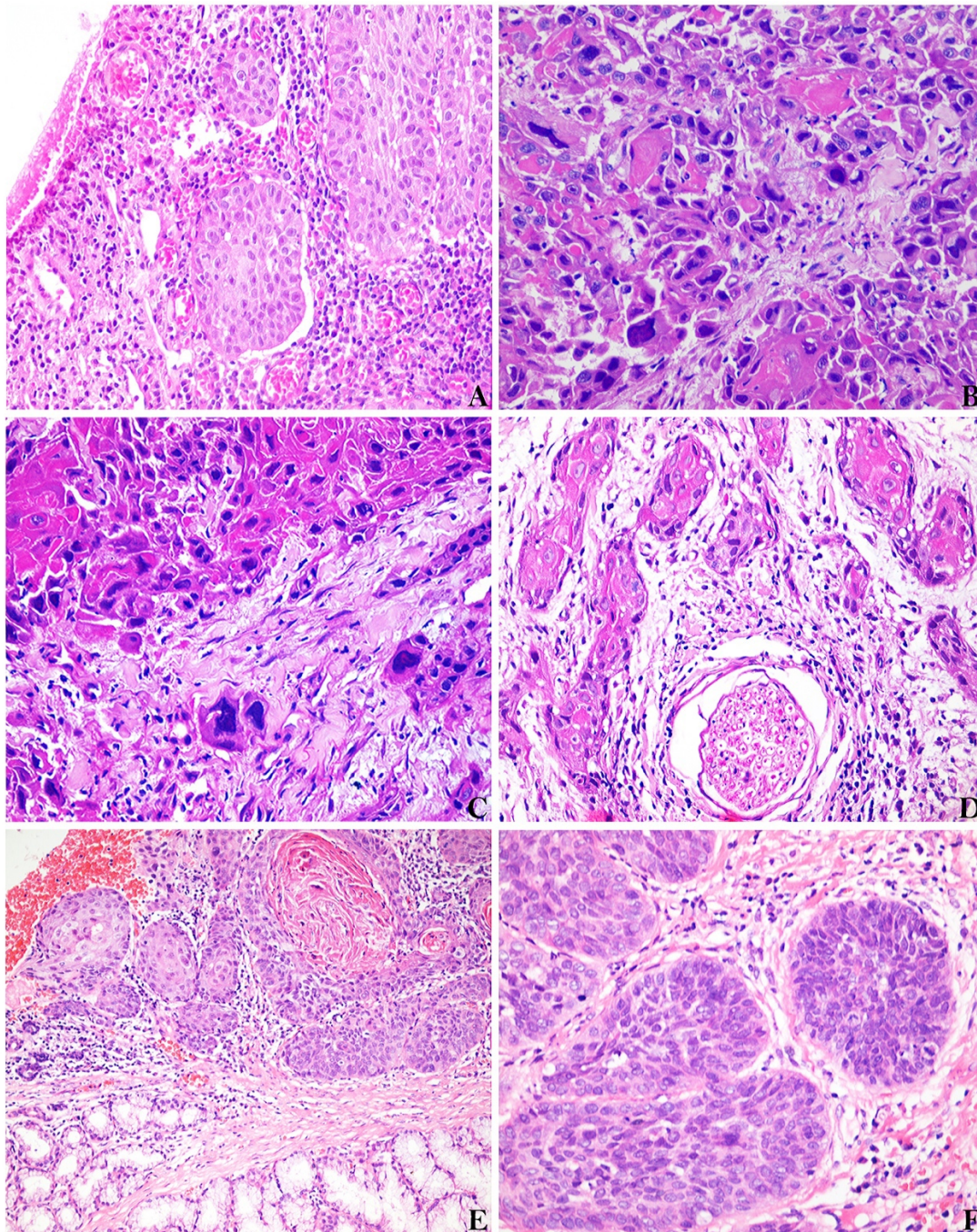
A amostra analisada consistiu em 29 casos; 20 casos apresentaram metástases regionais que também foram analisadas. A média de idade dos pacientes foi de 57 anos e a média de tamanho do tumor foi de 4cm. Os dados epidemiológicos e histopatológicos estão ilustrados no Quadro 5.1 e Figura 5.1.

Quadro 5.1 – Dados epidemiológicos e histopatológicos da amostra

		n	%
Sexo	Masculino	23	79%
	Feminino	6	24%
Fator etiológico	Tabagismo	26	90%
	Etilismo	24	83%
Localização	Língua	14	48%
	Assoalho	15	52%
Metástases	Linfonodal	22	76%
	À distância	3	10%
Recidivas		8	28%
Óbitos		21	72%
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	6	21%
	Moderadamente dif.	18	62%
	Pouco diferenciado	5	17%
Invasão	Angiolinfática	27	93%
	Perineural	23	79%
Frente de invasão - coesão	Coesiva	15	52%
	Não coesiva	14	48%

Fonte: A autora.

Figura 5.1 – Características histopatológicas da amostra analisada



Fonte: A autora.

A. Ilhas de células tumorais de CCE oral próximas a vasos sanguíneos (200x).

B e C. Células de CCE oral apresentando intenso pleomorfismo celular(200x).

D. Ilhas de células tumorais de CCE oral próximo a feixe nervoso (200x).

E. Ilhas de células tumorais de CCE oral invadindo glândula salivar (100x).

F. Invasão angiolinfática de CCE oral (400x).

5.1 Imunoexpressão das proteínas analisadas

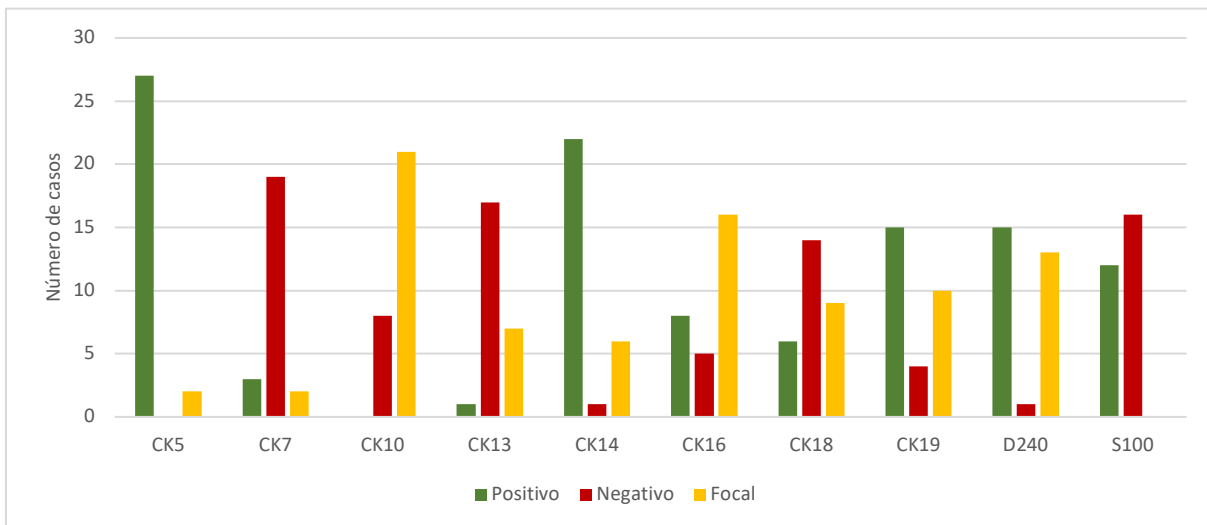
Todas as proteínas estudadas apresentaram expressão heterogênea na amostra analisada. O detalhamento do padrão de expressão de cada proteína individualmente será apresentado e discutido adiante. Em 95% dos casos (n=19) com metástases analisadas houve alteração na expressão das proteínas quando comparado o tumor primário e metástase regional. Os resultados da expressão de cada proteína encontram-se no Quadro 5.2 e ilustrados no Gráfico 5.1, Gráfico 5.2, Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3. Os resultados para cada caso individualmente encontram-se no Apêndice A. Alguns casos não puderam ser analisados para todos os marcadores devido à limitação no uso dos blocos parafinados da amostra, mas dada a quantidade limitada de dados na literatura, consideramos importante apresentar e analisar todos dados obtidos, ainda que incompletos.

Quadro 5.2 – Resultado da imunoexpressão das proteínas analisadas nos tumores primários e metástases

Proteína	Padrão de expressão	n (tumor primário)	%	n (metástases)	%
CK5	Positivo	27	93%	18	90%
	Focal	2	7%	2	10%
	Negativo	0	0%	0	0%
CK7	Positivo	3	10%	3	15%
	Focal	2	7%	3	15%
	Negativo	19	65%	13	65%
CK10	Positivo	0	0%	4	20%
	Focal	21	72%	14	70%
	Negativo	8	28%	2	10%
CK13	Positivo	1	3%	3	15%
	Focal	7	24%	4	20%
	Negativo	17	58%	13	65%
CK14	Positivo	22	76%	12	60%
	Focal	6	20%	6	30%
	Negativo	1	4%	2	10%
CK16	Positivo	8	28%	5	25%
	Focal	16	55%	12	60%
	Negativo	5	17%	3	15%
CK18	Positivo	6	20%	13	65%
	Focal	9	31%	1	5%
	Negativo	14	49%	6	30%
CK19	Positivo	15	52%	10	50%
	Focal	10	34%	6	30%
	Negativo	4	14%	4	20%
D2-40 células tumorais	Positivo	15	52%	11	55%
	Focal (periferia)	13	45%	8	40%
	Negativo	1	3%	1	5%
S-100 células tumorais	Positivo	12	41%	7	35%
	Focal	0	0%	6	30%
	Negativo	16	55%	7	35%

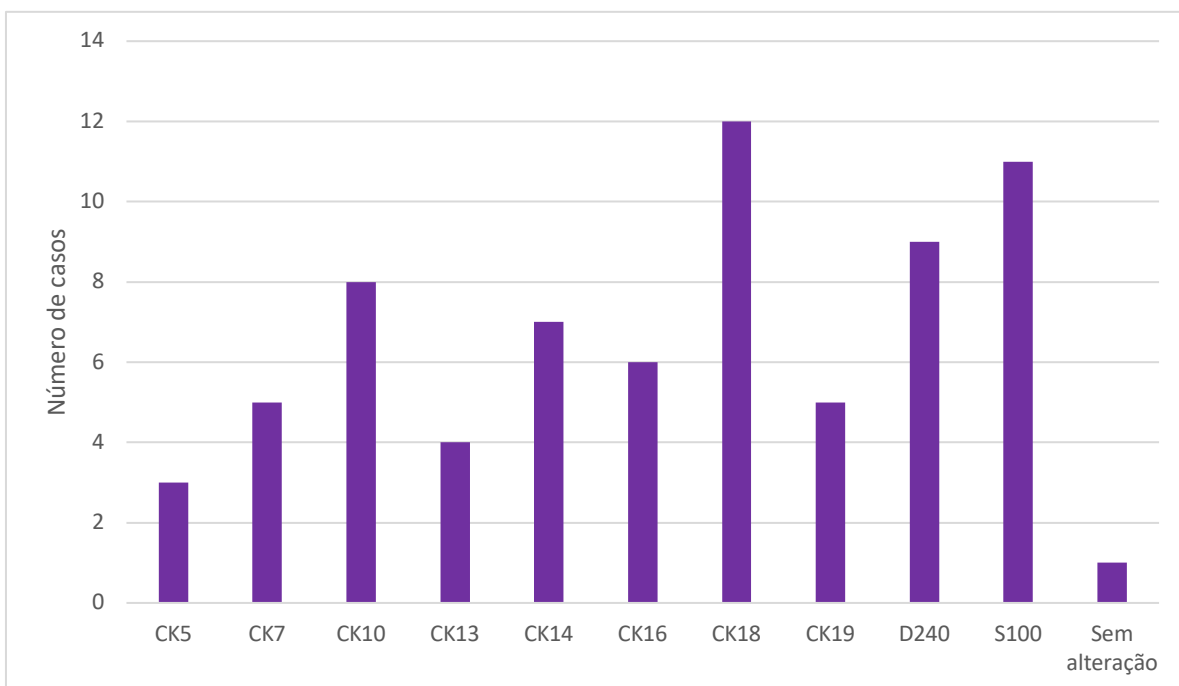
Fonte: A autora.

Gráfico 5.1 – Expressão das proteínas analisadas nos tumores primários



Fonte: A autora.

Gráfico 5.2 – Proteínas alteradas em metástases regionais comparadas com o tumor primário



Fonte: A autora.

5.1.1 CK5 e CK14

Os casos com a presença de tecido epitelial normal apresentaram positividade para as citoqueratinas 5 e 14 nos queratinócitos normais do epitélio de revestimento da mucosa, conforme ilustrado na Figura 5.2 e Figura 5.3. Nas células tumorais, foi possível observar a expressão da CK5 em 100% da amostra (n=29) e da CK14 em 97% da amostra (n=28). Também foi possível observar a expressão focal dessas proteínas em regiões de invasão, conforme ilustrado na Figura 5.4.

5.1.2 CK7

A expressão da citoqueratina 7 pôde ser observada em 17% da amostra (n=5), em padrão positivo ou focal. Casos com a presença de glândulas salivares apresentaram positividade para CK7 nos ductos e ácinos das glândulas, conforme ilustrado na Figura 5.2.

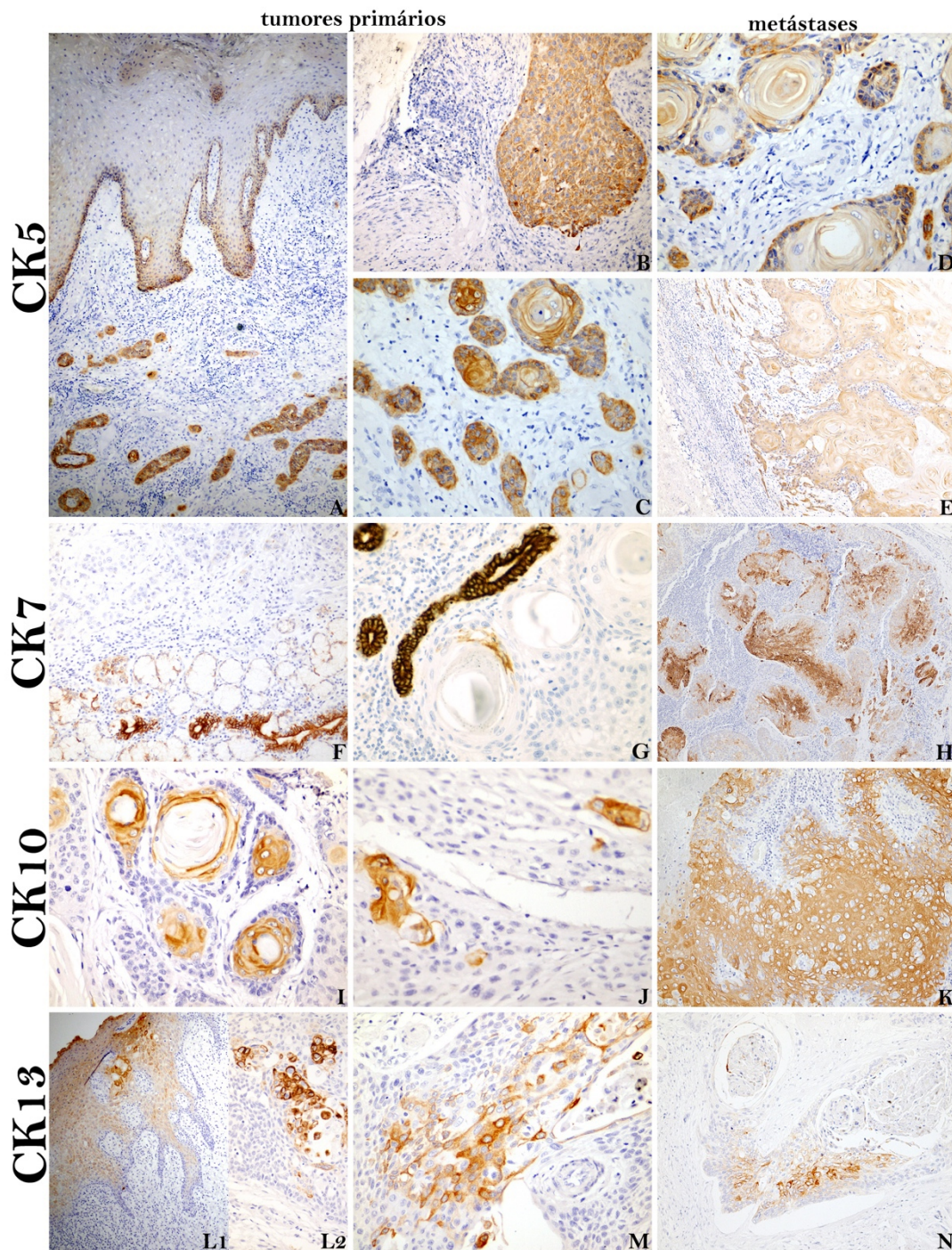
5.1.3 CK10

A expressão da citoqueratina 10 pôde ser observada em 72% da amostra (n=21), se apresentando em padrão focal no tumor primário.

5.1.4 CK13

A expressão da citoqueratina 13 foi observada nas células tumorais em 28% da amostra (n=8), geralmente em padrão focal. Casos apresentando fragmentos de epitélio normal apresentaram positividade para essa proteína nos queratinócitos suprabasais.

Figura 5.2 – Imunoexpressão de CK5, CK7, CK10 e CK13 na amostra analisada



Fonte: A autora.

A. Expressão positiva de CK5 na camada basal do epitélio da mucosa oral e em ilhas de células tumorais de CCE oral (100x).

B e C. Expressão positiva de CK5 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).

D e E. Expressão positiva de CK5 em metástases regionais de CCE oral (200x e 40x).

F e G. Expressão positiva de CK7 em ductos de glândulas salivares e focal em células tumorais de CCE oral (100x e 200x).

H. Expressão positiva de CK7 em metástase regional de CCE oral (40x).

I e J. Expressão focal de CK10 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).

K. Expressão positiva de CK10 em metástase regional de CCE oral (100x).

- L1.** Expressão suprabasal de CK13 em CCE oral superficialmente invasivo (100x).
- L2 e M.** Expressão focal de CK13 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).
- N.** Expressão focal de CK13 em metástase regional de CCE oral (100x).

5.1.5 CK16

A expressão da citoqueratina 16 pôde ser observada, na maioria dos casos (79% - n=23), em células tumorais bem diferenciadas, em um padrão de positividade focal.

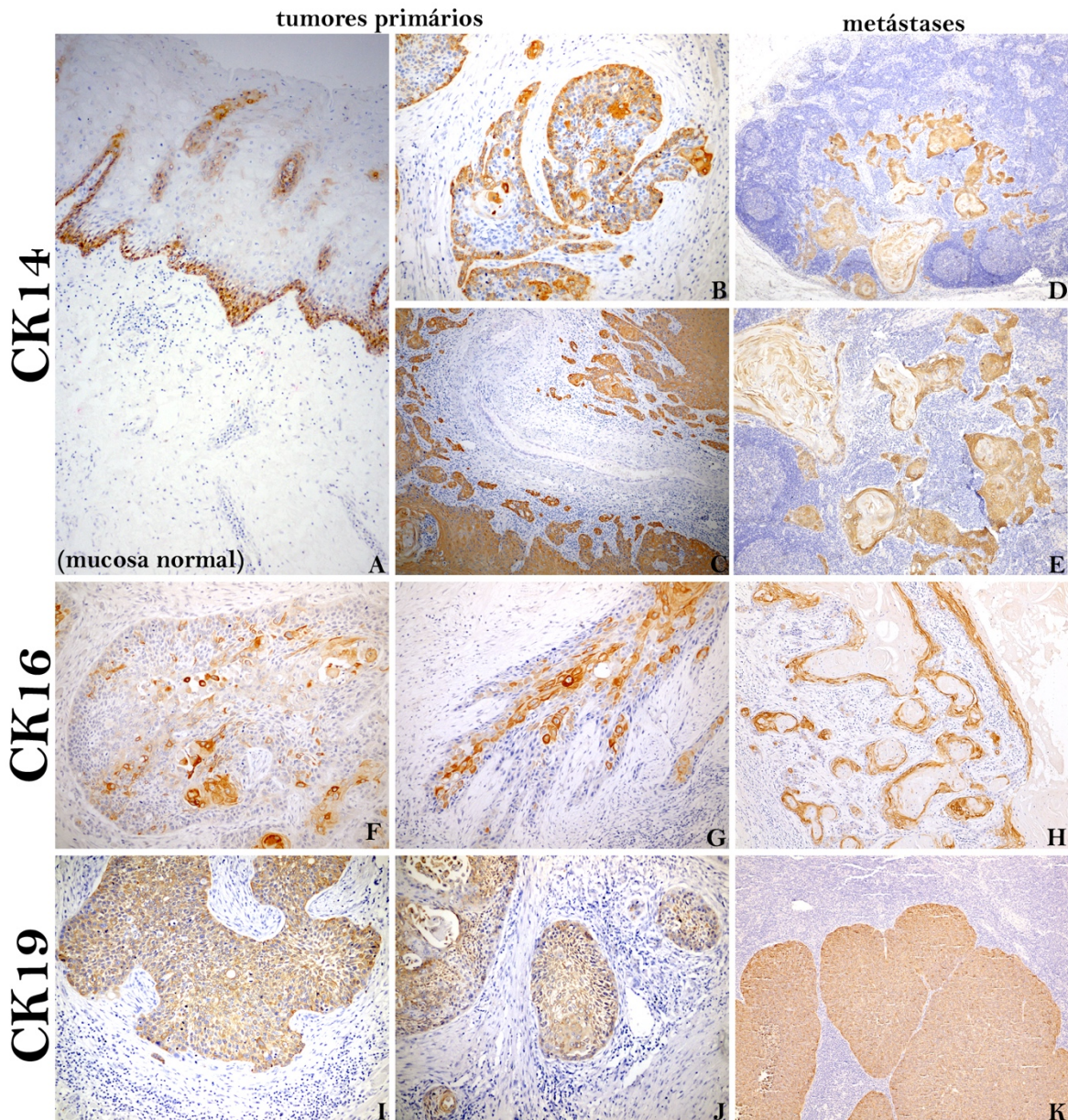
5.1.6 CK18

Mais da metade dos casos (52% n=15) apresentou positividade para essa citoqueratina, com expressão observada no citoplasma de células tumorais geralmente em padrão focal. Essa proteína foi a que mais apresentou alteração no padrão de expressão das metástases regionais, com um notável ganho de expressão.

5.1.7 CK19

Nos casos com presença de glândulas salivares, foi observada uma positividade dessa citoqueratina nos ductos das glândulas. Nas células tumorais, a maioria dos casos (86% n=25) apresentou positividade para essa citoqueratina também em dois padrões: expressão citoplasmática focal ou expressão disseminada.

Figura 5.3 – Imunoexpressão de CK14, CK16 e CK19 na amostra analisada



Fonte: A autora.

- A.** Expressão positiva de CK14 na camada basal do epitélio da mucosa oral normal (100x).
B. Expressão focal de CK14 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).
C. Expressão positiva de CK14 em ilhas de células tumorais de CCE oral (100x).
D e E. Expressão positiva de CK14 em metástases regionais de CCE oral (40x e 100x).
F e G. Expressão focal de CK16 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).
H. Expressão focal de CK16 em metástase regional de CCE oral (100x).
I e J. Expressão positiva de CK19 em ilhas de células tumorais de CCE oral (200x).
K. Expressão positiva de CK19 em metástase regional de CCE oral (100x).

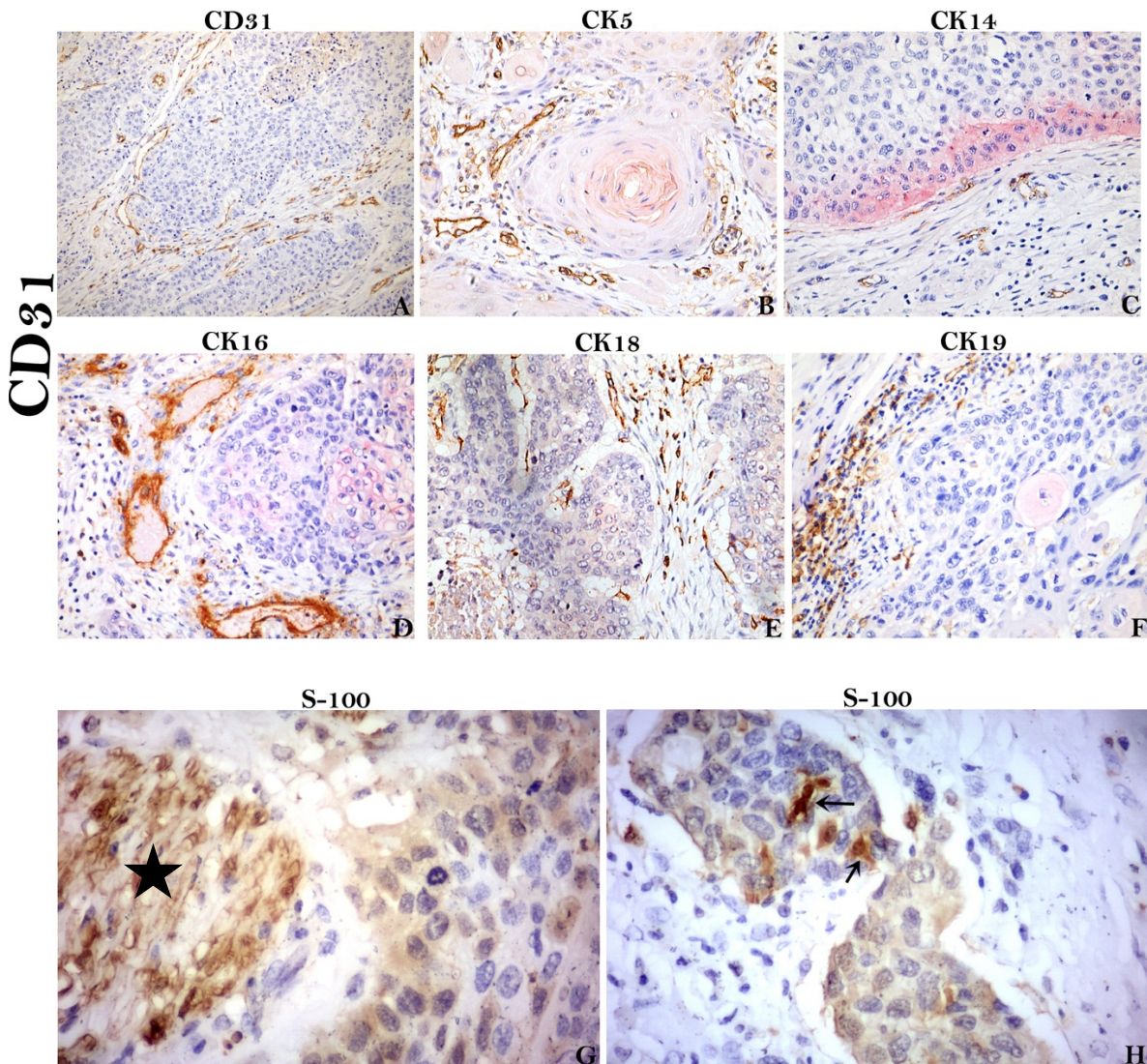
5.1.8 CD31

A expressão do CD31 pôde ser observada no endotélio de vasos sanguíneos em toda a amostra. Foi observado que os tumores são ricamente vascularizados, conforme ilustrado na Figura 5.4 (A), com uma alta densidade de vasos sanguíneos, pouco evidente na coloração HE.

5.1.9 S-100

A expressão do S-100 pôde ser observada em fibras nervosas, e foi notada também em células tumorais em 41% dos casos (n=12). No geral a expressão foi observada no citoplasma, conforme ilustrado na Figura 5.4 (G e H). Mais da metade das metástases regionais (55% n=11) apresentaram alteração no padrão de expressão dessa proteína em comparação com o tumor primário. Também foi possível notar células dendríticas na massa tumoral, positivas para essa proteína, ilustradas na Figura 5.4 (H).

Figura 5.4 – Imunoexpressão de CD31, citoqueratinas e S-100 na amostra analisada



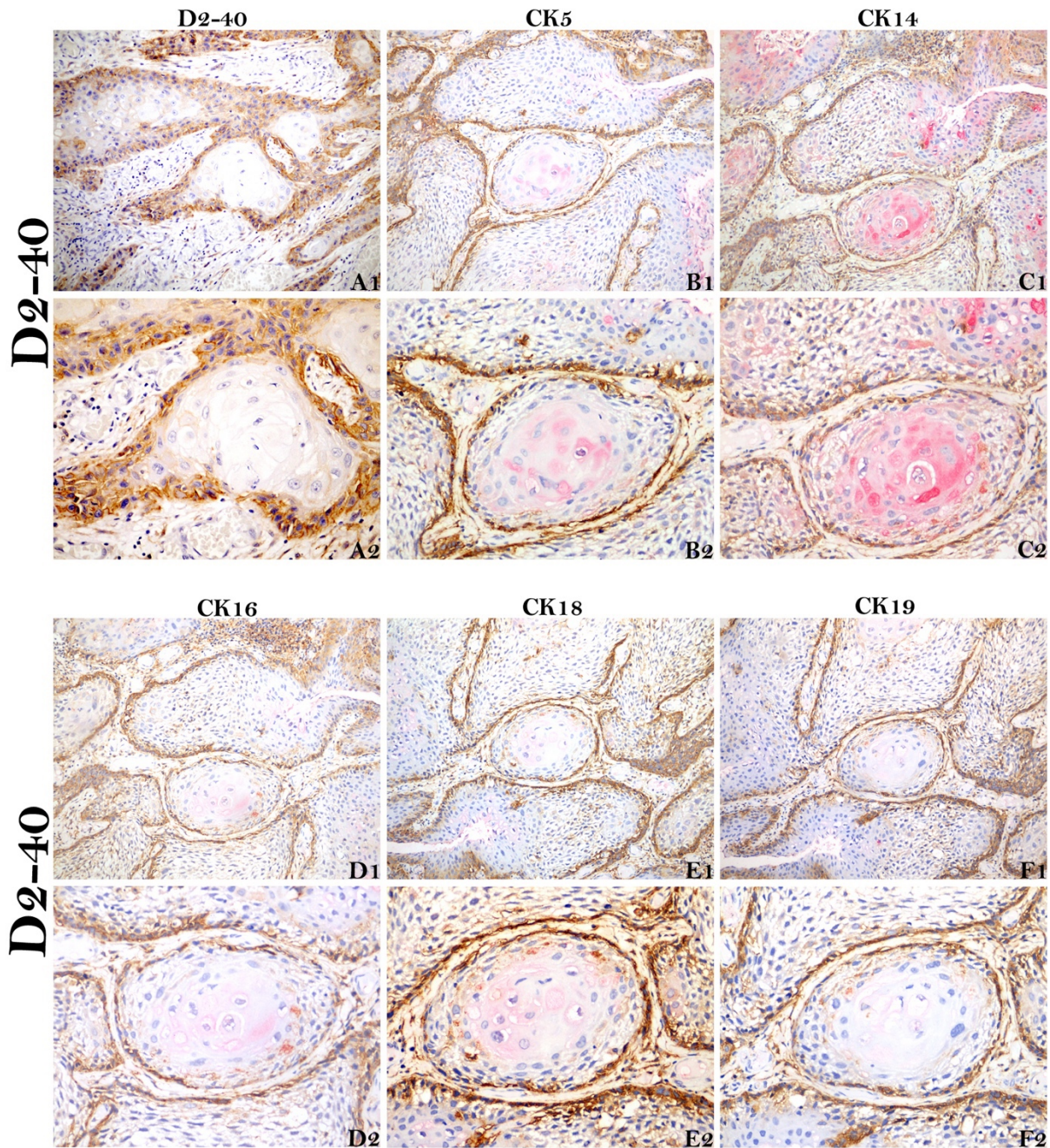
Fonte: A autora.

- A.** Alta densidade de vasos sanguíneos (CD31 – castanho) na massa tumoral (100x).
B. Expressão focal de CK5 (vermelho) em ilha de células tumorais de CCE oral próxima a vasos sanguíneos (CD31 – castanho) (200x).
C. Expressão focal de CK14 (vermelho) em frente de invasão de células tumorais de CCE oral próxima a vasos sanguíneos (CD31 – castanho) (200x).
D. Expressão positiva de CK16 (vermelho) em ilha de células tumorais de CCE oral próxima a vasos sanguíneos (CD31 – castanho) (200x).
E. Expressão positiva de CK18 (vermelho) em ilha de células tumorais de CCE oral próxima a vasos sanguíneos (CD31 – castanho) (200x).
F. Expressão focal de CK19 (vermelho) em ilha de células tumorais de CCE oral próxima a vasos sanguíneos (CD31 – castanho) (200x).
G. Expressão positiva de S-100 em ilhas de células tumorais de CCE oral próximas a feixe nervoso (estrela) (400x).
H. Expressão positiva de S-100 em ilhas de células tumorais de CCE oral. Notar a presença de células dendríticas (setas) (400x).

5.1.10 D2-40

A expressão do D2-40 foi detectada no endotélio de vasos linfáticos. Também foi notada a expressão do D2-40 em células tumorais, na membrana ou citoplasma, em 97% da amostra (n=28), conforme ilustrado na Figura 5.5. Essa expressão pôde ser observada isolada ou concomitante com outras citoqueratinas. Também foi possível identificar dois padrões de expressão do D2-40 nas células tumorais: positiva disseminada, ou apenas nas células da periferia do tumor, conforme ilustrado também na Figura 5.5.

Figura 5.5 – Imunoexpressão de D2-40 e citoqueratinas em corte seriado



Fonte: A autora.

A1 e A2. Expressão positiva de D2-40 em ilha de células tumorais de CCE oral em padrão apenas nas células da periferia (100x). Em maior aumento (A2) é possível notar uma fraca expressão na membrana das células tumorais mais ao centro da ilha (400x).

B1 e B2. Expressão focal de CK5 (vermelho) em ilhas de células tumorais de CCE oral em conjunto com expressão do D2-40 (castanho) nas células da periferia (200x e 400x).

C1 e C2. Expressão focal de CK14 (vermelho) em ilhas de células tumorais de CCE oral em conjunto com expressão do D2-40 (castanho) nas células da periferia (200x e 400x).

D1 e D2. Expressão focal de CK16 (vermelho) em ilhas de células tumorais de CCE oral em conjunto com expressão do D2-40 (castanho) nas células da periferia (200x e 400x).

E1 e E2. Expressão focal de CK18 (vermelho) em ilhas de células tumorais de CCE oral em conjunto com expressão do D2-40 (castanho) nas células da periferia (200x e 400x).

F1 e F2. Expressão focal de CK19 (vermelho) em ilhas de células tumorais de CCE oral em conjunto com expressão do D2-40 (castanho) nas células da periferia (200x e 400x).

5.1.11 Estatística

Foram realizados testes estatísticos de associação e sobrevida, a fim de se determinar se existem associações entre a expressão de cada citoqueratina individualmente, do D2-40 e S-100 em células tumorais e variáveis clínicas da doença (tamanho do tumor, grau de diferenciação, metástases regionais, metástases à distância, sobrevida, recidiva, óbito).

Foram encontradas as seguintes associações:

- CK16 negativo e focal e casos com invasão perineural ($p=0,0001$).
- CK19 positivo e focal e casos com invasão perineural ($p=0,038$); recidiva nos casos positivos em relação aos focais e aos negativos ($p=0,014$).
- Linfonodos positivos para CK7 e metástase à distância ($p=0,003$)
- Linfonodos negativos e focais para CK16 e invasão perineural ($p=0,007$)
- Linfonodos negativos para CK16 e frentes não coesivas ($p=0,007$)
- Linfonodos com expressão focal para CK14 e metástase à distância ($p=0,002$)
- Linfonodos negativos para CK18 em casos bem diferenciados e positivo/focal em casos pouco diferenciados ($p=0,042$)
- Linfonodos positivos para CK18 e invasão perineural ($p=0,021$) e invasão angiolinfática ($p=0,005$)
- Linfonodos positivos para S-100 em casos bem diferenciados e negativo em casos pouco diferenciados ($p=0,013$)
- Alteração na expressão de CK13 nos linfonodos em comparação com o tumor primário em casos bem diferenciados ($p=0,012$)

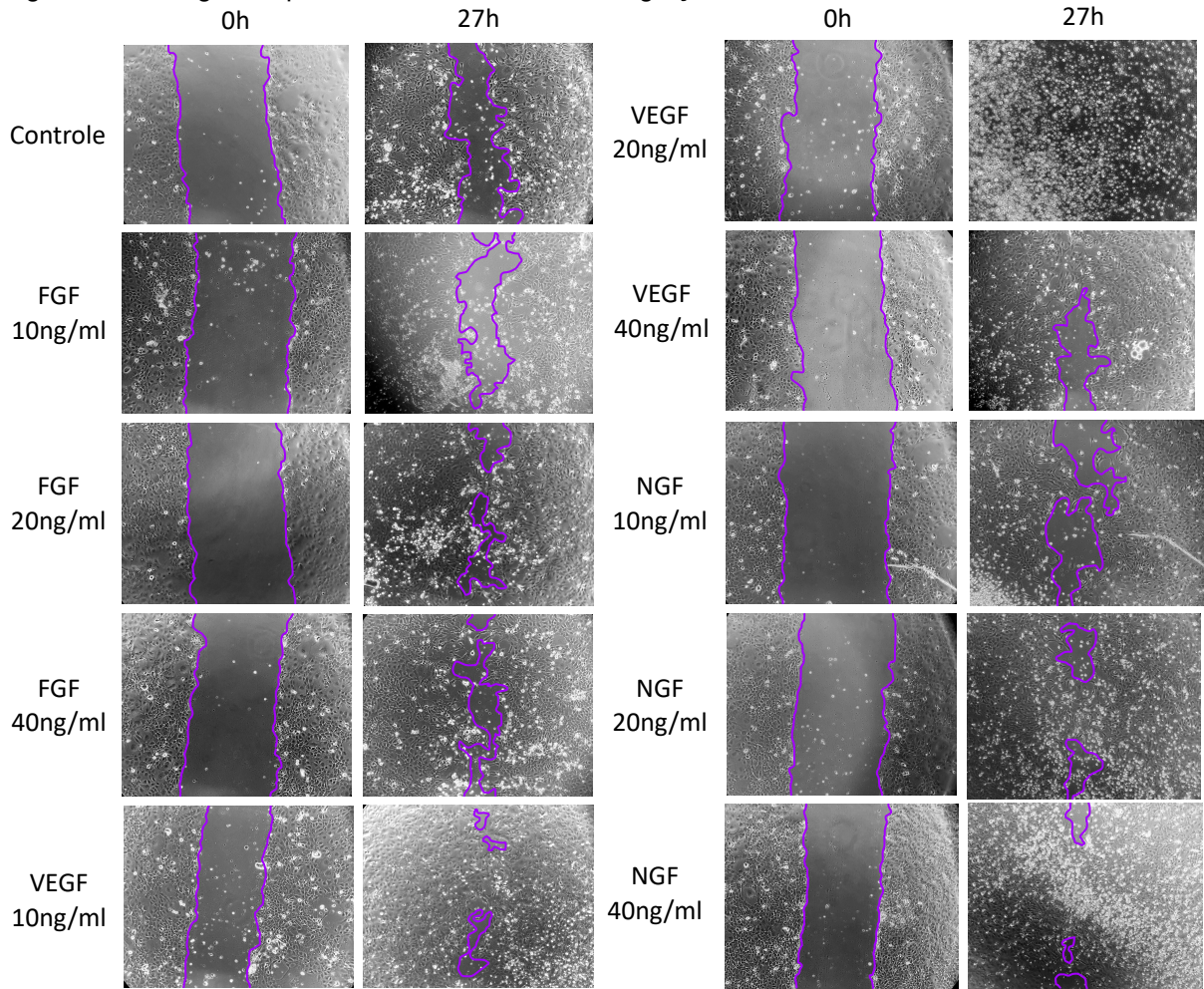
5.2 Cultura celular

5.2.1 Ensaio de migração celular

Conforme ilustrado na Figura 5.6, as células que foram estimuladas com os fatores de crescimento tiveram, em geral, tendência a um maior fechamento da ferida quando comparadas aos controles. Apesar disso, esse aumento na migração celular foi estatisticamente significativo apenas para o VEGF na concentração de 10ng/ml ($p=0,0001$ para 3h; $p=0,00004$ para 6h e $p=0,01$ para 24h). O controle veículo do VEGF apresentou diferença estatisticamente significativa no intervalo de 24h ($p=0,01$). Os resultados estão ilustrados no Gráfico 5.3.

Em relação aos demais fatores, não foram observados resultados estatisticamente significativos comparados aos controles, apenas em comparação com os demais fatores e concentrações, conforme ilustrado no Quadro 5.3, 5.4 e 5.5. As tabelas com todos os resultados estatísticos encontram-se no Apêndice C.

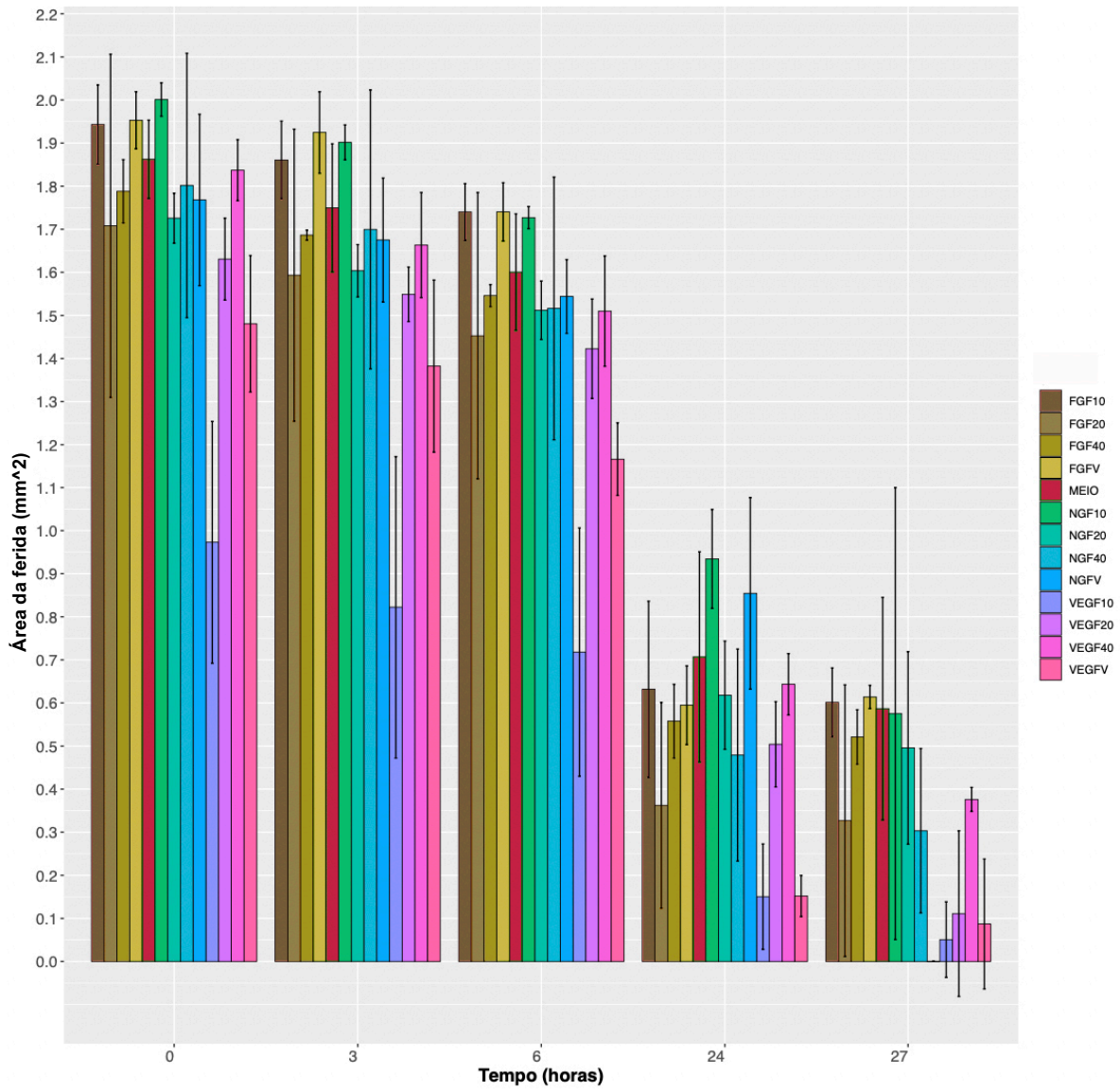
Figura 5.6 – Imagens representativas do ensaio de migração com fatores de crescimento



Fonte: A autora.

Fotos representativas da resposta migratória da linhagem SCC-9 estimulada com diferentes fatores de crescimento e controle.

Gráfico 5.3 – Resultados do ensaio de migração celular



Fonte: A autora.

Quadro 5.3 – Resultados dos testes *post-hoc* (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 3 horas

Grupos comparados	Diferença entre as médias	Valor de p ajustado para comparações múltiplas
VEGF10-FGF10	-1.03833333	0.0000259
VEGF10-FGF20	-0.77100000	0.0019602
VEGF10-FGF40	-0.86400000	0.0004317
VEGF10-FGF VEÍC.	-1.10233333	0.0000095
VEGF10-CONTROLE	-0.92733333	0.0001542
VEGF10-NGF10	-1.07933333	0.0000136
VEGF10-NGF20	-0.78133333	0.0016579
VEGF10-NGF40	-0.87733333	0.0003474
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.85266667	0.0005193
VEGF20-VEGF10	0.72666667	0.0040058
VEGF40-VEGF10	0.84100000	0.0006280

Fonte: A autora.

Quadro 5.4 – Resultados dos testes *post-hoc* (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 6 horas

Grupos comparados	Diferença entre as médias	Valor de p ajustado para comparações múltiplas
VEGF10-FGF10	-1.022000000	0.0000041
VEGFV-FGF10	-0.573666667	0.0135494
VEGF10-FGF20	-0.734666667	0.0007305
VEGF10-FGF40	-0.828000000	0.0001310
VEGF10-FGF VEÍC.	-1.022333333	0.0000040
VEGFV-FGF VEÍC.	-0.574000000	0.0134705
VEGF10-CONTROLE	-0.882666667	0.0000483
VEGF10-NGF10	-1.009000000	0.0000051
VEGFV-NGF10	-0.560666667	0.0169956
VEGF10-NGF20	-0.794000000	0.0002446
VEGF10-NGF40	-0.798333333	0.0002259
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.826000000	0.0001359
VEGF20-VEGF10	0.704666667	0.0012697
VEGF40-VEGF10	0.792000000	0.0002538

Fonte: A autora.

Quadro 5.5 – Resultados dos testes *post-hoc* (Tukey's HSD) estatisticamente significativos para o intervalo de 24 horas

Grupos comparados	Diferença entre as médias	Valor de p ajustado para comparações múltiplas
NGF10-FGF20	0.572000000	0.0106280
NGFV-FGF20	0.492000000	0.0432968
VEGF10-CONTROLE	-0.556666667	0.0140196
VEGFV-CONTROLE	-0.555000000	0.0144455
VEGF10-NGF10	-0.784000000	0.0001991
VEGFV-NGF10	-0.782333333	0.0002055
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.704000000	0.0009052
VEGFV-NGF VEÍC.	-0.702333333	0.0009343
VEGF40-VEGF10	0.493000000	0.0425745
VEGFV-VEGF40	-0.491333333	0.0437846

Fonte: A autora.

5.2.2 Ensaio de proliferação celular

Após o estímulo com os fatores de crescimento, foi possível observar um aumento nas taxas de proliferação em todas as condições após o período de 24h, exceto para os poços tratados com o agente anti-proliferativo. Os resultados estão ilustrados na Figura 5.7.

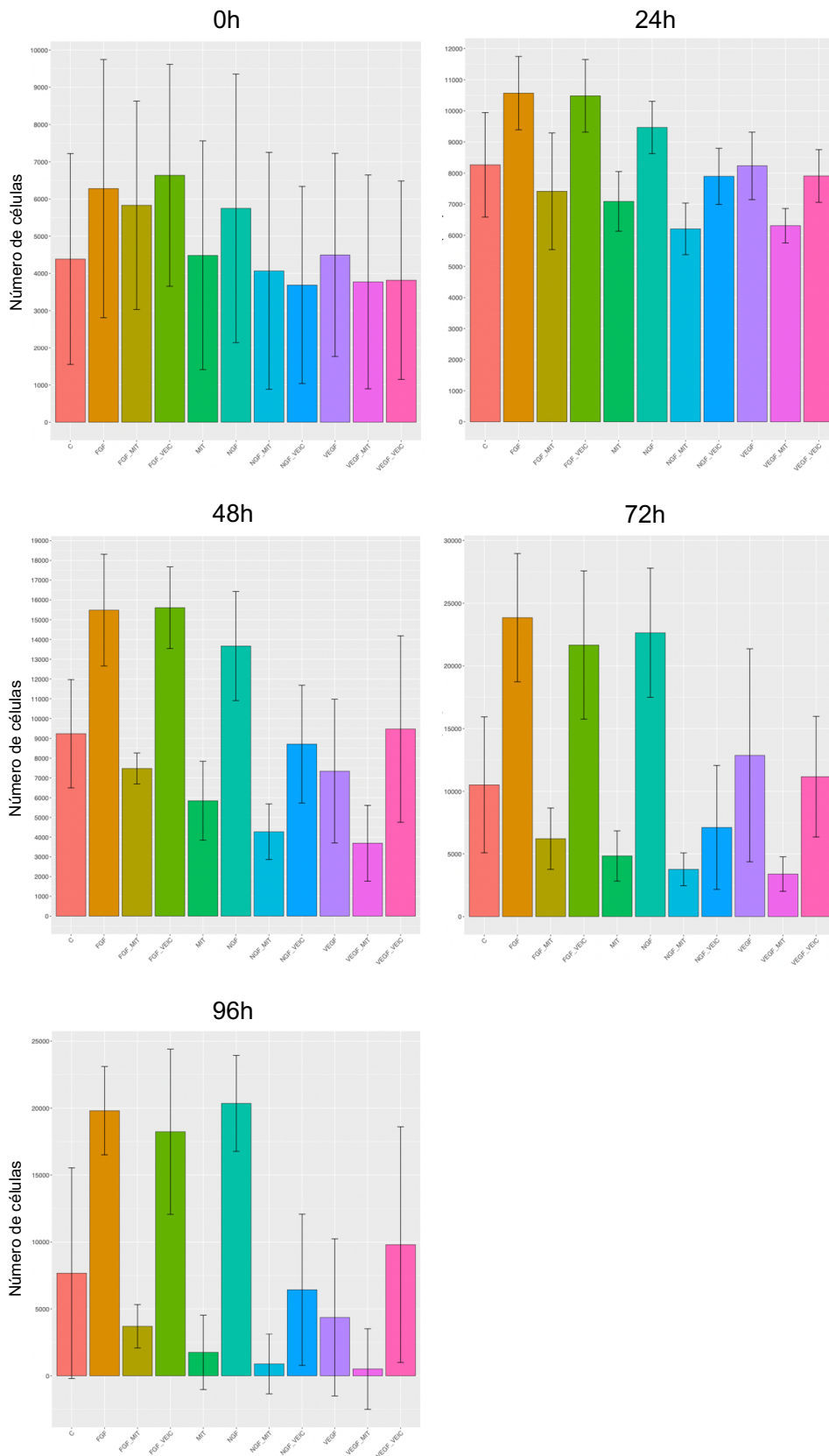
Os poços estimulados com os fatores FGF e NGF, bem como os controles de veículo do FGF, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com os controles. Os poços estimulados com VEGF apresentaram comportamento instável, sofrendo ligeira queda após 48h, seguida de aumento em 72h e queda expressiva em 96h.

Todos os poços que receberam tratamento com o agente anti-proliferativo sofreram quedas sucessivas no número de células após 24h. Os poços de controle do veículo do fator VEGF apresentaram um padrão semelhante ao controle, porém com taxas ligeiramente maiores. Já o controle do veículo do NGF apresentou taxas mais baixas.

Foi possível observar um aumento estatisticamente significativo nas taxas de proliferação em comparação com os controles nas comparações e intervalos de tempo descritos abaixo. Nas demais condições de tempo e tratamento não foram observadas diferenças significantes. Os dados completos da análise estatística encontram-se detalhados no Apêndice D.

- Controle X FGF em 48 horas ($p=0.019$);
- Controle X FGF em 72 horas ($p=0.028$ - U-Mann Whitney)
- Controle X FGF em 96 horas ($p=0.029$);
- Controle X Veículo FGF em 48 horas ($p=0.009$);
- Controle X Veículo FGF em 72 horas ($p=0.032$);
- Controle X NGF em 72 horas ($p=0.017$);
- Controle X NGF em 96 horas ($p=0.026$);
- Controle X NGF Mitomicina em 48 horas ($p=0.018$);
- Controle x VEGF Mitomicina em 48 horas ($p=0.016$)

Figura 5.7 – Resultados do ensaio de proliferação celular



Fonte: A autora.

5.2.3 Citometria de fluxo

Os resultados mostraram, em geral, um aumento na expressão das três citoqueratinas analisadas, para os três fatores de crescimento e nos dois tempos de experimento. Esse aumento pôde ser observado tanto em relação à frequência de células positivas para as proteínas, quanto em relação à intensidade média de fluorescência (MFI), sendo que a CK16 apresentou maior desvio-padrão na MFI. Os resultados estão descritos no Quadro 5.6 e Quadro 5.7. Os gráficos *dot-plot* ilustrativos dos experimentos encontram-se no Apêndice E.

Quadro 5.6 – Resultados médios da citometria de fluxo para experimentos de 24h

Proteína	Frequência de células positivas							
	Controle		FGF		NGF		VEGF	
CK14	0,25%	0 Dp	9,69%	2,61 Dp	2,69%	0,09 Dp	2,98%	0,75 Dp
CK16	28,55%	1,95 Dp	75,1%	7,1 Dp	89,4%	4,4 Dp	80,05%	15,05 Dp
CK18	1%	0,1 Dp	18,45%	1,15 Dp	33,2%	3,8 Dp	21,85%	1,15 Dp
Intensidade Média de Fluorescência (MFI)								
CK14	23,2	0 Dp	82,35	2,35 Dp	58,6	2,6 Dp	54,9	0,9 Dp
CK16	69,9	63,1 Dp	375	145 Dp	523,5	183,5 Dp	463	243 Dp
CK18	26,8	7,5 Dp	86,05	13,05 Dp	206	8 Dp	128	29 Dp

Fonte: A autora.

Dp= Desvio-padrão.

Quadro 5.7 – Resultados médios da citometria de fluxo para experimentos de 48h

Proteína	Frequência de células positivas							
	Controle		FGF		NGF		VEGF	
CK14	0,23%	0,15 Dp	0,93%	0,38 Dp	0,89%	0,52 Dp	0,66%	0,56 Dp
CK16	18,2%	0 Dp	60%	14,1 Dp	44%	10 Dp	67,65%	11,65 Dp
CK18	1,17%	0,61 Dp	6,55%	1,2 Dp	13,25%	2,25 Dp	4,86%	1,36 Dp
Intensidade Média de Fluorescência (MFI)								
CK14	37,95	10,65 Dp	50,75	12,25 Dp	37,05	3,05 Dp	37,95	2,95 Dp
CK16	283	0 Dp	282,5	115,5 Dp	196	40 Dp	283	99 Dp
CK18	94	20,1 Dp	65	9 Dp	129	18 Dp	94	7 Dp

Fonte: A autora.

Dp= Desvio-padrão.

6 DISCUSSÃO

Nos resultados encontrados em nosso trabalho, foi possível observar evidências de importantes alterações no padrão de expressão das citoqueratinas, comparado com o padrão de expressão descrito na mucosa da cavidade oral. Essas alterações foram observadas tanto na análise da casuística, quanto nos ensaios *in vitro* com os fatores de crescimento. Adicionalmente, foi possível observar indícios de alterações migratórias e proliferativas, bem como alteração na expressão dos marcadores D2-40 e S-100. Inicialmente serão discutidos os resultados clínicos e histopatológicos, seguidos pela discussão dos padrões de expressão das citoqueratinas, e por fim, os resultados relativos a outras variáveis.

A invasão de tecidos e estruturas adjacentes é um passo crítico na evolução do CCE oral. A invasão de nervos e vasos linfáticos e sanguíneos permite a disseminação das células tumorais, e se associa com o desenvolvimento de metástases regionais e à distância, e com fatores prognósticos como sobrevida e recidivas(23). Apesar da evolução e desenvolvimento de novas tecnologias em pesquisa, ainda existem muitos fatores a serem investigados nesse processo.

Os casos incluídos neste trabalho apresentaram neoplasias com tamanho médio de 4 cm, maior do que a média relatada em outros trabalhos. Consequentemente, são casos de doença com prognóstico reservado, tanto pela grande ressecção cirúrgica, quanto pelo caráter mais agressivo da doença, o que podemos observar no elevado número de óbitos da amostra (n=21 – 72%).

As características clínico-epidemiológicas da amostra condizem com as características gerais da doença: maior prevalência no sexo masculino, média de idade na quinta década de vida e tabagismo e etilismo crônico associados (1). A maioria dos casos (n=22 – 76%) apresentou o desenvolvimento de metástases regionais, o que está de acordo com o relatado na literatura sobre a associação entre a presença de invasão e desenvolvimento de metástases (21–23).

As características histopatológicas observadas nas neoplasias analisadas foram heterogêneas. Foram detectados os três graus de diferenciação na amostra, com predomínio de casos de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciados, seguido por casos bem diferenciados e pouco diferenciados, corroborando o padrão descrito na literatura (15). Em relação à frente de invasão, a distribuição de padrões encontrados na casuística deste trabalho confronta os dados

da literatura, que descreve que o padrão de invasão não-coesivo está associado a um comportamento mais agressivo do tumor, com pior prognóstico(13,53). Isso pode indicar que o padrão da frente de invasão isoladamente não é suficiente para indicar um mau prognóstico. A análise em conjunto com outras variáveis da frente de invasão, como resposta inflamatória, composição do estroma e populações celulares presentes no mesmo, bem como a presença de fibroblastos associados ao câncer, parecem fornecer melhores evidências para se determinar uma análise de risco e prognóstico (14).

O processo de invasão e metástase, durante a evolução do câncer, envolve uma série de etapas, caracterizadas por mudanças fenotípicas e funcionais nas células tumorais. Inicialmente as células se destacam do tumor primário, com alterações nos sistemas de adesão, seguida pela migração local e invasão dos tecidos adjacentes, invasão de vasos linfáticos, sanguíneos e nervos, extravasamento em um novo local anatômico e, finalmente, proliferação e crescimento do tumor secundário. Em cada um desses processos, inúmeras interações moleculares se desenvolvem entre a célula tumoral, seu microambiente e células próximas, desencadeando em resposta diversos mecanismos adaptativos, entre eles o remodelamento do citoesqueleto no processo de migração e invasão (36).

Diversos estudos se propuseram a avaliar a expressão de diferentes citoqueratinas em tumores primários de CCE oral, geralmente utilizando a técnica de imunistoquímica simples e arranjo em matriz de amostras teciduais (5,11,35,38,43,44,46,54–56). A técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, embora permita avaliar uma grande amostra simultaneamente, possui a limitação de analisar uma área reduzida da massa tumoral. O mesmo princípio vale para estudos que utilizam biópsias como amostra para análise (42). Conforme observamos neste trabalho, muitos casos apresentam a expressão dessas proteínas limitada a uma região muito específica do tumor, ou mesmo a um pequeno número de células, que pode não ser identificado em uma pequena amostra tecidual. Além disso, não foram identificados estudos na literatura que avaliem a expressão das citoqueratinas em CCE oral especificamente em regiões de invasão, em metástases ou sob efeito dos fatores de crescimento utilizados neste trabalho.

Além da perda/ganho de expressão das diferentes citoqueratinas, sua localização no interior das células também afeta suas propriedades. A distribuição em rede ao longo do citoplasma garante rigidez, estrutura tridimensional e estabilidade

mecânica. Já a organização perinuclear permite uma maior elasticidade e capacidade migratória. Essa reorganização estrutural das citoqueratinas é observada no processo de reparo do epitélio e já foi demonstrada também no processo de metástase (57).

A perda da expressão e expressão focal das CKs 5/14 (em relação ao epitélio normal) em alguns casos específicos é um achado importante deste trabalho, pois essas citoqueratinas são fundamentais para a estruturação da arquitetura do epitélio estratificado da mucosa oral normal e são utilizadas como padrão ouro no diagnóstico do CCE. Essa perda já foi relatada em CCE de língua e mucosa alveolar (46,58). Apesar de não encontrarmos associação estatística dessas CKs com parâmetros clínicos e prognósticos, estudos já encontraram uma associação importante entre a perda da CK5 em CCE oral e tabagismo crônico, causado por bloqueios transcricionais (59). Futuros estudos são importantes para identificar e esclarecer os mecanismos que levam à perda expressiva dessas proteínas.

Poderíamos esperar que as células bem diferenciadas apresentassem a expressão das CK5 e CK14. Porém, observamos que essa hipótese não é verdadeira, conforme ilustrado na Figura 5.1.3, onde observamos cortes seriados do mesmo caso, exibindo expressão positiva em células bem diferenciadas concomitante para as CKs 5, 14, 16, 18 e 19.

A observação da perda de expressão da CK14 em alguns êmbolos em vasos sanguíneos fornece uma evidência importante de remodelação do citoesqueleto no processo de invasão e migração nessas estruturas. A associação encontrada em nossa amostra entre linfonodos com expressão focal para CK14 e metástase à distância também reforça essa evidência, sugerindo um comportamento mais agressivo das células tumorais que perdem essa proteína ao longo da cascata metastática. Estudos sugerem que as CKs 5/14 possuem um efeito inibitório no processo de invasão, embora a CK14 pareça ser necessária no processo de migração coletiva (36,60). A perda da CK14 já foi observada em células da frente de invasão (42), sendo que a perda dessas duas citoqueratinas leva a uma diminuição da rigidez celular e perda de mecanismos de adesão, permitindo células individuais atravessarem poros em modelo experimental 3D, com sua re-expressão levando ao aumento do crescimento em colônias (36).

Como as citoqueratinas 5 e 14 possuem função importante na definição da estrutura tridimensional e rigidez da célula, bem como na composição dos sistemas de adesão, a redução na sua expressão permite à célula a migração individual e uma

maior deformação elástica de sua estrutura. Com isso é adquirida a capacidade de atravessar o espaço limitado entre as células do endotélio, tanto no processo de entrada, quanto de saída dos vasos. Ao atingir um novo microambiente, a célula pode recuperar a expressão dessas citoqueratinas, a fim de permitir a proliferação e sobrevivência de uma nova colônia, conforme demonstrada a importante participação das CKs 5 e 14 no processo de proliferação celular e tumorigênese (61).

Em relação ao efeito dos fatores de crescimento FGF, NGF e VEGF, a análise na citometria de fluxo revelou que os três fatores tiveram influência no número de células que expressaram a CK14, tendo sido observado um aumento proporcionalmente elevado em relação aos controles. Também foi observado um aumento expressivo da intensidade média de fluorescência dessa citoqueratina, nos dois períodos de incubação. Isso pode significar que esses fatores de crescimento possuem tanto capacidade de induzir a expressão dessa proteína, quanto parecem exercer um efeito importante nas células que já apresentam sua expressão. Esse efeito foi mais intenso no experimento de 24h de exposição aos fatores, fornecendo indícios de que essa resposta pode estar relacionada a mecanismos adaptativos das células tumorais nas primeiras horas em um novo microambiente.

A CK7 é a citoqueratina que menos apresenta estudos na literatura em CCE oral. Existe um trabalho que investigou a expressão da CK7 em CCE oral e de orofaringe HPV positivos e negativos, em conjunto com a CK19, onde foi observado um aumento de expressão das duas citoqueratinas nos casos HPV+(38). Em nosso trabalho pudemos observar poucos casos (17% n=5) com expressão dessa proteína, mas 25% (n=5) dos linfonodos tiveram ganho ou aumento na expressão da CK7 em relação ao tumor primário. A CK7 é uma citoqueratina característica de epitélio simples, e esse resultado reforça a tendência intrigante de aumento de expressão das citoqueratinas de epitélio simples que observamos em metástases neste trabalho, pois o mesmo ocorreu com as CKs 18 e 19.

Também observamos uma associação entre a expressão da CK7 em linfonodos e a presença de metástase à distância, o que pode sugerir que a sua presença possa contribuir para um comportamento mais agressivo das células tumorais em novos microambientes, bem como favorece o desenvolvimento de metástases. Um estudo que avaliou a expressão da CK7 por mRNA observou um aumento na expressão dessa citoqueratina em casos mais avançados (39), reforçando essa hipótese.

A citoqueratina 10, que é um marcador de diferenciação terminal dos queratinócitos, apareceu focalmente nos tumores primários em nossa amostra, o que está de acordo com o observado em outros estudos (5,41), sem associação com fatores clínicos, histopatológicos ou prognósticos. Alguns estudos associaram o aumento da expressão da CK10 como característica de CCEs orais bem diferenciados (5,11), mas não observamos essa associação em nossa amostra, onde os casos bem diferenciados apresentaram também expressão focal ou mesmo negativa para essa proteína.

Existem teorias de que a CK10 é substituída pelas CKs 18 e 19 durante a carcinogênese(41), mas não encontramos essa associação em nossa amostra. Contudo, este resultado pode ter sido influenciado pelas limitações amostrais já mencionadas anteriormente, e essa teoria é uma hipótese interessante a ser explorada em futuros trabalhos. Deve-se atentar também para evidências de diferentes padrões de expressão das citoqueratinas de acordo com a localização do tumor primário (5,11), sendo que nossa amostra consistiu apenas em tumores de língua e assoalho.

A presença da CK10 pode prejudicar o programa de diferenciação epitelial das células neoplásicas, impedindo que essas células atinjam a capacidade de se separarem do tumor primário(41,42), justificando a perda dessa proteína em metástases. Estudos encontraram associação entre a perda de expressão da CK10 (comparada ao epitélio normal) e presença de metástases à distância(11,42). Em nossa amostra observamos a alteração na expressão dessa proteína em 40% das metástases em comparação com os tumores primários, com frequente ganho de expressão. Isso pode indicar que as células tumorais inicialmente perdem a expressão dessa proteína, para iniciar o processo de metástase, e, ao atingir o órgão alvo o aumento/ganho de expressão da CK10 pode ser uma etapa fundamental para o estabelecimento de uma nova colônia. Essa é uma possibilidade interessante a ser investigada em futuros trabalhos

A CK13 está presente nas camadas suprabasais da mucosa não queratinizada, como é o caso do assoalho bucal, e é totalmente ausente na mucosa queratinizada, como a língua (18). Interessantemente, pudemos observar casos de tumores primários de língua com expressão focal dessa proteína, um caso com expressão positiva e casos de tumores primários de assoalho com expressão negativa, refutando

mais uma vez a hipótese que os tumores mantêm a expressão das CKs semelhante ao tecido de origem.

Existem poucos estudos na literatura investigando a citoqueratina 13 em CCE oral. A expressão negativa da CK13 em CCE de língua foi associada à recidiva local (43) e pior prognóstico (44), e a sua expressão positiva foi associada a tumores bem diferenciados(11), mas não encontramos associações com variáveis clínicas ou prognósticas em nossa amostra. Alguns casos (n=4 – 20%) apresentaram alteração na expressão da CK13 nas metástases regionais em comparação com o tumor primário, com notável ganho de expressão, sendo associados a tumores bem diferenciados. Isso pode sugerir alguma influência do microambiente na expressão dessa proteína.

Sendo a CK13 uma citoqueratina específica de mucosa não queratinizada, alterações em seu padrão de expressão em neoplasias podem indicar importantes mudanças no comportamento celular. Essa hipótese já foi validada em outros tipos de CCE, com evidências de que a superexpressão dessa proteína leva à resistência à radioterapia(62). A superexpressão da CK13 também foi observada em análise proteômica de CCE de língua, aparecendo em casos sem metástases e sendo potencial candidata a biomarcador tumoral para esse sítio primário (63). Portanto, essa proteína pode ser um importante foco de pesquisa no CCE oral.

A CK16 é um marcador de queratinócitos hiperproliferativos, aparecendo nos processos de inflamação e reparo. Sabe-se que é comum, e uma das marcas registradas do câncer a indução de inflamação. Uma das hipóteses para explicar a expressão da CK16 em tumores é que fatores de crescimento e proteínas presentes no microambiente tumoral poderiam ser estímulos para iniciar a ativação desse processo proliferativo em populações específicas de células tumorais.

Em nossa amostra, a expressão focal de CK16 ou sua completa ausência foi associada à invasão perineural. Contudo, nos ensaios *in vitro*, foi possível observar um aumento importante na expressão da CK16 após a exposição a todos os fatores de crescimento (dentre eles o NGF), tanto em número de células positivas, quanto intensidade de expressão, indicando que a expressão dessa proteína pode ocorrer de forma dinâmica e complexa.

Esse aumento na expressão da CK16 foi mais intenso no período de 24h, evidenciando mais uma vez um provável mecanismo adaptativo e remodelamento do citoesqueleto das células tumorais nas primeiras horas em um novo microambiente.

O ensaio de proliferação apresentou resultados significantes para o FGF e NGF apenas após o período de 48h, sugerindo que esse aumento na expressão da CK16 nas horas iniciais não parece estar relacionado à proliferação. Também não foram observadas alterações significativas no processo migratório das células tumorais, o que pode indicar outras funções importantes dessa proteína ainda não elucidadas no maquinário e sobrevivência das células tumorais.

A literatura possui poucos dados e é controversa em relação à expressão dessa proteína no CCE oral. Existem trabalhos relatando tanto o aumento de sua expressão (11,63) e associação com pior prognóstico (42), quanto perda da sua expressão(54). Foi encontrada associação entre a expressão de CK16 e tumores diferenciados, bem como melhor taxa de sobrevida em 5 anos em casos específicos com aumento de expressão de CK16 e baixa expressão de CK18 e CK19 (11).

A expressão positiva das CKs 18 e 19 é intrigante, pois são citoqueratinas características de epitélios simples e glandulares, sendo completamente ausentes no epitélio estratificado normal da mucosa oral. As CK8/18 apresentam expressão positiva na carcinogênese, o que pode imitar o comportamento de expressão dessas citoqueratinas durante a embriogênese (35,64). Estudos experimentais em cultura de queratinócitos demonstraram que a indução na expressão das CK8/18 leva à mudança de fenótipo das células do epitélio estratificado, resultando na sua transformação maligna (48), corroborando essa hipótese. Foram encontradas associações entre essas duas proteínas e CCE oral pouco diferenciado (50,54), mas não encontramos essa associação em nossa amostra.

Nos ensaios *in vitro*, observamos um aumento no número de células expressando a CK18 e aumento na intensidade de expressão, sendo também mais alterado no tempo de 24h. Esses resultados também oferecem indícios de importante participação dessa proteína nos mecanismos iniciais de adaptação funcional da célula tumoral frente ao estímulo dos fatores de crescimento.

A expressão de CK18 e CK19 em CCE de língua foi associada com um pior prognóstico da doença (49,50,56), o que foi reforçado pelas associações que encontramos entre a CK19 e recidivas e invasão perineural e entre linfonodos positivos para CK18 e invasão perineural e angiolinfática. Estudos sugerem que a expressão das CKs 8/18 e 19, que ocorre em alguns casos específicos de CCE, pode ter relação com uma maior hipóxia e maior desregulação do ciclo celular (5). Também já foi observado uma maior expressão das CKs 18 e 19 em tumores primários de

assoalho bucal, indicando mais uma vez que a localização do tumor primário pode influenciar no padrão de expressão das citoqueratinas (5).

Foi notável o aumento de expressão da CK18 nas metástases regionais em comparação com os tumores primários, sendo essa expressão associada aos diferentes tipos de invasão, conforme mencionado. Isso sugere uma importante participação dessa proteína nos mecanismos de evolução da doença. A CK18 pode ser expressa por ativação de vias da embriogênese, por modificação do perfil epitelial da célula, uma vez que é um marcador de epitélio simples/glandular, ou, talvez, por sua associação com a regulação do ciclo celular, que está completamente alterado nas células tumorais. Além disso, sua expressão já foi associada a recidivas e pior prognóstico (11,50), o que não identificamos em nosso trabalho.

Um estudo identificou o aumento na expressão da CK19 associada à perda de expressão da CK14 no processo de carcinogênese (46), mas em nossa amostra essa relação não se mostrou binária. A CK19 também parece ser um marcador de pior prognóstico e metástases (56), o que é reforçado pelas associações que encontramos entre CK19, invasão perineural e recidiva.

Recentemente a CK19 tem sido investigada como potencial biomarcador salivar para diagnóstico e monitoramento da evolução e tratamento CCE, mas ainda se faz necessário o desenvolvimento de delineamentos experimentais mais robustos para confirmar essa possibilidade (65–67). Essa proteína pode estar relacionada com maior proliferação das células tumorais (42).

Um estudo apontou evidências de dois padrões patogênicos distintos de expressão das citoqueratinas em CCE oral: baixo peso molecular (CKs 8/18 e 19), associados a tumores pouco diferenciados, hipóxia e maior desregulação do ciclo celular; e alto peso molecular (CKs 1, 5/6, 10 e 14), associados a tumores bem diferenciados com menor desregulação do ciclo celular(5). Contudo, não foi possível estabelecer uma hipótese ou associações que explicassem a existência desses dois padrões. Mesmo a associação com o grau de diferenciação é questionável, e os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a expressão das citoqueratinas responde de forma dinâmica a diferentes microambientes e fatores de crescimento.

Em relação ao comportamento das células tumorais, nos ensaios de migração e proliferação, foi possível observar um importante efeito dos fatores de crescimento. Sabendo que esses fatores estão presentes nos diferentes microambientes

desafiados por essas células no processo de invasão e metástase, esses resultados demonstram que seus efeitos no maquinário celular são complexos e afetam múltiplos processos.

Em relação à migração celular, foi possível observar visualmente um maior fechamento das feridas em todos os fatores e concentrações avaliados, comparados com o controle após 27h, conforme ilustrado na Figura 5.6. Contudo, a análise estatística apresentou resultados significantes apenas para o VEGF na concentração de 10ng/ml ($p=0,0001$ para 3h; $p=0,00004$ para 6h e $p=0,01$ para 24h). O controle veículo do VEGF apresentou diferença estatisticamente significativa no intervalo de 24h ($p=0,01$). Isso pode indicar que os fatores de crescimento possuem pouca influência sobre a capacidade migratória das células. Porém mais estudos e ensaios são necessários para confirmar essa hipótese, uma vez que alguns fatores e concentrações apresentaram um maior desvio-padrão, o que pode influenciar na análise.

Já os resultados da análise do ensaio de proliferação apresentaram resultados estatisticamente significantes para o FGF a partir das 48 horas e para o NGF a partir de 72 horas, indicando um efeito proliferativo desses fatores sobre as células tumorais. Os resultados nesses intervalos de tempo maiores parecem indicar que o efeito de estímulo proliferativo desses fatores parece acontecer mais tardiamente. Cabe ressaltar que os resultados expressivos do controle do veículo utilizado no preparo do FGF chamam a atenção, podendo indicar alguma interferência no comportamento celular, e não apenas efeito do fator isoladamente. São necessários mais ensaios e estudos para confirmar as alterações observadas.

Existem poucos dados na literatura de estudos experimentais analisando efeitos do FGF no CCE oral (68). Esse fator de crescimento parece estar envolvido com a transformação maligna, proliferação e migração das células tumorais, mas são necessários mais estudos experimentais para embasar essa hipótese (69). Em relação ao VEGF, é bem estabelecido o seu efeito na angiogênese e migração de células endoteliais, mas pouco se sabe sobre o seu efeito nas células tumorais (28).

Além do provável efeito proliferativo observado em nossos resultados, já foi demonstrado que o NGF possui efeito no aumento da sobrevivência das células de CCE oral (25). Esse mesmo estudo identificou que as células tumorais parecem ter a capacidade de sintetizar o NGF, mantendo um *feedback* autócrino para esse fator de crescimento. Em outros tipos de câncer foi identificado que o NGF promove a

proliferação, invasão, migração, induz a sintetização de VEGF e reorganização do citoesqueleto celular (70–72).

Em relação às outras proteínas analisadas neste trabalho, a análise imunoistoquímica simples para D2-40 e CD31 revelou uma alta densidade de vasos sanguíneos e linfáticos no interior da massa tumoral, conforme ilustrado na seção de Resultados, sugerindo que o processo de invasão pode ser frequentemente subnotificado. Isso ocorre porque essas estruturas são delicadas e muitas vezes não são facilmente visualizadas na coloração HE, que é comumente utilizada para diagnóstico e estadiamento da doença. Diversos estudos já demonstraram que a análise imunoistoquímica para CD31, D2-40 e S-100 aumenta as taxas de detecção dos diferentes tipos de invasão(23). A utilização dessa ferramenta em centros diagnósticos deve ser considerada, tendo em vista o custo-benefício no diagnóstico e estadiamento mais preciso, orientando a tomada de decisões terapêuticas mais efetivas e conseqüentemente otimizando o uso de recursos nessa área.

Inicialmente, os marcadores D2-40 e S-100 seriam utilizados para identificar vasos linfáticos e nervos, respectivamente, para detalhar as regiões de invasão. Com o desenvolvimento do trabalho foi possível identificar a expressão dessas duas proteínas também nas células tumorais. Ainda que não fosse o foco inicial do trabalho, decidimos incluir essa expressão nas células tumorais como mais uma variável a ser analisada. Observamos a expressão positiva do D2-40 nas células tumorais em 97% (n=28) dos tumores primários e 45% das metástases regionais, enquanto o S-100 foi encontrado nas células tumorais de 41% (n=12) dos tumores primários e 55% das metástases regionais (n=11).

A expressão positiva do D2-40 pôde ser observada em dois padrões distintos: expressão positiva disseminada nas células tumorais, ou apenas nas células da periferia das ilhas de células tumorais. Esses diferentes padrões já foram descritos na literatura, com a hipótese de que o padrão de expressão na periferia das ilhas tumorais está relacionado ao processo de migração coletiva (73). Um trabalho recente relatou a expressão dessa proteína em queratinócitos da camada basal do epitélio normal e epitélio displásico da cavidade oral, enquanto no CCE foi observada uma expressão mais difusa, sendo mais frequente em CCEs pouco diferenciados (22). Em nosso trabalho observamos a expressão do D2-40 em todos os graus de diferenciação, sem associações entre o padrão de expressão e variáveis histopatológicas, como o grau de diferenciação.

Também já foi relatado na literatura um aumento de expressão dessa proteína na frente de invasão tumoral (74). Isso pode ser explicado pelo seu forte envolvimento nos mecanismos de motilidade celular, mediada pelo remodelamento do citoesqueleto e participação em cascatas envolvidas nos movimentos contráteis dos filamentos de actina(75), condizendo com as características diferenciadas dessa população específica de células tumorais.

Embora em nosso trabalho não foi possível encontrarmos associação entre a expressão do D2-40 e presença de metástases, é importante destacar que observamos alteração na expressão dessa proteína em 45% (n=9) das metástases regionais, com mudança no padrão de expressão ou perda de expressão. Isso reforça indícios de uma importante participação dessa proteína no processo de migração e estabelecimento de metástases, com mudança de expressão frente a novos microambientes. Em CCE de lábio foi encontrada associação entre a expressão do D2-40 e o desenvolvimento de recidivas e metástases(76), e em CCE esôfago foi encontrada associação entre a expressão dessa proteína, presença de metástases e menor sobrevida (77).

A expressão do D2-40 possui relatos na literatura de ser um indicador de pior prognóstico do CCE oral e tem sido investigada como possível candidata para o desenvolvimento de terapias-alvo(78,79). Em nossa amostra não encontramos associações entre a expressão dessa proteína e variáveis clínicas e prognósticas da doença. Isso pode ter acontecido pelas limitações amostrais já comentadas anteriormente.

Em relação ao S-100, sua expressão é notada em nervos, células dendríticas e células tumorais, conforme observado em nossa amostra e ilustrado na seção de Resultados. S-100 compreende uma família de 21 proteínas que, além da expressão em tecidos neurais, modula processos de homeostase celular, proliferação, motilidade, ciclo celular e resposta inflamatória (80–82). Os genes que regulam a expressão dessa proteína estão no mesmo *cluster* que outros marcadores epiteliais, como as citoqueratinas e involucrina, indicando uma possível interação entre essas proteínas(83).

A expressão do S-100 em células tumorais de CCE oral já foi identificada em análises proteômicas (63,84). Alterações no padrão de expressão dos subtipos de S-100 já foram observadas em diversos tipos de câncer, e são utilizados como marcadores diagnósticos, prognósticos e de resposta ao tratamento, além de terapias-

alvo(82). Especificamente o S-100A4 possui relação bem estabelecida com o processo de metástase, pelo aumento da motilidade celular, invasão, angiogênese e indução de transição epitélio-mesênquima, validada por diversos estudos experimentais (85).

Alguns subtipos específicos de S-100 foram investigados em CCE oral. S-100A13 está relacionado a um pior prognóstico da doença e resistência à quimioterapia(80). S-100A7 foi associado à proliferação celular e inibição da diferenciação (83). S-100A2 é um importante supressor tumoral, com a capacidade de ativar a atividade transcricional de p53, restaurando funções do ciclo celular e apoptose (86). S-100A4 diminui a expressão de E-caderina e promove a expressão de VEGF via ativação transcricional(81), além de ter sido associado com metástase e recidiva (87).

Em nossa amostra não encontramos associação entre a expressão do S-100 nos tumores primários e variáveis clínicas ou histopatológicas, mas encontramos associação entre linfonodos positivos para S-100 em casos bem diferenciados e negativo em casos pouco diferenciados ($p=0,013$). Esse achado pode indicar não só o envolvimento dessa proteína no grau de diferenciação das células tumorais, como também no processo de metástase. Outro achado interessante que reforça essa hipótese foi a alteração na expressão dessa proteína nas células tumorais das metástases regionais em 55% ($n=11$) dos casos, com notável ganho de expressão.

Analisando globalmente os resultados encontrados neste trabalho, foi possível observar evidências de uma mudança significativa na expressão de citoqueratinas pelas células tumorais sob influência de diferentes microambientes no processo de invasão e metástase, e estimuladas por diferentes fatores de crescimento. Investigando as metástases regionais, também foi observada uma mudança significativa na expressão das citoqueratinas em relação ao tumor primário. Apenas um caso manteve o padrão de expressão semelhante; todos os outros tiveram perda ou ganho de expressão de uma ou mais proteínas analisadas. Esses resultados fornecem evidências que as células tumorais de fato possuem uma plasticidade e dinâmica do seu citoesqueleto, provavelmente modulada por interações complexas nos diferentes microambientes.

Além disso, foi possível observar indícios de um importante envolvimento do D2-40 e S-100 no processo de invasão e metástase, corroborando outros achados relatados na literatura. Todas essas alterações parecem sofrer intensa influência dos

diferentes microambientes desafiados pelas células tumorais nas etapas de invasão e metástase. Os fatores de crescimento analisados neste trabalho também parecem influenciar os mecanismos migratórios e proliferativos das células. São necessários mais estudos para confirmar e esclarecer esses achados.

A investigação das possíveis alterações do citoesqueleto das células tumorais no CCE oral é uma possibilidade interessante e ampla a ser investigada, e este trabalho exploratório fornece importantes indícios a serem aprofundados. A expressão das citoqueratinas analisadas variou amplamente nos diferentes microambientes analisados, sofrendo alterações importantes na presença de fatores de crescimento, evidenciando que seus mecanismos na evolução da doença são altamente complexos e dinâmicos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho fornecem evidências de uma alteração no padrão de expressão das citoqueratinas em comparação com o padrão de expressão descrito nos tecidos normais, refutando a hipótese de que o CCE oral mantém a expressão dessas proteínas semelhante ao epitélio de origem. As metástases regionais apresentaram, em sua maioria, alteração na expressão das proteínas analisadas em comparação com o tumor primário. Isso indica uma importante influência dos microambientes na cascata de invasão e metástase no remodelamento do citoesqueleto das células tumorais, tendo como consequência possíveis alterações funcionais na célula. Os resultados dos experimentos *in vitro* sob estímulo dos fatores de crescimento FGF, NGF e VEGF, que são frequentemente presentes em regiões de invasão angiolímfática e perineural, reforçam essa hipótese, tendo sido observado aumento no número de células positivas e intensidade de expressão das CKs 14, 16 e 18.

Os tumores de língua e assoalho bucal apresentaram, em geral, expressão para as citoqueratinas primárias do epitélio (CKs 5/14), com alguns casos apresentando redução ou perda de sua expressão. As citoqueratinas específicas do epitélio desses tecidos (CK10 e CK13) e a CK16 apresentaram alteração no seu padrão de expressão em comparação com o padrão normal, bem como foi observada a positividade de citoqueratinas de epitélio simples (CKs 7, 18 e 19) que não aparecem na mucosa normal. Também foi possível observar expressão positiva dos marcadores D2-40 e S-100 nas células tumorais, sendo que essas proteínas não aparecem nos queratinócitos normais da mucosa.

Foram encontradas associações entre expressão de CK16 negativa e focal e casos com invasão perineural ($p=0,0001$); CK19 positiva e focal e casos com invasão perineural ($p=0,038$) e recidiva nos casos positivos em relação aos focais e aos negativos ($p=0,014$). Isso fornece evidências de um possível uso dessas proteínas como biomarcadores prognósticos, o que é reforçado por outros trabalhos na literatura. Também foram encontradas diversas associações entre a expressão dessas proteínas em metástases regionais e variáveis clínicas, prognósticas e

histopatológicas. O padrão histológico da frente de invasão não apresentou associações com variáveis clínicas e prognósticas em nossa amostra.

As alterações relativas às citoqueratinas observadas nos ensaios *in vitro* foram mais expressivas período de incubação de 24h, sugerindo um intenso mecanismo adaptativo das células tumorais nas primeiras horas em um novo microambiente. Foi observado um aumento significativo da migração celular sob estímulo do VEGF, mas é necessário investigar a influência do veículo utilizado no preparo deste fator. As taxas de proliferação apresentaram um aumento significativo sob estímulo do FGF e NGF, mas apenas após o período de 48 horas e 72 horas, sugerindo que este processo acontece mais tardiamente na presença destes fatores.

REFERÊNCIAS¹

1. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
2. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. Vol. 45, *Oral Oncology*. 2009. p. 301–8.
3. Noguti J, Moura CFG de, Jesus GPP de, Silva VHP da, Hossaka TA, Oshima CTF, et al. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. *Cancer Genomics Proteomics* [Internet]. 2012;9(5):329–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990112>
4. Neville BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(4):195–215.
5. Frohwitter G, Buerger H, van Diest PJ, Korsching E, Kleinheinz J, Fillies T. Cytokeratin and protein expression patterns in squamous cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. *Oncol Lett*. 2016;12(1):107–13.
6. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. Vol. 6, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Research; 2020.
7. Casati M, Altieri J, Vergnhanini G, Contreiro P, Bedenko T, Kanda J. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2012;41(4):186–91.
8. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):51–64.
9. Farhood Z, Simpson M, Ward GM, Walker RJ, Osazuwa-Peters N. Does anatomic subsite influence oral cavity cancer mortality? A SEER database analysis. *Laryngoscope*. 2019 Jun 1;129(6):1400–6.
10. Ho AS, Kim S, Tighiouart M, Gudino C, Mita A, Scher KS, et al. Metastatic lymph node burden and survival in oral cavity cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(31):3601–9.
11. Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, et al. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2019;99(December 2018):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.007>
12. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Jan 20;23(1):e23–9.
13. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* [Internet]. 2014;8(1):7–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4063640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. Vol. 107, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2020.

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

15. Speight PM, Farthing PM. The pathology of oral cancer. *Br Dent J*. 2018;225(9):841–7.
16. Slootweg P, Eveson J. CHAPTER 4 WHO classification of tumours of the oral cavity and oropharynx. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 2005;435.
17. Neville B w., Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
18. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: Biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(6):705–33.
19. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. WHO Classification of Tumour. 2005;(9):163–75.
20. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, Washington M, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edition. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
21. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE. Mechanisms of invasion in head and neck cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(11):1334–48.
22. Barrett AW, Pratt MK, Sassoon I, Bisase BS, Newman L, Tighe J v., et al. Perineural and lymphovascular invasion in squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [Internet]. 2021 Jan 14;50(1):32–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jop.13104>
23. Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, Yamada S, Naruse T, Sakamoto Y, et al. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):543–8.
24. Kolokythas A, Cox DP, Dekker N, Schmidt BL. Nerve Growth Factor and Tyrosine Kinase A Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma: Is There an Association With Perineural Invasion? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010 Jun;68(6):1290–5.
25. Dudás J, Dietl W, Romani A, Reinold S, Glueckert R, Schrott-Fischer A, et al. Nerve growth factor (NGF)—receptor survival axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 14;19(6).
26. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Mar;36(3):263–6.
27. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med J Oral Pathol Med*. 2001;30:449–57.
28. Shemirani B, Crowe DL. Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/oraloncology
29. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
30. Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4).
31. Paramio JM, Jorcano JL. Beyond structure: Do intermediate filaments modulate cell signalling? *BioEssays*. 2002;24(9):836–44.
32. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* [Internet]. 1982 Nov;31(1):11–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867482904007>

33. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40(5):403–39.
34. Deo PN, Deshmukh R. Pathophysiology of keratinization. 2018;22(1):86–91.
35. Rao RS, Patil S, Ganavi B. Oral Cytokeratins in Health and Disease. Patil SG, editor. *J Contemp Dent Pract [Internet]*. 2014;15(1):127–36. Available from: <http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=5984&Type=FREE&TYP=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=451&isPDF=YES>
36. Ruggiero C, Lalli E. Targeting the cytoskeleton against metastatic dissemination. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09936-0>
37. Fulzele A, Malgundkar SA, Govekar RB, Patil A, Kane S v., Chaturvedi P, et al. Proteomic profile of keratins in cancer of the gingivo buccal complex: Consolidating insights for clinical applications. *J Proteomics [Internet]*. 2013;91:242–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.07.011>
38. Woods RSR, Callanan D, Jawad H, Molony P, Werner R, Heffron C, et al. Cytokeratin 7 and 19 expression in oropharyngeal and oral squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2022 Mar 1;279(3):1435–43.
39. Shahabinejad M, Zare R, Mohajertehran F, Mahdiraji AA. Cytokeratins (CK7 and CK20) Genes Expression Association with Clinicopathological Indices in Oral Squamous Cell Carcinoma and Dysplastic Oral Epithelium [Internet]. Vol. 10, *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 2021. Available from: www.RBMB.net
40. de Almeida HL. Cytokeratins. *An Bras Dermatol*. 2004;79(2):135–45.
41. Ali AA, Al-Jandan BA, Suresh CS. The importance of citokeratins in the early detection of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and Maxillofacial Pathology*. 2018;22 (3):441.
42. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda Mde L, Ramos CC, Freitas Rde A et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol*. 2007;15:376–83.
43. Yanagawa T, Yoshida H, Yamagata K, Onizawa K, Tabuchi K, Koyama Y, et al. Loss of cytokeratin 13 expression in squamous cell carcinoma of the tongue is a possible sign for local recurrence. *J Exp Clin Cancer Res*. 2007 Jun;26(2):215–20.
44. Pandey S, Sølrand TM, Bjerkli IH, Sand LP, Petersen FC, Costea DE, et al. Combined loss of expression of involucrin and cytokeratin 13 is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of mobile tongue. *Head Neck*. 2021 Nov 1;43(11):3374–85.
45. Hosoya A, Kwak S, Kim EJ, Lunny DP, Birgitte Lane E, Cho SW, et al. Immunohistochemical Localization of Cytokeratins in the Junctional Region of Ectoderm and Endoderm. *Anatomical Record*. 2010;293(11):1864–72.
46. Yoshida K, Sato K, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY, Katakura A. Expression of Cytokeratin 14 and 19 in Process of Oral Carcinogenesis. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2015;56(2):105–11.
47. Omary MB, Ku NO, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation; 2009. p. 1794–805.
48. Raul U, Sawant S, Dange P, Kalraiya R, Ingle A, Vaidya M. Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: Induction of transformed phenotype. *Int J Cancer*. 2004;111(5):662–8.

49. Ernst J, Ikenberg K, Apel B, Schumann DM, Huber G, Studer G, et al. Expression of CK19 is an independent predictor of negative outcome for patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Nov 15;7(46):76151–8. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.12691>
50. Afrem M cătălin, Crăițoiu Ș, Hîncu M cezarina, Octavian Manolea H, Nicolae V, Mihaela Crăițoiu M. Study of CK18 and GDF5 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma and their prognostic value. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):167–72.
51. Depondt J, Shabana AH, Sawaf H, Gehanno P FN. Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study. *Eur J Oral Sci*. 1999;107:442–54.
52. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007 Mar;2(2):329–33.
53. Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. Validation of the Risk Model : High-Risk Classification and Tumor Pattern of Invasion Predict Outcome for Patients with Low-Stage Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. 2013;211–23.
54. Ali AA, Al-Jandan BA, Suresh CS. The importance of cytokeratins in the early detection of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 22(3):441. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30651696>
55. Sanguansin S, Kosanwat T, Juengsomjit R, Poomsawat S. Diagnostic Value of Cytokeratin 17 during Oral Carcinogenesis: An Immunohistochemical Study. Gadbail A, editor. *Int J Dent* [Internet]. 2021 Nov 22;2021:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijd/2021/4089549/>
56. Mehrpouya M, Pourhashem Z, Yardehnavi N, Oladnabi M. Evaluation of cytokeratin 19 as a prognostic tumoral and metastatic marker with focus on improved detection methods. Vol. 234, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 21425–35.
57. Beil M, Micoulet A, von Wichert G, Paschke S, Walther P, Omary MB, et al. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and viscoelastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2003 Sep 1;5(9):803–11.
58. Vaidya MM, Borges AM, Pradhan SA, Bhisey AN. Cytokeratin expression in squamous cell carcinomas of the tongue and alveolar mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Sep;32(5):333–6.
59. Sawant SS, Naresh KN, D’Cruz A, Ogale SB, Vaidya MM. Demonstration of cytokeratin-5 non-expression in tobacco related oral carcinogenesis - Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction as a sensitive assay. *Oral Oncol*. 2003 Dec;39(8):789–95.
60. Gao XL, Wu JS, Cao MX, Gao SY, Cen X, Jiang YP, et al. Cytokeratin-14 contributes to collective invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS One*. 2017 Feb 1;12(2).
61. Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2011 Nov 1;22(21):4068–78.
62. Nguyen TQ, Hamada A, Yamada K, Higaki M, Shintani T, Yoshioka Y, et al. Enhanced KRT13 gene expression bestows radiation resistance in squamous cell carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021 Mar 1;57(3):300–14.

63. Thiel UJE, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R, et al. Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2011;40(5):369–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166718>
64. Vaidya MM, Sawant SS, Borges AM, Naresh NK, Purandare MC, Bhisey AN. Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa. Vol. 25, *J. Biosci. |*. 2000.
65. Jafari M, Hasanzadeh M. Non-invasive bioassay of Cytokeratin Fragment 21.1 (Cyfra 21.1) protein in human saliva samples using immunoreaction method: An efficient platform for early-stage diagnosis of oral cancer based on biomedicine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020 Nov 1;131.
66. AlAli AM, Walsh T, Maranzano M. CYFRA 21-1 and MMP-9 as salivary biomarkers for the detection of oral squamous cell carcinoma: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2020 Aug;49(8):973–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502720300369>
67. Rathore A, Katyal S, Jain A, Shetty D. Biochemical analysis of cytokeratin fragment 21-1 concentration and expression of cytokeratin 19 in oral potentially malignant disorders. *J Cancer Res Ther*. 2020 Apr 1;16(3):452–7.
68. Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1994 Nov;23(10):451–6.
69. Mariz BALA, Soares CD, de Carvalho MGF, Jorge-Júnior J. FGF-2 and FGFR-1 might be independent prognostic factors in oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2019 Jan 1;74(2):311–20.
70. Retamales-Ortega R, Oróstica L, Vera C, Cuevas P, Hernández A, Hurtado I, et al. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 26;18(3):507.
71. Jiang J, Bai J, Qin T, Wang Z, Han L. NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway. *J Cell Mol Med*. 2020 May 15;24(10):5901–10.
72. Lin H, Huang H, Yu Y, Chen W, Zhang S, Zhang Y. Nerve growth factor regulates liver cancer cell polarity and motility. *Mol Med Rep*. 2021 Feb 19;23(4):288.
73. Kashyap B, Babu G, Kumar G, Manyam R, Prasad B. Expression of podoplanin in different grades of oral squamous cell carcinoma. *Ann Med Health Sci Res*. 2015;5(4):299.
74. Rolim LSA, Mafra RP, Santos HB de P, de Souza LB, Pinto LP. Role of twist and podoplanin in partial epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Braz Dent J*. 2020 Nov 1;31(6):623–33.
75. Li YY, Zhou CX, Gao Y. Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases [Internet]. Vol. 5, *Am J Cancer Res*. 2015. Available from: www.ajcr.us/
76. Assao A, Nonogaki S, Lauris JRP, Carvalho AL, Pinto CAL, Soares FA, et al. Podoplanin, ezrin, and Rho-A proteins may have joint participation in tumor invasion of lip cancer. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun 1;21(5):1647–57.
77. Chuang WY, Chang YS, Yeh CJ, Wu YC, Hsueh C. Role of podoplanin expression in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract. *Histol Histopathol*. 2013;28(3):293–9.

78. Retzbach EP, Sheehan SA, Nevel EM, Batra A, Phi T, Nguyen ATP, et al. Podoplanin emerges as a functionally relevant oral cancer biomarker and therapeutic target. *Oral Oncol* [Internet]. 2018;78(December 2017):126–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.01.011>
79. Krishnan H, Rayes J, Miyashita T, Ishii G, Retzbach EP, Sheehan SA, et al. Podoplanin: An emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci*. 2018;109(5):1292–9.
80. Li R, Li W, He F, Zhang M, Luo H, Tang H. Systematic screening identifies a TEAD4-S100A13 axis modulating cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2021 Oct 1;50(9):882–90.
81. Moriyama-Kita M, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Miyamori H, Sato H, et al. S100A4 regulates E-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2005 Dec 18;230(2):211–8.
82. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. Vol. 15, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2015. p. 96–109.
83. Qi Z, Li T, Kong F, Li Y, Wang R, Wang J, et al. The characteristics and function of S100A7 induction in squamous cell carcinoma: Heterogeneity, promotion of cell proliferation and suppression of differentiation. *PLoS One*. 2015 Jun 8;10(6).
84. Roman E, Lunde MLS, Miron T, Warnakulasauriya S, Johannessen AC, Vasstrand EN, et al. Analysis of protein expression profile of oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF-MS. *Anticancer Res*. 2013;33(3):837–46.
85. Boye K, Mælandsmo GM. S100A4 and metastasis: A small actor playing many roles. Vol. 176, *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc.; 2010. p. 528–35.
86. Muelleri A, Schäfer BW, Ferrari S, Weibel M, Makek M, Höchli M, et al. The Calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Aug 12;280(32):29186–93.
87. Natarajan J, Hunter K, Mutalik VS, Radhakrishnan R. Overexpression of S100A4 as a biomarker of metastasis and recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science*. 2014;22(5):426–33.

APÊNDICE A – Resultado da imunexpressão das proteínas analisadas nos tumores primários

Caso	CK5	CK7	CK10	CK13	CK14	CK16	CK18	CK19	CD31	D2-40 tumor	S-100 tumor
1	+	-	FOCAL	FOCAL	+	+	-	FOCAL	+	+	-
2	+	-	FOCAL	FOCAL	+	+	-	+	+	+ PERIF	+
3	+	FOCAL	FOCAL	-	+	FOCAL	-	+	+	+ PERIF	-
4	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	-	+	+	+	-
5	+	+	-	-	FOCAL	-	FOCAL	+	+	+ PERIF	-
6	+	-	-	FOCAL	+	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	+	-
7	+	-	FOCAL	FOCAL	+	FOCAL	-	+	+	+	-
8	+	-	-	FOCAL	+	FOCAL	-	FOCAL	+	+	+
9	FOCAL	+	FOCAL	-	FOCAL	-	+	+	+	+	-
10	+	-	FOCAL	FOCAL	+	-	-	FOCAL	+	+	-
11	+	X	FOCAL	-	+	FOCAL	FOCAL	+	+	-	-
12	+	-	FOCAL	-	+	+	-	-	+	+ PERIF	+
13	+	FOCAL	FOCAL	-	+	FOCAL	-	+	+	+	-
14	+	X	FOCAL	X	+	FOCAL	-	FOCAL	+	+	+
15	+	+	FOCAL	-	FOCAL	-	+	+	+	+	+
16	+	-	-	-	+	FOCAL	-	-	+	+ PERIF	-
17	+	X	FOCAL	X	+	+	FOCAL	FOCAL	+	+	+
18	+	-	-	X	+	+	-	-	+	+ PERIF	-
19	FOCAL	-	-	-	-	FOCAL	+	+	+	+	-
20	+	X	FOCAL	X	+	-	FOCAL	-	+	+ PERIF	-
21	+	-	-	-	+	+	FOCAL	FOCAL	+	+	-
22	+	-	-	+	+	FOCAL	+	+	+	+	+
23	+	-	FOCAL	-	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	+	+ PERIF	+
24	+	-	FOCAL	-	+	+	-	FOCAL	+	+ PERIF	+
25	+	-	FOCAL	-	FOCAL	FOCAL	+	+	+	+ PERIF	+
26	+	-	FOCAL	FOCAL	+	+	-	FOCAL	+	+ PERIF	+
27	+	-	FOCAL	-	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	+	+ PERIF	+
28	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	+ PERIF	+
29	+	X	FOCAL	-	+	FOCAL	+	+	+	+	X

+ = expressão positiva / - = expressão negativa / FOCAL = expressão em pequenos grupos de células / + PERIF = expressão nas células tumorais da camada mais externa / x = reação não realizada
 Fonte: A autora.

APÊNDICE B – Resultado da imunopressão das proteínas analisadas nas metástases regionais

Caso	CK5	CK7	CK10	CK13	CK14	CK16	CK18	CK19	D2-40 células tumorais	S-100 células tumorais
1	+	-	FOCAL	-	+	+	-	-	+	+
2	+	-	-	FOCAL	+	+	+	+	+ PERIF	+
4	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	+	+	+	-
5	+	+	-	-	FOCAL	-	+	+	+ PERIF	-
7	+	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	-	+	+	+	FOCAL
8	FOCAL	-	FOCAL	FOCAL	+	FOCAL	+	+ PERIF	+	FOCAL
9	+	FOCAL	+	FOCAL	+ PERIF	FOCAL	+	FOCAL	+	FOCAL
10	+	+	FOCAL	+	FOCAL	FOCAL	+	+	+	FOCAL
11	+ PERIF	-	FOCAL	-	+ PERIF	FOCAL	+	+	-	-
12	+	-	+ PERIF	-	+	+	-	-	+ PERIF	+
13	+	+	+	-	+	FOCAL	+	+	+	FOCAL
14	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	FOCAL	FOCAL	+	-
15	+	X	+	-	-	FOCAL	+	+	+	FOCAL
16	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	+	-	+ PERIF	+
22	+	-	FOCAL	+	FOCAL	FOCAL	+	+	+	-
24	+	-	FOCAL	-	+	+	-	FOCAL	+ PERIF	+
26	+	FOCAL	FOCAL	+	+	+	-	FOCAL	+ PERIF	+
27	+	-	FOCAL	-	+ PERIF	FOCAL	-	-	+ PERIF	+
28	+	-	FOCAL	-	+	FOCAL	-	FOCAL	+ PERIF	-
29	+	-	FOCAL	-	-	-	+	+	+	-

+ = expressão positiva / - = expressão negativa / FOCAL = expressão em pequenos grupos de células / + PERIF = expressão nas células da camada mais externa das ilhas de células tumorais / x = reação não realizada / **vermelho** = alteração na expressão comparado com o tumor primário

Fonte: A autora.

APÊNDICE C

ENSAIO DE MIGRAÇÃO - TESTES DE NORMALIDADE

Tabela 1: Dados estatísticos em 0 hora

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variacão	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
FGF10	1.943	0.092	1.943	0.047	1.839 a 2.047	1.000
FGF20	1.708	0.398	1.901	0.233	1.257 a 2.159	0.173
FGF40	1.788	0.074	1.789	0.041	1.705 a 1.871	0.977
FGF VEÍC.	1.953	0.066	1.973	0.034	1.878 a 2.028	0.495
CONTROLE	1.862	0.091	1.854	0.049	1.760 a 1.965	0.848
VEGF10	0.973	0.281	0.971	0.289	0.655 a 1.291	0.988
VEGF20	1.631	0.095	1.643	0.058	1.523 a 1.738	0.785
VEGF40	1.837	0.071	1.846	0.039	1.757 a 1.917	0.790
VEGF VEÍC.	1.481	0.158	1.547	0.107	1.302 a 1.660	0.291
NGF10	2.001	0.039	1.994	0.019	1.957 a 2.045	0.702
NGF20	1.726	0.058	1.753	0.034	1.660 a 1.791	0.198
NGF40	1.802	0.307	1.934	0.170	1.455 a 2.149	0.269
NGF VEÍC.	1.768	0.199	1.668	0.112	1.543 a 1.993	0.139

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

Tabela 2: Dados estatísticos em 3 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variacão	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
FGF10	1.861	0.090	1.831	0.048	1.759 a 1.963	0.449
FGF20	1.593	0.339	1.764	0.213	1.210 a 1.977	0.138
FGF40	1.686	0.012	1.684	0.007	1.673 a 1.700	0.668
FGF VEÍC.	1.925	0.095	1.970	0.049	1.818 a 2.032	0.182
CONTROLE	1.750	0.149	1.790	0.085	1.581 a 1.918	0.547
VEGF10	0.822	0.350	0.669	0.426	0.426 a 1.219	0.257
VEGF20	1.549	0.063	1.523	0.041	1.478 a 1.620	0.304
VEGF40	1.663	0.122	1.635	0.073	1.525 a 1.801	0.613
VEGF VEÍC.	1.382	0.200	1.372	0.144	1.156 a 1.608	0.914
NGF10	1.902	0.041	1.889	0.021	1.856 a 1.948	0.476
NGF20	1.604	0.061	1.610	0.038	1.535 a 1.672	0.827
NGF40	1.700	0.324	1.836	0.191	1.333 a 2.066	0.287
NGF VEÍC.	1.675	0.144	1.599	0.086	1.512 a 1.838	0.093

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição norma

Tabela 3: Dados estatísticos em 6 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coefficiente_de_Varição	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
FGF10	1.740	0.066	1.718	0.038	1.666 a 1.814	0.439
FGF20	1.453	0.333	1.606	0.229	1.076 a 1.829	0.216
FGF40	1.546	0.026	1.537	0.017	1.517 a 1.575	0.412
FGF VEÍC.	1.740	0.068	1.719	0.039	1.664 a 1.817	0.471
CONTROLE	1.601	0.135	1.660	0.084	1.448 a 1.754	0.255
VEGF10	0.718	0.288	0.608	0.401	0.392 a 1.044	0.357
VEGF20	1.423	0.115	1.402	0.081	1.292 a 1.553	0.703
VEGF40	1.510	0.128	1.497	0.085	1.365 a 1.655	0.832
VEGF VEÍC.	1.166	0.085	1.188	0.073	1.071 a 1.262	0.573
NGF10	1.727	0.026	1.736	0.015	1.698 a 1.756	0.412
NGF20	1.512	0.068	1.479	0.045	1.435 a 1.589	0.169
NGF40	1.516	0.305	1.673	0.201	1.171 a 1.861	0.119
NGF VEÍC.	1.544	0.086	1.556	0.055	1.447 a 1.641	0.768

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal

Tabela 4: Dados estatísticos em 24 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Varição	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
FGF10	0.632	0.205	0.713	0.324	0.400 a 0.863	0.328
FGF20	0.362	0.239	0.430	0.659	0.092 a 0.633	0.526
FGF40	0.558	0.086	0.577	0.154	0.461 a 0.655	0.624
FGF VEÍC.	0.595	0.091	0.573	0.154	0.491 a 0.698	0.605
CONTROLE	0.707	0.244	0.788	0.345	0.431 a 0.983	0.443
VEGF10	0.150	0.122	0.126	0.814	0.012 a 0.289	0.669
VEGF20	0.504	0.099	0.558	0.196	0.392 a 0.616	0.058
VEGF40	0.643	0.071	0.631	0.111	0.563 a 0.724	0.713
VEGF VEÍC.	0.152	0.048	0.162	0.314	0.098 a 0.206	0.652
NGF10	0.934	0.115	0.889	0.123	0.804 a 1.064	0.334
NGF20	0.618	0.126	0.688	0.203	0.476 a 0.760	0.038
NGF40	0.479	0.246	0.613	0.514	0.201 a 0.757	0.062
NGF VEÍC.	0.854	0.222	0.781	0.260	0.603 a 1.106	0.447

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, com exceção da variável NGF20 que apresentou valor de Significância (p) = 0.038.

Tabela 5: Dados estatísticos em 27 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Varição	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
FGF10	0.601	0.080	0.593	0.133	0.511 a 0.692	0.827
FGF20	0.327	0.315	0.351	0.965	-0.030 a 0.683	0.872
FGF40	0.521	0.063	0.547	0.121	0.450 a 0.592	0.304
FGF VEÍC.	0.614	0.027	0.627	0.044	0.583 a 0.645	0.177
CONTROLE	0.587	0.258	0.609	0.440	0.294 a 0.879	0.857
VEGF10	0.051	0.088	0.000	1.732	-0.049 a 0.150	0.000
VEGF20	0.111	0.192	0.000	1.732	-0.107 a 0.329	0.000
VEGF40	0.376	0.028	0.381	0.074	0.344 a 0.408	0.702
VEGF VEÍC.	0.087	0.151	0.000	1.732	-0.084 a 0.258	0.000
NGF10	0.575	0.525	0.699	0.912	-0.018 a 1.169	0.607
NGF20	0.496	0.224	0.560	0.451	0.243 a 0.749	0.519
NGF40	0.303	0.191	0.254	0.629	0.087 a 0.519	0.569
NGF VEÍC.	0.000	0.000	0.000	NaN	0.000 a 0.000	NA

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, com exceção das variáveis VEGF10, VEGF20, VEGF VEÍC. que apresentaram valores de Significância (p) = 0.0000 e a variável NGF VEÍC. que apresentou Significância (p) inconclusiva.

ENSAIO DE MIGRAÇÃO – TESTES ANOVA E TESTES *POST-HOC* (TUKEY'S HSD)

Tabela 6: Resultado do teste ANOVA em 0 hora

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(.F)
group	12	2.5590	0.21325	6.276	4.62e-05
Residuals	26	0.8834	0.03398		

Tabela 7: Testes *post-hoc* (Tukey's HSD)

\$group	diff	lwr	upr	padj
FGF20-FGF10	-0.23500000	-0.78194974	0.3119497	0.9265161
FGF40-FGF10	-0.15500000	-0.70194974	0.3919497	0.9971106
FGF VEÍC.-FGF10	0.01000000	-0.53694974	0.5569497	1.0000000
CONTROLE-FGF10	-0.08066667	-0.62761640	0.4662831	0.9999964
NGF10-FGF10	0.05800000	-0.48894974	0.6049497	0.9999999
NGF20-FGF10	-0.21733333	-0.76428307	0.3296164	0.9562764
NGF40-FGF10	-0.14133333	-0.68828307	0.4056164	0.9987678
NGF VEÍC.-FGF10	-0.17500000	-0.72194974	0.3719497	0.9917024
VEGF10-FGF10	-0.97000000	-1.51694974	-0.4230503	0.0000503
VEGF20-FGF10	-0.31233333	-0.85928307	0.2346164	0.6782866
VEGF40-FGF10	-0.10600000	-0.65294974	0.4409497	0.9999305
VEGF VEÍC.-FGF10	-0.46233333	-1.00928307	0.0846164	0.1597244
FGF40-FGF20	0.08000000	-0.46694974	0.6269497	0.9999967
FGF VEÍC.-FGF20	0.24500000	-0.30194974	0.7919497	0.9049151
CONTROLE-FGF20	0.15433333	-0.39261640	0.7012831	0.9972208
NGF10-FGF20	0.29300000	-0.25394974	0.8399497	0.7550860
NGF20-FGF20	0.01766667	-0.52928307	0.5646164	1.0000000
NGF40-FGF20	0.09366667	-0.45328307	0.6406164	0.9999813
NGF VEÍC.-FGF20	0.06000000	-0.48694974	0.6069497	0.9999999
VEGF10-FGF20	-0.73500000	-1.28194974	-0.1880503	0.0025276
VEGF20-FGF20	-0.07733333	-0.62428307	0.4696164	0.9999977
VEGF40-FGF20	0.12900000	-0.41794974	0.6759497	0.9994889
VEGF VEÍC.-FGF20	-0.22733333	-0.77428307	0.3196164	0.9407159
FGF VEÍC.-FGF40	0.16500000	-0.38194974	0.7119497	0.9949749
CONTROLE-FGF40	0.07433333	-0.47261640	0.6212831	0.9999985
NGF10-FGF40	0.21300000	-0.33394974	0.7599497	0.9620307
NGF20-FGF40	-0.06233333	-0.60928307	0.4846164	0.9999998
NGF40-FGF40	0.01366667	-0.53328307	0.5606164	1.0000000
NGF VEÍC.-FGF40	-0.02000000	-0.56694974	0.5269497	1.0000000
VEGF10-FGF40	-0.81500000	-1.36194974	-0.2680503	0.0006650
VEGF20-FGF40	-0.15733333	-0.70428307	0.3896164	0.9966960
VEGF40-FGF40	0.04900000	-0.49794974	0.5959497	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF40	-0.30733333	-0.85428307	0.2396164	0.6987169
CONTROLE-FGF VEÍC.	-0.09066667	-0.63761640	0.4562831	0.9999869
NGF10-FGF VEÍC.	0.04800000	-0.49894974	0.5949497	1.0000000
NGF20-FGF VEÍC.	-0.22733333	-0.77428307	0.3196164	0.9407159
NGF40-FGF VEÍC.	-0.15133333	-0.69828307	0.3956164	0.9976746
NGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.18500000	-0.73194974	0.3619497	0.9869197

VEGF10-FGF VEÍC.	-0.98000000	-1.52694974	-0.4330503	0.0000427
VEGF20-FGF VEÍC.	-0.32233333	-0.86928307	0.2246164	0.6366301
VEGF40-FGF VEÍC.	-0.11600000	-0.66294974	0.4309497	0.9998236
VEGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.47233333	-1.01928307	0.0746164	0.1405987
NGF10-CONTROLE	0.13866667	-0.40828307	0.6856164	0.9989715
NGF20-CONTROLE	-0.13666667	-0.68361640	0.4102831	0.9991049
NGF40-CONTROLE	-0.06066667	-0.60761640	0.4862831	0.9999999
NGF VEÍC.-CONTROLE	-0.09433333	-0.64128307	0.4526164	0.9999799
VEGF10-CONTROLE	-0.88933333	-1.43628307	-0.3423836	0.0001918
VEGF20-CONTROLE	-0.23166667	-0.77861640	0.3152831	0.9329384
VEGF40-CONTROLE	-0.02533333	-0.57228307	0.5216164	1.0000000
VEGF VEÍC.-CONTROLE	-0.38166667	-0.92861640	0.1652831	0.3932909
NGF20-NGF10	-0.27533333	-0.82228307	0.2716164	0.8183278
NGF40-NGF10	-0.19933333	-0.74628307	0.3476164	0.9766188
NGF VEÍC.-NGF10	-0.23300000	-0.77994974	0.3139497	0.9304157
VEGF10-NGF10	-1.02800000	-1.57494974	-0.4810503	0.0000195
VEGF20-NGF10	-0.37033333	-0.91728307	0.1766164	0.4369502
VEGF40-NGF10	-0.16400000	-0.71094974	0.3829497	0.9952338
VEGF VEÍC.-NGF10	-0.52033333	-1.06728307	0.0266164	0.0733818
NGF40-NGF20	0.07600000	-0.47094974	0.6229497	0.9999981
NGF VEÍC.-NGF20	0.04233333	-0.50461640	0.5892831	1.0000000
VEGF10-NGF20	-0.75266667	-1.29961640	-0.2057169	0.0018844
VEGF20-NGF20	-0.09500000	-0.64194974	0.4519497	0.9999783
VEGF40-NGF20	0.11133333	-0.43561640	0.6582831	0.9998842
VEGF VEÍC.-NGF20	-0.24500000	-0.79194974	0.3019497	0.9049151
NGF VEÍC.-NGF40	-0.03366667	-0.58061640	0.5132831	1.0000000
VEGF10-NGF40	-0.82866667	-1.37561640	-0.2817169	0.0005290
VEGF20-NGF40	-0.17100000	-0.71794974	0.3759497	0.9931708
VEGF40-NGF40	0.03533333	-0.51161640	0.5822831	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF40	-0.32100000	-0.86794974	0.2259497	0.6422313
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.79500000	-1.34194974	-0.2480503	0.0009294
VEGF20-NGF VEÍC.	-0.13733333	-0.68428307	0.4096164	0.9990621
VEGF40-NGF VEÍC.	0.06900000	-0.47794974	0.6159497	0.9999994
VEGF VEÍC.-NGF VEÍC.	-0.28733333	-0.83428307	0.2596164	0.7762287
VEGF20-VEGF10	0.65766667	0.11071693	1.2046164	0.0089826
VEGF40-VEGF10	0.86400000	0.31705026	1.4109497	0.0002928
VEGF VEÍC.-VEGF10	0.50766667	-0.03928307	1.0546164	0.0876082
VEGF40-VEGF20	0.20633333	-0.34061640	0.7532831	0.9697925
VEGF VEÍC.-VEGF20	-0.15000000	-0.69694974	0.3969497	0.9978555
VEGF VEÍC.-VEGF40	-0.35633333	-0.90328307	0.1906164	0.4934926

diff -> diferença entre as médias dos dois grupos;

lwr, upr -> o ponto final inferior e superior do intervalo de confiança a 95% (padrão);

padj -> valor de *p* após ajuste para as comparações múltiplas.

Tabela 8: Resultado do teste ANOVA em 3 horas

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
group	12	2.8833	0.24028	6.697	2.64e-05
Residuals	26	0.9329	0.03588		

Tabela 9: Testes *post-hoc* (Tukey's HSD)

\$group	diff	lwr	upr	padj
FGF20-FGF10	-0.26733333	-0.829374885	0.29470822	0.8654932
FGF40-FGF10	-0.17433333	-0.736374885	0.38770822	0.9936156
FGF VEÍC.-FGF10	0.06400000	-0.498041551	0.62604155	0.9999998
CONTROLE-FGF10	-0.11100000	-0.673041551	0.45104155	0.9999154
NGF10-FGF10	0.04100000	-0.521041551	0.60304155	1.0000000
NGF20-FGF10	-0.25700000	-0.819041551	0.30504155	0.8925438
NGF40-FGF10	-0.16100000	-0.723041551	0.40104155	0.9968173
NGF VEÍC.-FGF10	-0.18566667	-0.747708218	0.37637488	0.9891961
VEGF10-FGF10	-1.03833333	-1.600374885	-0.47629178	0.0000259
VEGF20-FGF10	-0.31166667	-0.873708218	0.25037488	0.7149501
VEGF40-FGF10	-0.19733333	-0.759374885	0.36470822	0.9824319
VEGF VEÍC.-FGF10	-0.47833333	-1.040374885	0.08370822	0.1534731
FGF40-FGF20	0.09300000	-0.469041551	0.65504155	0.9999871
FGF VEÍC.-FGF20	0.33133333	-0.230708218	0.89337488	0.6361965
CONTROLE-FGF20	0.15633333	-0.405708218	0.71837488	0.9975598
NGF10-FGF20	0.30833333	-0.253708218	0.87037488	0.7278071
NGF20-FGF20	0.01033333	-0.551708218	0.57237488	1.0000000
NGF40-FGF20	0.10633333	-0.455708218	0.66837488	0.9999460
NGF VEÍC.-FGF20	0.08166667	-0.480374885	0.64370822	0.9999969
VEGF10-FGF20	-0.77100000	-1.333041551	-0.20895845	0.0019602
VEGF20-FGF20	-0.04433333	-0.606374885	0.51770822	1.0000000
VEGF40-FGF20	0.07000000	-0.492041551	0.63204155	0.9999995
VEGF VEÍC.-FGF20	-0.21100000	-0.773041551	0.35104155	0.9708469
FGF40-FGF40	0.00000000	0.000000000	0.00000000	1.0000000
FGF VEÍC.-FGF40	0.23833333	-0.323708218	0.80037488	0.9324382
CONTROLE-FGF40	0.06333333	-0.498708218	0.62537488	0.9999998
NGF10-FGF40	0.21533333	-0.346708218	0.77737488	0.9662063
NGF20-FGF40	-0.08266667	-0.644708218	0.47937488	0.9999965
NGF40-FGF40	0.01333333	-0.548708218	0.57537488	1.0000000
NGF VEÍC.-FGF40	-0.01133333	-0.573374885	0.55070822	1.0000000
VEGF10-FGF40	-0.86400000	-1.426041551	-0.30195845	0.0004317
VEGF20-FGF40	-0.13733333	-0.699374885	0.42470822	0.9992783
VEGF40-FGF40	-0.02300000	-0.585041551	0.53904155	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF40	-0.30400000	-0.866041551	0.25804155	0.7442343

CONTROLE-FGF VEÍC.	-0.1750000	-0.737041551	0.38704155	0.9934045
NGF10-FGF VEÍC.	-0.0230000	-0.585041551	0.53904155	1.0000000
NGF20-FGF VEÍC.	-0.3210000	-0.883041551	0.24104155	0.6780920
NGF40-FGF VEÍC.	-0.2250000	-0.787041551	0.33704155	0.9539680
NGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.2496667	-0.811708218	0.31237488	0.9096017
VEGF10-FGF VEÍC.	-1.1023333	-1.664374885	-0.54029178	0.0000095
VEGF20-FGF VEÍC.	-0.3756667	-0.937708218	0.18637488	0.4558644
VEGF40-FGF VEÍC.	-0.2613333	-0.823374885	0.30070822	0.8816245
VEGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.5423333	-1.104374885	0.01970822	0.0660197
NGF10-CONTROLE	0.1520000	-0.410041551	0.71404155	0.9981144
NGF20-CONTROLE	-0.1460000	-0.708041551	0.41604155	0.9987050
NGF40-CONTROLE	-0.0500000	-0.612041551	0.51204155	1.0000000
NGF VEÍC.-CONTROLE	-0.0746667	-0.636708218	0.48737488	0.9999989
VEGF10-CONTROLE	-0.9273333	-1.489374885	-0.36529178	0.0001542
VEGF20-CONTROLE	-0.2006667	-0.762708218	0.36137488	0.9800031
VEGF40-CONTROLE	-0.0863333	-0.648374885	0.47570822	0.9999943
VEGF VEÍC.-CONTROLE	-0.3673333	-0.929374885	0.19470822	0.4888147
NGF20-NGF10	-0.2980000	-0.860041551	0.26404155	0.7663781
NGF40-NGF10	-0.2020000	-0.764041551	0.36004155	0.9789633
NGF VEÍC.-NGF10	-0.2266667	-0.788708218	0.33537488	0.9515803
VEGF10-NGF10	-1.0793333	-1.641374885	-0.51729178	0.0000136
VEGF20-NGF10	-0.3526667	-0.914708218	0.20937488	0.5483624
VEGF40-NGF10	-0.2383333	-0.800374885	0.32370822	0.9324382
VEGF VEÍC.-NGF10	-0.5193333	-1.081374885	0.04270822	0.0904094
NGF40-NGF20	0.0960000	-0.466041551	0.65804155	0.9999819
NGF VEÍC.-NGF20	0.0713333	-0.490708218	0.63337488	0.9999993
VEGF10-NGF20	-0.7813333	-1.343374885	-0.21929178	0.0016579
VEGF20-NGF20	-0.0546667	-0.616708218	0.50737488	1.0000000
VEGF40-NGF20	0.0596667	-0.502374885	0.62170822	0.9999999
VEGF VEÍC.-NGF20	-0.2213333	-0.783374885	0.34070822	0.9589281
NGF VEÍC.-NGF40	-0.0246667	-0.586708218	0.53737488	1.0000000
VEGF10-NGF40	-0.8773333	-1.439374885	-0.31529178	0.0003474
VEGF20-NGF40	-0.1506667	-0.712708218	0.41137488	0.9982621
VEGF40-NGF40	-0.0363333	-0.598374885	0.52570822	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF40	-0.3173333	-0.879374885	0.24470822	0.6927074
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.8526667	-1.414708218	-0.29062512	0.0005193
VEGF20-NGF VEÍC.	-0.1260000	-0.688041551	0.43604155	0.9996910
VEGF40-NGF VEÍC.	-0.0116667	-0.573708218	0.55037488	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF VEÍC.	-0.2926667	-0.854708218	0.26937488	0.7854042
VEGF20-VEGF10	0.7266667	0.164625115	1.28870822	0.0040058
VEGF40-VEGF10	0.8410000	0.278958449	1.40304155	0.0006280
VEGF VEÍC.-VEGF10	0.5600000	-0.002041551	1.12204155	0.0514778
VEGF40-VEGF20	0.1143333	-0.447708218	0.67637488	0.9998850
VEGF VEÍC.-VEGF20	-0.1666667	-0.728708218	0.39537488	0.9956745
VEGF VEÍC.-VEGF40	-0.2810000	-0.843041551	0.28104155	0.8245542

diff -> diferença entre as médias dos dois grupos;

lwr, upr -> o ponto final inferior e superior do intervalo de confiança a 95% (padrão);

padj -> valor de *p* após ajuste para as comparações múltiplas.

Tabela 10: Resultado do teste ANOVA em 6 horas

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(.F)
group	12	2.7167	0.22639	8.087	4.83e-06
Residuals	26	0.7279	0.02799		

Tabela 11: Testes *post-hoc* (Tukey's HSD)

\$group	diff	lwr	upr	padj
FGF20-FGF10	-0.2873333333	-0.78378962	0.20912295	0.6607998
FGF40-FGF10	-0.1940000000	-0.69045628	0.30245628	0.9610998
FGF VEÍC.-FGF10	0.0003333333	-0.49612295	0.49678962	1.0000000
CONTROLE-FGF10	-0.1393333333	-0.63578962	0.35712295	0.9973530
NGF10-FGF10	-0.0130000000	-0.50945628	0.48345628	1.0000000
NGF20-FGF10	-0.2280000000	-0.72445628	0.26845628	0.8897801
NGF40-FGF10	-0.2236666667	-0.72012295	0.27278962	0.9015731
NGF VEÍC.-FGF10	-0.1960000000	-0.69245628	0.30045628	0.9581968
VEGF10-FGF10	-1.0220000000	-1.51845628	-0.52554372	0.0000041
VEGF20-FGF10	-0.3173333333	-0.81378962	0.17912295	0.5214218
VEGF40-FGF10	-0.2300000000	-0.72645628	0.26645628	0.8840681
VEGF VEÍC.-FGF10	-0.5736666667	-1.07012295	-0.07721038	0.0135494
FGF40-FGF20	0.0933333333	-0.40312295	0.58978962	0.9999495
FGF VEÍC.-FGF20	0.2876666667	-0.20878962	0.78412295	0.6592712
CONTROLE-FGF20	0.1480000000	-0.34845628	0.64445628	0.9954690
NGF10-FGF20	0.2743333333	-0.22212295	0.77078962	0.7191820
NGF20-FGF20	0.0593333333	-0.43712295	0.55578962	0.9999997
NGF40-FGF20	0.0636666667	-0.43278962	0.56012295	0.9999992
NGF VEÍC.-FGF20	0.0913333333	-0.40512295	0.58778962	0.9999599
VEGF10-FGF20	-0.7346666667	-1.23112295	-0.23821038	0.0007305
VEGF20-FGF20	-0.0300000000	-0.52645628	0.46645628	1.0000000
VEGF40-FGF20	0.0573333333	-0.43912295	0.55378962	0.9999998
VEGF VEÍC.-FGF20	-0.2863333333	-0.78278962	0.21012295	0.6653782
FGF40-FGF40	0.1943333333	-0.30212295	0.69078962	0.9606263
CONTROLE-FGF40	0.0546666667	-0.44178962	0.55112295	0.9999999
NGF10-FGF40	0.1810000000	-0.31545628	0.67745628	0.9765517
NGF20-FGF40	-0.0340000000	-0.53045628	0.46245628	1.0000000
NGF40-FGF40	-0.0296666667	-0.52612295	0.46678962	1.0000000
NGF VEÍC.-FGF40	-0.0020000000	-0.49845628	0.49445628	1.0000000
VEGF10-FGF40	-0.8280000000	-1.32445628	-0.33154372	0.0001310
VEGF20-FGF40	-0.1233333333	-0.61978962	0.37312295	0.9991533
VEGF40-FGF40	-0.0360000000	-0.53245628	0.46045628	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF40	-0.3796666667	-0.87612295	0.11678962	0.2694111

CONTROLE-FGF VEÍC.	-0.139666667	-0.63612295	0.35678962	0.9972951
NGF10-FGF VEÍC.	-0.013333333	-0.50978962	0.48312295	1.0000000
NGF20-FGF VEÍC.	-0.228333333	-0.72478962	0.26812295	0.8888398
NGF40-FGF VEÍC.	-0.224000000	-0.72045628	0.27245628	0.9006944
NGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.196333333	-0.69278962	0.30012295	0.9576984
VEGF10-FGF VEÍC.	-1.022333333	-1.51878962	-0.52587705	0.0000040
VEGF20-FGF VEÍC.	-0.317666667	-0.81412295	0.17878962	0.5198868
VEGF40-FGF VEÍC.	-0.230333333	-0.72678962	0.26612295	0.8830997
VEGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.574000000	-1.07045628	-0.07754372	0.0134705
NGF10-CONTROLE	0.126333333	-0.37012295	0.62278962	0.9989345
NGF20-CONTROLE	-0.088666667	-0.58512295	0.40778962	0.9999707
NGF40-CONTROLE	-0.084333333	-0.58078962	0.41212295	0.9999829
NGF VEÍC.-CONTROLE	-0.056666667	-0.55312295	0.43978962	0.9999998
VEGF10-CONTROLE	-0.882666667	-1.37912295	-0.38621038	0.0000483
VEGF20-CONTROLE	-0.178000000	-0.67445628	0.31845628	0.9793461
VEGF40-CONTROLE	-0.090666667	-0.58712295	0.40578962	0.9999629
VEGF VEÍC.-CONTROLE	-0.434333333	-0.93078962	0.06212295	0.1297593
NGF20-NGF10	-0.215000000	-0.71145628	0.28145628	0.9227497
NGF40-NGF10	-0.210666667	-0.70712295	0.28578962	0.9321382
NGF VEÍC.-NGF10	-0.183000000	-0.67945628	0.31345628	0.9745374
VEGF10-NGF10	-1.009000000	-1.50545628	-0.51254372	0.0000051
VEGF20-NGF10	-0.304333333	-0.80078962	0.19212295	0.5818411
VEGF40-NGF10	-0.217000000	-0.71345628	0.27945628	0.9181479
VEGF VEÍC.-NGF10	-0.560666667	-1.05712295	-0.06421038	0.0169956
NGF40-NGF20	0.004333333	-0.49212295	0.50078962	1.0000000
NGF VEÍC.-NGF20	0.032000000	-0.46445628	0.52845628	1.0000000
VEGF10-NGF20	-0.794000000	-1.29045628	-0.29754372	0.0002446
VEGF20-NGF20	-0.089333333	-0.58578962	0.40712295	0.9999683
VEGF40-NGF20	-0.002000000	-0.49845628	0.49445628	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF20	-0.345666667	-0.84212295	0.15078962	0.3964628
NGF VEÍC.-NGF40	0.027666667	-0.46878962	0.52412295	1.0000000
VEGF10-NGF40	-0.798333333	-1.29478962	-0.30187705	0.0002259
VEGF20-NGF40	-0.093666667	-0.59012295	0.40278962	0.9999476
VEGF40-NGF40	-0.006333333	-0.50278962	0.49012295	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF40	-0.350000000	-0.84645628	0.14645628	0.3786727
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.826000000	-1.32245628	-0.32954372	0.0001359
VEGF20-NGF VEÍC.	-0.121333333	-0.61778962	0.37512295	0.9992768
VEGF40-NGF VEÍC.	-0.034000000	-0.53045628	0.46245628	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF VEÍC.	-0.377666667	-0.87412295	0.11878962	0.2760416
VEGF20-VEGF10	0.704666667	0.20821038	1.20112295	0.0012697
VEGF40-VEGF10	0.792000000	0.29554372	1.28845628	0.0002538
VEGF VEÍC.-VEGF10	0.448333333	-0.04812295	0.94478962	0.1057053
VEGF40-VEGF20	0.087333333	-0.40912295	0.58378962	0.9999751
VEGF VEÍC.-VEGF20	-0.256333333	-0.75278962	0.24012295	0.7939870
VEGF VEÍC.-VEGF40	-0.343666667	-0.84012295	0.15278962	0.4048130

diff -> diferença entre as médias dos dois grupos;

lwr, upr -> o ponto final inferior e superior do intervalo de confiança a 95% (padrão);

padj -> valor de *p* após ajuste para as comparações múltiplas.

Tabela 12: Resultado do teste ANOVA em 24 horas

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(.F)
group	12	1.942	0.16186	6.099	5.89e-05
Residuals	26	0.690	0.02654		

Tabela 13: Testes *post-hoc* (Tukey's HSD)

\$group	diff	lwr	upr	padj
FGF20-FGF10	-0.269333333	-0.752719967	0.214053300	0.7091399
FGF40-FGF10	-0.074000000	-0.557386634	0.409386634	0.9999945
FGF VEÍC.-FGF10	-0.037000000	-0.520386634	0.446386634	1.0000000
CONTROLE-FGF10	0.075333333	-0.408053300	0.558719967	0.9999933
NGF10-FGF10	0.302666667	-0.180719967	0.786053300	0.5514480
NGF20-FGF10	-0.013666667	-0.497053300	0.469719967	1.0000000
NGF40-FGF10	-0.152666667	-0.636053300	0.330719967	0.9925595
NGF VEÍC.-FGF10	0.222666667	-0.260719967	0.706053300	0.8878369
VEGF10-FGF10	-0.481333333	-0.964719967	0.002053300	0.0517320
VEGF20-FGF10	-0.127666667	-0.611053300	0.355719967	0.9984871
VEGF40-FGF10	0.011666667	-0.471719967	0.495053300	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF10	-0.479666667	-0.963053300	0.003719967	0.0531779
FGF20				
FGF40-FGF20	0.195333333	-0.288053300	0.678719967	0.9509203
FGF VEÍC.-FGF20	0.232333333	-0.251053300	0.715719967	0.8575584
CONTROLE-FGF20	0.344666667	-0.138719967	0.828053300	0.3626918
NGF10-FGF20	0.572000000	0.088613366	1.055386634	0.0106280
NGF20-FGF20	0.255666667	-0.227719967	0.739053300	0.7690284
NGF40-FGF20	0.116666667	-0.366719967	0.600053300	0.9993597
NGF VEÍC.-FGF20	0.492000000	0.008613366	0.975386634	0.0432968
VEGF10-FGF20	-0.212000000	-0.695386634	0.271386634	0.9164210
VEGF20-FGF20	0.141666667	-0.341719967	0.625053300	0.9961002
VEGF40-FGF20	0.281000000	-0.202386634	0.764386634	0.6549957
VEGF VEÍC.-FGF20	-0.210333333	-0.693719967	0.273053300	0.9204235
FGF40				
FGF VEÍC.-FGF40	0.037000000	-0.446386634	0.520386634	1.0000000
CONTROLE-FGF40	0.149333333	-0.334053300	0.632719967	0.9938317
NGF10-FGF40	0.376666667	-0.106719967	0.860053300	0.2465032
NGF20-FGF40	0.060333333	-0.423053300	0.543719967	0.9999994
NGF40-FGF40	-0.078666667	-0.562053300	0.404719967	0.9999893
NGF VEÍC.-FGF40	0.296666667	-0.186719967	0.780053300	0.5801852
VEGF10-FGF40	-0.407333333	-0.890719967	0.076053300	0.1626392
VEGF20-FGF40	-0.053666667	-0.537053300	0.429719967	0.9999999
VEGF40-FGF40	0.085666667	-0.397719967	0.569053300	0.9999730
VEGF VEÍC.-FGF40	-0.405666667	-0.889053300	0.077719967	0.1665275
FGF40				

CONTROLE-FGF VEÍC.	0.112333333	-0.371053300	0.595719967	0.9995582
NGF10-FGF VEÍC.	0.339666667	-0.143719967	0.823053300	0.3833508
NGF20-FGF VEÍC.	0.023333333	-0.460053300	0.506719967	1.0000000
NGF40-FGF VEÍC.	-0.115666667	-0.599053300	0.367719967	0.9994112
NGF VEÍC.-FGF VEÍC.	0.259666667	-0.223719967	0.743053300	0.7519989
VEGF10-FGF VEÍC.	-0.444333333	-0.927719967	0.039053300	0.0937361
VEGF20-FGF VEÍC.	-0.090666667	-0.574053300	0.392719967	0.9999507
VEGF40-FGF VEÍC.	0.048666667	-0.434719967	0.532053300	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.442666667	-0.926053300	0.040719967	0.0961892
NGF10-CONTROLE	0.227333333	-0.256053300	0.710719967	0.8737289
NGF20-CONTROLE	-0.089000000	-0.572386634	0.394386634	0.9999595
NGF40-CONTROLE	-0.228000000	-0.711386634	0.255386634	0.8716352
NGF VEÍC.-CONTROLE	0.147333333	-0.336053300	0.630719967	0.9945065
VEGF10-CONTROLE	-0.556666667	-1.040053300	-0.073280033	0.0140196
VEGF20-CONTROLE	-0.203000000	-0.686386634	0.280386634	0.9365592
VEGF40-CONTROLE	-0.063666667	-0.547053300	0.419719967	0.9999990
VEGF VEÍC.-CONTROLE	-0.555000000	-1.038386634	-0.071613366	0.0144455
NGF20-NGF10	-0.316333333	-0.799719967	0.167053300	0.4869255
NGF40-NGF10	-0.455333333	-0.938719967	0.028053300	0.0788721
NGF VEÍC.-NGF10	-0.080000000	-0.563386634	0.403386634	0.9999871
VEGF10-NGF10	-0.784000000	-1.267386634	-0.300613366	0.0001991
VEGF20-NGF10	-0.430333333	-0.913719967	0.053053300	0.1161246
VEGF40-NGF10	-0.291000000	-0.774386634	0.192386634	0.6073639
VEGF VEÍC.-NGF10	-0.782333333	-1.265719967	-0.298946700	0.0002055
NGF40-NGF20	-0.139000000	-0.622386634	0.344386634	0.9967064
NGF VEÍC.-NGF20	0.236333333	-0.247053300	0.719719967	0.8438601
VEGF10-NGF20	-0.467666667	-0.951053300	0.015719967	0.0647176
VEGF20-NGF20	-0.114000000	-0.597386634	0.369386634	0.9994892
VEGF40-NGF20	0.025333333	-0.458053300	0.508719967	1.0000000
VEGF VEÍC.-NGF20	-0.466000000	-0.949386634	0.017386634	0.0664872
NGF VEÍC.-NGF40	0.375333333	-0.108053300	0.858719967	0.2507597
VEGF10-NGF40	-0.328666667	-0.812053300	0.154719967	0.4308496
VEGF20-NGF40	0.025000000	-0.458386634	0.508386634	1.0000000
VEGF40-NGF40	0.164333333	-0.319053300	0.647719967	0.9863766
VEGF VEÍC.-NGF40	-0.327000000	-0.810386634	0.156386634	0.4382697
VEGF10-NGF VEÍC.	-0.704000000	-1.187386634	-0.220613366	0.0009052
VEGF20-NGF VEÍC.	-0.350333333	-0.833719967	0.133053300	0.3400478
VEGF40-NGF VEÍC.	-0.211000000	-0.694386634	0.272386634	0.9188375
VEGF VEÍC.-NGF VEÍC.	-0.702333333	-1.185719967	-0.218946700	0.0009343
VEGF20-VEGF10	0.353666667	-0.129719967	0.837053300	0.3271264
VEGF40-VEGF10	0.493000000	0.009613366	0.976386634	0.0425745
VEGF VEÍC.-VEGF10	0.001666667	-0.481719967	0.485053300	1.0000000
VEGF40-VEGF20	0.139333333	-0.344053300	0.622719967	0.9966352
VEGF VEÍC.-VEGF20	-0.352000000	-0.835386634	0.131386634	0.3335495
VEGF VEÍC.-VEGF40	-0.491333333	-0.974719967	-0.007946700	0.0437846

diff -> diferença entre as médias dos dois grupos;

lwr, upr -> o ponto final inferior e superior do intervalo de confiança a 95% (padrão);

padj -> valor de *p* após ajuste para as comparações múltiplas.

Tabela 14: Resultado do teste ANOVA em 27h

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
group	12	1.893	0.15779	3.38	0.00452
Residuals	26	1.214	0.04668		

Tabela 15: Testes *post-hoc* (Tukey's HSD)

\$group	diff	lwr	upr	padj
FGF20-FGF10	-0.27466667	-0.9157307	0.36639739	0.9278125
FGF40-FGF10	-0.08033333	-0.7213974	0.56073073	0.9999994
FGF VEÍC.-FGF10	0.01266667	-0.6283974	0.65373073	1.0000000
CONTROLE-FGF10	-0.01466667	-0.6557307	0.62639739	1.0000000
NGF10-FGF10	-0.02600000	-0.6670641	0.61506406	1.0000000
NGF20-FGF10	-0.10566667	-0.7467307	0.53539739	0.9999877
NGF40-FGF10	-0.29800000	-0.9390641	0.34306406	0.8817983
NGF VEÍC.-FGF10	-0.60133333	-1.2423974	0.03973073	0.0812875
VEGF10-FGF10	-0.55066667	-1.1917307	0.09039739	0.1452129
VEGF20-FGF10	-0.49033333	-1.1313974	0.15073073	0.2692141
VEGF40-FGF10	-0.22533333	-0.8663974	0.41573073	0.9822763
VEGF VEÍC.-FGF10	-0.51433333	-1.1553974	0.12673073	0.2129006
FGF40-FGF20	0.19433333	-0.4467307	0.83539739	0.9947587
FGF VEÍC.-FGF20	0.28733333	-0.3537307	0.92839739	0.9045641
CONTROLE-FGF20	0.26000000	-0.3810641	0.90106406	0.9496835
NGF10-FGF20	0.24866667	-0.3923974	0.88973073	0.9630801
NGF20-FGF20	0.16900000	-0.4720641	0.81006406	0.9985129
NGF40-FGF20	-0.02333333	-0.6643974	0.61773073	1.0000000
NGF VEÍC.-FGF20	-0.32666667	-0.9677307	0.31439739	0.8068824
VEGF10-FGF20	-0.27600000	-0.9170641	0.36506406	0.9255584
VEGF20-FGF20	-0.21566667	-0.8567307	0.42539739	0.9874747
VEGF40-FGF20	0.04933333	-0.5917307	0.69039739	1.0000000
VEGF VEÍC.-FGF20	-0.23966667	-0.8807307	0.40139739	0.9717255
FGF VEÍC.-FGF40	0.09300000	-0.5480641	0.73406406	0.9999970
CONTROLE-FGF40	0.06566667	-0.5753974	0.70673073	0.9999999
NGF10-FGF40	0.05433333	-0.5867307	0.69539739	1.0000000
NGF20-FGF40	-0.02533333	-0.6663974	0.61573073	1.0000000
NGF40-FGF40	-0.21766667	-0.8587307	0.42339739	0.9865115
NGF VEÍC.-FGF40	-0.52100000	-1.1620641	0.12006406	0.1989349
VEGF10-FGF40	-0.47033333	-1.1113974	0.17073073	0.3233755
VEGF20-FGF40	-0.41000000	-1.0510641	0.23106406	0.5205878
VEGF40-FGF40	-0.14500000	-0.7860641	0.49606406	0.9996622
VEGF VEÍC.-FGF40	-0.43400000	-1.0750641	0.20706406	0.4371422

CONTROLE-FGF VEÍC.	-0.02733333	-0.6683974	0.61373073	1.0000000
NGF10-FGF VEÍC.	-0.03866667	-0.6797307	0.60239739	1.0000000
NGF20-FGF VEÍC.	-0.11833333	-0.7593974	0.52273073	0.9999584
NGF40-FGF VEÍC.	-0.31066667	-0.9517307	0.33039739	0.8510624
NGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.61400000	-1.2550641	0.02706406	0.0698052
VEGF10-FGF VEÍC.	-0.56333333	-1.2043974	0.07773073	0.1261987
VEGF20-FGF VEÍC.	-0.50300000	-1.1440641	0.13806406	0.2383073
VEGF40-FGF VEÍC.	-0.23800000	-0.8790641	0.40306406	0.9731466
VEGF VEÍC.-FGF VEÍC.	-0.52700000	-1.1680641	0.11406406	0.1869754
NGF10-CONTROLE	-0.01133333	-0.6523974	0.62973073	1.0000000
NGF20-CONTROLE	-0.09100000	-0.7320641	0.55006406	0.9999976
NGF40-CONTROLE	-0.28333333	-0.9243974	0.35773073	0.9123500
NGF VEÍC.-CONTROLE	-0.58666667	-1.2277307	0.05439739	0.0966332
VEGF10-CONTROLE	-0.53600000	-1.1770641	0.10506406	0.1700958
VEGF20-CONTROLE	-0.47566667	-1.1167307	0.16539739	0.3083015
VEGF40-CONTROLE	-0.21066667	-0.8517307	0.43039739	0.9896486
VEGF VEÍC.-CONTROLE	-0.49966667	-1.1407307	0.14139739	0.2461830
NGF20-NGF10	-0.07966667	-0.7207307	0.56139739	0.9999995
NGF40-NGF10	-0.27200000	-0.9130641	0.36906406	0.9321859
NGF VEÍC.-NGF10	-0.57533333	-1.2163974	0.06573073	0.1101546
VEGF10-NGF10	-0.52466667	-1.1657307	0.11639739	0.1915584
VEGF20-NGF10	-0.46433333	-1.1053974	0.17673073	0.3408655
VEGF40-NGF10	-0.19933333	-0.8403974	0.44173073	0.9934805
VEGF VEÍC.-NGF10	-0.48833333	-1.1293974	0.15273073	0.2743368
NGF40-NGF20	-0.19233333	-0.8333974	0.44873073	0.9952092
NGF VEÍC.-NGF20	-0.49566667	-1.1367307	0.14539739	0.2558768
VEGF10-NGF20	-0.44500000	-1.0860641	0.19606406	0.4008249
VEGF20-NGF20	-0.38466667	-1.0257307	0.25639739	0.6118986
VEGF40-NGF20	-0.11966667	-0.7607307	0.52139739	0.9999532
VEGF VEÍC.-NGF20	-0.40866667	-1.0497307	0.23239739	0.5253473
NGF VEÍC.-NGF40	-0.30333333	-0.9443974	0.33773073	0.8693369
VEGF10-NGF40	-0.25266667	-0.8937307	0.38839739	0.9586839
VEGF20-NGF40	-0.19233333	-0.8333974	0.44873073	0.9952092
VEGF40-NGF40	0.07266667	-0.5683974	0.71373073	0.9999998
VEGF VEÍC.-NGF40	-0.21633333	-0.8573974	0.42473073	0.9871598
VEGF10-NGF VEÍC.	0.05066667	-0.5903974	0.69173073	1.0000000
VEGF20-NGF VEÍC.	0.11100000	-0.5300641	0.75206406	0.9999790
VEGF40-NGF VEÍC.	0.37600000	-0.2650641	1.01706406	0.6430721
VEGF VEÍC.-NGF VEÍC.	0.08700000	-0.5540641	0.72806406	0.9999986
VEGF20-VEGF10	0.06033333	-0.5807307	0.70139739	1.0000000
VEGF40-VEGF10	0.32533333	-0.3157307	0.96639739	0.8107759
VEGF VEÍC.-VEGF10	0.03633333	-0.6047307	0.67739739	1.0000000
VEGF40-VEGF20	0.26500000	-0.3760641	0.90606406	0.9428207
VEGF VEÍC.-VEGF20	-0.02400000	-0.6650641	0.61706406	1.0000000
VEGF VEÍC.-VEGF40	-0.28900000	-0.9300641	0.35206406	0.9011986

diff -> diferença entre as médias dos dois grupos;

lwr, *upr* -> o ponto final inferior e superior do intervalo de confiança a 95% (padrão);

padj -> valor de *p* após ajuste para as comparações múltiplas.

Apêndice D

ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO - TESTES DE NORMALIDADE**Tabela 16: Dados estatísticos em 0 hora**

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variação	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
CONTROLE	4387.475	2834.970	5263.250	0.646	1609.204 a 7165.746	0.255
MITOMICINA	4486.750	3073.106	5593.000	0.685	1475.106 a 7498.394	0.160
FGF	6280.075	3467.236	7290.550	0.552	2882.184 a 9677.966	0.356
FGF+MIT	5831.050	2797.150	6454.200	0.480	3089.843 a 8572.257	0.514
FGF VEÍC.	6636.925	2981.205	7339.800	0.449	3715.344 a 9558.506	0.570
NGF	5748.350	3605.479	6659.050	0.627	2214.981 a 9281.719	0.509
NGF+MIT	4067.450	3184.084	4845.150	0.783	947.047 a 7187.853	0.538
NGF+VEÍC.	3687.425	2650.230	4718.050	0.719	1090.200 a 6284.650	0.095
VEGF	4496.550	2731.507	5213.100	0.607	1819.673 a 7173.427	0.447
VEGF+MIT	3772.075	2874.604	4929.600	0.762	954.963 a 6589.187	0.038
VEGF+VEÍC.	3817.650	2667.108	4606.800	0.699	1203.884 a 6431.416	0.345

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Com exceção da variável VEGF+MIT (p=0,038) todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

Tabela 17: Dados estatísticos em 24 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variação	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
CONTROLE	8266.000	1679.449	7830.150	0.203	6620.140 a 9911.860	0.418
MITOMICINA	7089.800	958.683	7383.550	0.135	6150.291 a 8029.309	0.266
FGF	10567.675	1178.679	10532.500	0.112	9412.570 a 11722.780	0.810
FGF+MIT	7414.725	1874.800	7021.600	0.253	5577.421 a 9252.029	0.602
FGF VEÍC.	10482.725	1165.957	10460.700	0.111	9340.087 a 11625.363	0.048
NGF	9466.775	839.588	9338.100	0.089	8643.979 a 10289.571	0.586
NGF+MIT	6207.475	829.162	6202.350	0.134	5394.897 a 7020.053	0.418
NGF VEÍC.	7895.000	903.368	7867.700	0.114	7009.699 a 8780.301	0.437
VEGF	8233.325	1085.161	7958.850	0.132	7169.867 a 9296.783	0.399
VEGF+MIT	6309.025	552.373	6439.450	0.088	5767.700 a 6850.350	0.317
VEGF VEÍC.	7906.625	845.314	7891.200	0.107	7078.217 a 8735.033	0.154

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Com exceção da variável FGF VEÍC. (p=0,048) todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

Tabela 18: Dados estatísticos em 48 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variação	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
CONTROLE	9232.775	2737.839	9284.900	0.297	6549.693 a 11915.857	0.484
MITOMICINA	5841.475	1995.863	5962.200	0.342	3885.529 a 7797.421	0.640
FGF	15486.800	2824.311	16559.600	0.182	12718.976 a 18254.624	0.113
FGF+MIT	7476.800	781.019	7446.250	0.104	6711.401 a 8242.199	0.971
FGF VEÍC.	15606.425	2065.797	16147.700	0.132	13581.944 a 17630.906	0.472
NGF	13668.900	2756.295	13488.750	0.202	10967.731 a 16370.069	0.192
NGF+MIT	4274.100	1409.612	4497.850	0.330	2892.680 a 5655.520	0.674
NGF VEÍC.	8707.825	2978.121	8257.850	0.342	5789.266 a 11626.384	0.209
VEGF	7338.425	3638.283	8961.350	0.496	3772.908 a 10903.942	0.015
VEGF+MIT	3690.125	1918.923	4451.850	0.520	1809.581 a 5570.669	0.075
VEGF VEÍC.	9471.700	4713.031	10696.400	0.498	4852.930 a 14090.470	0.340

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Com exceção da variável VEGF (p=0,015) todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

Tabela 19: Dados estatísticos em 72 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variação	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
CONTROLE	10511.025	5423.145	10345.250	0.516	5196.343 a 15825.707	0.179
MITOMICINA	4835.725	2009.886	4864.800	0.416	2866.037 a 6805.413	0.817
FGF	23844.750	5109.750	25985.250	0.214	18837.195 a 28852.305	0.034
FGF+MIT	6220.200	2450.256	6488.400	0.394	3818.949 a 8621.451	0.610
FGF VEÍC.	21657.300	5908.371	21576.900	0.273	15867.096 a 27447.504	0.412
NGF	22638.350	5149.041	24253.050	0.227	17592.290 a 27684.410	0.280
NGF+MIT	3771.600	1305.316	4028.200	0.346	2492.391 a 5050.809	0.316
NGF VEÍC.	7120.100	4947.166	7391.250	0.695	2271.878 a 11968.322	0.453
VEGF	12861.175	8497.487	12181.850	0.661	4533.638 a 21188.712	0.245
VEGF+MIT	3390.075	1372.177	3870.750	0.405	2045.342 a 4734.808	0.183
VEGF VEÍC.	11164.500	4807.538	11865.900	0.431	6453.113 a 15875.887	0.847

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Com exceção da variável FGF (p=0,034) todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

Tabela 20: Dados estatísticos em 96 horas

	Média	Desvio_Padrão	Mediana	Coeficiente_de_Variação	Intervalo_de_Confiança_95	Significância_p
CONTROLE	7669.675	7872.680	7481.300	1.026	-45.551 a 15384.901	0.057
MITOMICINA	1750.075	2781.736	2305.150	1.589	-976.027 a 4476.177	0.577
FGF	19802.200	3298.622	20184.700	0.167	16569.551 a 23034.849	0.776
FGF+MIT	3704.475	1625.299	4053.900	0.439	2111.682 a 5297.268	0.583
FGF VEÍC.	18231.325	6166.482	19468.000	0.338	12188.173 a 24274.477	0.577
NGF	20349.600	3579.573	19578.300	0.176	16841.618 a 23857.582	0.286
NGF+MIT	889.400	2237.176	1419.950	2.515	-1303.032 a 3081.832	0.419
NGF VEÍC.	6431.225	5652.121	5558.000	0.879	892.147 a 11970.303	0.249
VEGF	4365.025	5870.915	5359.750	1.345	-1388.472 a 10118.522	0.571
VEGF+MIT	506.550	3016.620	1367.350	5.955	-2449.737 a 3462.837	0.308
VEGF VEÍC.	9799.250	8801.822	13092.200	0.898	1173.464 a 18425.036	0.120

^a Os valores da Significância(p) foram obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam distribuição normal para a variável. Todas as variáveis apresentam resultados de Significância (p) maior do que 0.05, que indica que as variáveis apresentam distribuição normal.

ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO– TESTES DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS, TESTES T E TESTES DE U-MANN WHITNEY

Tabela 21: Resultado do teste F entre CONTROLE X MITOMICINA

Significância(p) do teste F entre CTRL X MIT em 0 hora =	0.8976367
Significância(p) do teste F entre CTRL X MIT em 24 horas =	0.3816919
Significância(p) do teste F entre CTRL X MIT em 48 horas =	0.6165949
Significância(p) do teste F entre CTRL X MIT em 72 horas =	0.1372144
Significância(p) do teste F entre CTRL X MIT em 96 horas =	0.1212830

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferença significativa entre as variâncias dos dois conjuntos de dados.

Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias.

Tabela 22: Resultado do teste T entre CONTROLE X MITOMICINA

Significância(p) do teste T entre CTRL X MIT em 0 hora =	0.9636653
Significância(p) do teste T entre CTRL X MIT em 24 horas =	0.2694882
Significância(p) do teste T entre CTRL X MIT em 48 horas =	0.0921848
Significância(p) do teste T entre CTRL X MIT em 72 horas =	0.0973509
Significância(p) do teste T entre CTRL X MIT em 96 horas =	0.2059963

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados

Tabela 23: Resultado do teste F entre CONTROLE X FGF

Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF em 0 hora =	0.7487449
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF em 24 horas =	0.5756123
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF em 48 horas =	0.9604270
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF em 96 horas =	0.1869211

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferença significativa entre as variâncias dos dois conjuntos de dados.

Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias.

Os dados do grupo FGF em 72 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico de U-Mann Whitney.

Tabela 24: Resultado do teste T entre CONTROLE X FGF

Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF em 0 hora =	0.4304305
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF em 24 horas =	0.0660213
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF em 48 horas =	0.0190790
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF em 96 horas =	0.0294610

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Os dados do grupo FGF em 72 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico de U-Mann Whitney

Tabela 25: Resultado do teste F entre CONTROLE X FGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF+MIT em 0 hora =	0.9829015
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF+MIT em 24 horas =	0.8607403
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF+MIT em 48 horas =	0.0684886
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF+MIT em 72 horas =	0.2245541
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF+MIT em 96 horas =	0.0277155

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferença significativa entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Tabela 26: Resultado do teste T entre CONTROLE X FGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF+MIT em 0 hora =	0.4957757
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF+MIT em 24 horas =	0.5239824
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF+MIT em 48 horas =	0.2635036
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF+MIT em 72 horas =	0.1993780
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF+MIT em 96 horas =	0.3914064

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Tabela 27: Resultado do teste F entre CONTROLE X FGF VEÍCULO

Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF VEÍC. em 0 hora =	0.9360417
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF VEÍC. em 48 horas =	0.6550169
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF VEÍC. em 72 horas =	0.8912895
Significância(p) do teste F entre CTRL X FGF VEÍC. em 96 horas =	0.6979691

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Os dados do grupo FGF VEÍC. em 24 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico de U-Mann Whitney

Tabela 28: Resultado do teste T entre CONTROLE X FGF VEÍCULO

Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF VEÍC. em 0 hora =	0.3160926
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF VEÍC. em 48 horas =	0.0098912
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF VEÍC. em 72 horas =	0.0320121
Significância(p) do teste T entre CTRL X FGF VEÍC. em 96 horas =	0.0791229

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Os dados do grupo FGF VEÍC. em 24 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico de U-Mann Whitney

Tabela 29: Resultado do teste F entre CONTROLE X NGF

Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF em 0 hora =	0.7024580
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF em 24 horas =	0.2846508
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF em 48 horas =	0.9914458
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF em 72 horas =	0.9340517
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF em 96 horas =	0.2279807

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados.

Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Tabela 30: Resultado do teste T entre CONTROLE X NGF

Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF em 0 hora =	0.5745736
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF em 24 horas =	0.2481207
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF em 48 horas =	0.0624781
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF em 72 horas =	0.0176118
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF em 96 horas =	0.0262064

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Tabela 31: Resultado do teste F entre CONTROLE X NGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+MIT em 0 hora =	0.8531243
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+MIT em 24 horas =	0.2765985
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+MIT em 48 horas =	0.3043601
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+MIT em 72 horas =	0.0427876
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+MIT em 96 horas =	0.0677703

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Tabela 32: Resultado do teste T entre CONTROLE X NGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF+MIT em 0 hora =	0.8855808
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF+MIT em 24 horas =	0.0702833
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF+MIT em 48 horas =	0.0181250
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF+MIT em 72 horas =	0.0855775
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF+MIT em 96 horas =	0.1486201

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Tabela 33: Resultado do teste F entre CONTROLE X NGF VEÍCULO

Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+VEÍC. em 0 hora =	0.9143969
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+VEÍC. em 24 horas =	0.3355639
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+VEÍC. em 48 horas =	0.8932676
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+VEÍC. em 72 horas =	0.8835301
Significância(p) do teste F entre CTRL X NGF+VEÍC. em 96 horas =	0.5999304

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Tabela 34: Resultado do teste T entre CONTROLE X NGF VEÍCULO

Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF VEÍC. em 0 hora	=	0.7306300
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF VEÍC. em 24 horas	=	0.7106404
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF VEÍC. em 48 horas	=	0.8039005
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF VEÍC. em 72 horas	=	0.3911911
Significância(p) do teste T entre CTRL X NGF VEÍC. em 96 horas	=	0.8068156

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Tabela 35: Resultado do teste F entre CONTROLE X VEGF

Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF em 0 hora	=	0.9526964
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF em 24 horas	=	0.4919033
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF em 72 horas	=	0.4800724
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF em 96 horas	=	0.6417954

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias. Os dados do grupo VEGF em 48 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico de U-Mann Whitney

Tabela 36: Resultado do teste T entre CONTROLE X VEGF

Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF em 0 hora	=	0.9576083
Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF em 24 horas	=	0.9749877
Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF em 72 horas	=	0.6574675
Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF em 96 horas	=	0.5260081

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Os dados do grupo VEGF em 48 horas não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico U-Mann Whitney

Tabela 37: Resultado do teste F entre CONTROLE X VEGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF+MIT em 24 horas	=	0.1004653
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF+MIT em 48 horas	=	0.5742015
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF+MIT em 72 horas	=	0.0491962
Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF+MIT em 96 horas	=	0.1494172

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto, foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Os dados do grupo VEGF+MIT em 0 hora não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico U-Mann Whitney

Tabela 38: Resultado do teste T entre CONTROLE X VEGF+MITOMICINA

Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF+MIT em 24 horas = 0.0687797
Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF+MIT em 48 horas = 0.0160918
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF+MIT em 72 horas = 0.0748407
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF+MIT em 96 horas = 0.1401814

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Os dados do grupo VEGF+MIT em 0 hora não foram considerados neste ponto da análise porque este grupo não apresentou distribuição normal; portanto este grupo foi analisado com o teste não paramétrico U-Mann Whitney

Tabela 39: Resultado do teste F entre CONTROLE X VEGF VEÍCULO

Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF VEÍC. em 0 hora = 0.9224300
 Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF VEÍC. em 24 horas = 0.2891080
 Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF VEÍC. em 48 horas = 0.3961064
 Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF VEÍC. em 72 horas = 0.8476913
 Significância(p) do teste F entre CTRL X VEGF VEÍC. em 96 horas = 0.8588350

Os valores maiores que 0.05 (5%) indicam que não há diferenças significativas entre as variâncias dos dois conjuntos de dados. Portanto foi utilizado o teste t clássico que assume igualdade das duas variâncias

Tabela 40: Resultado do teste T entre CONTROLE X VEGF VEÍCULO

Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF VEÍC. em 0 hora = 0.7795437
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF VEÍC. em 24 horas = 0.7154310
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF VEÍC. em 48 horas = 0.9329916
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF VEÍC. em 72 horas = 0.8628249
 Significância(p) do teste T entre CTRL X VEGF VEÍC. em 96 horas = 0.7307029

Os valores da Significância (p) menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

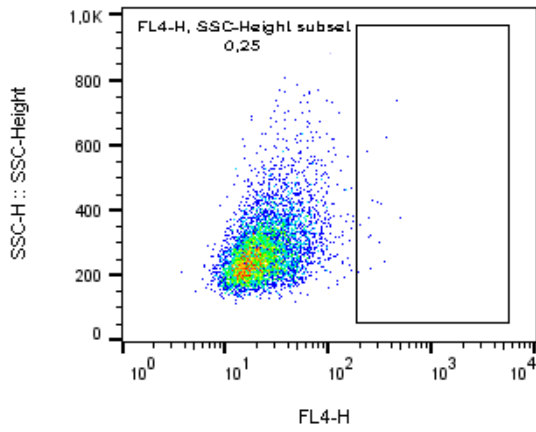
Tabela 41: Resultado dos testes de U-Mann Whitney nos grupos não paramétricos

Significância(p) do teste U entre CTRL X FGF em 72 horas = 0.0285714
 Significância(p) do teste U entre CTRL X FGF VEÍC em 24 horas = 0.1142857
 Significância(p) do teste U entre CTRL X VEGF em 48 horas = 0.6857143

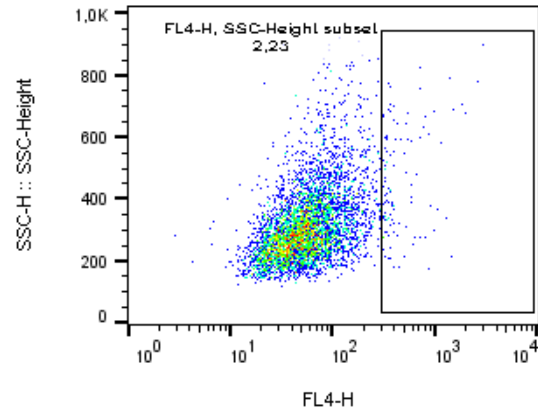
Os valores menores que 0.05 (5%) indicam que há diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados.

Apêndice E – Gráficos *dot-plot* representativos da análise por citometria de fluxo

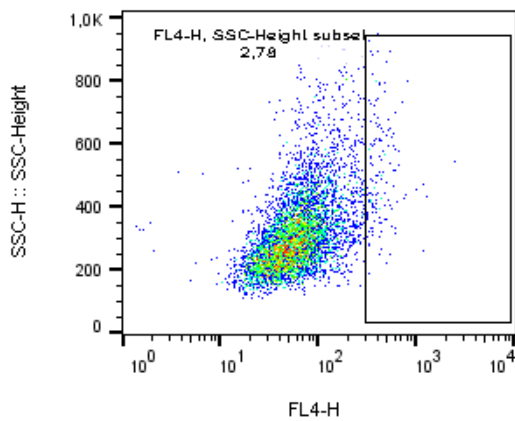
CK14 – 24 horas de experimento



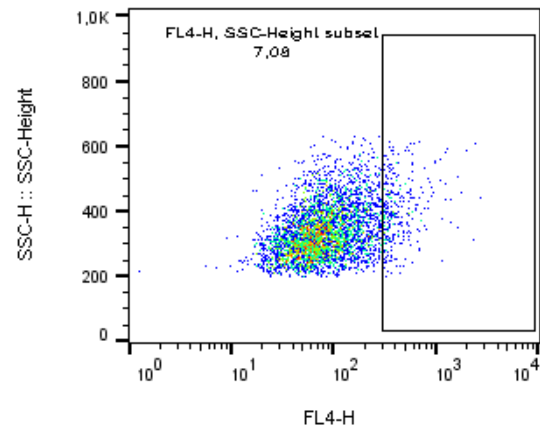
meio 24hs CK14 A647.001
CEC
7993



VEGF 24HS CK14 A647.011
CEC
7361

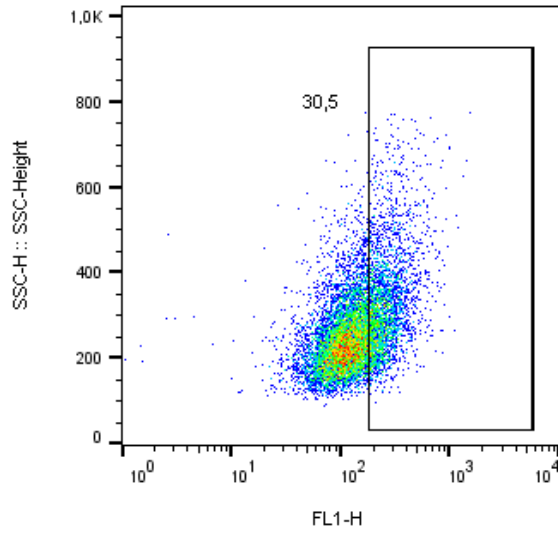


NGF 24HSCK14 A647.015
CEC
8061

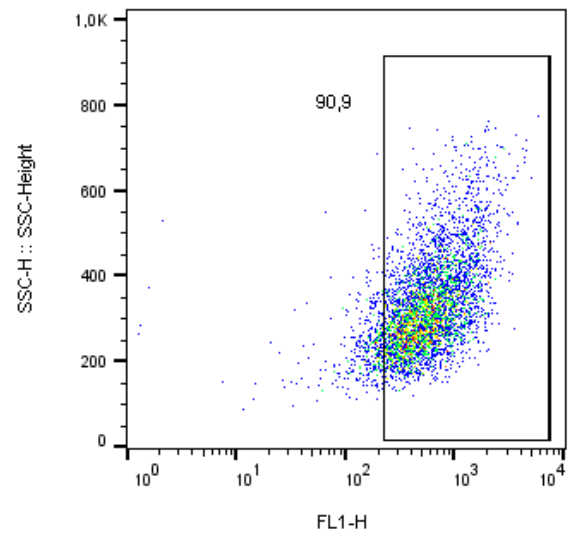


FGF- 24HS CK14 A647.006
CEC
5976

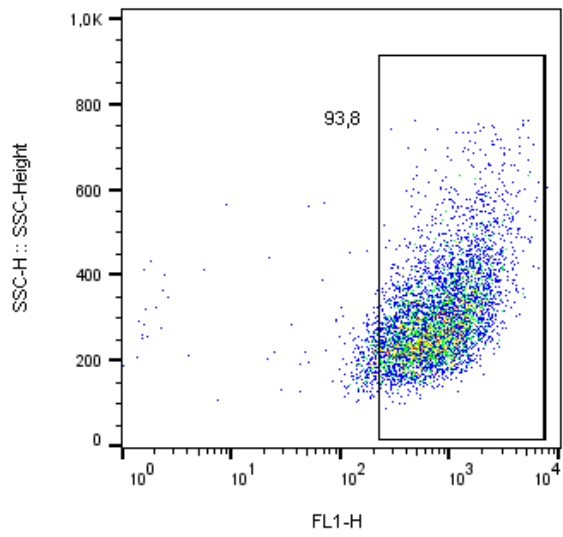
CK16 – 24 horas de experimento



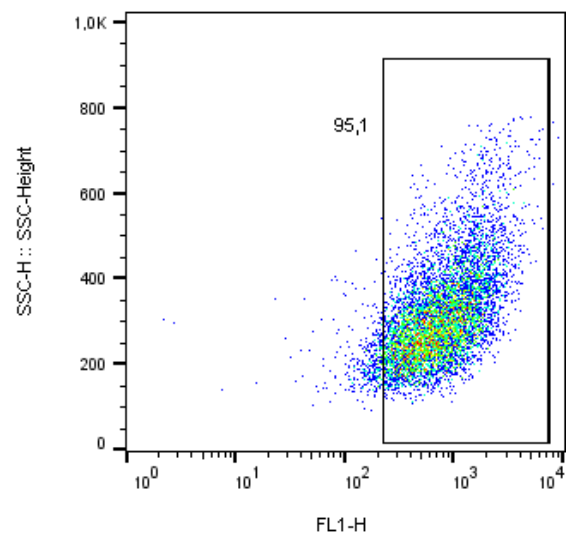
meio 24hs CK16 A488.002
CEC
10104



FGF- 24HS CK16 A88.007
CEC
4578

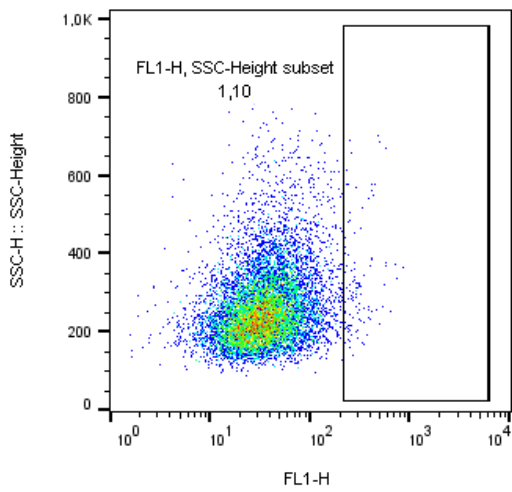


NGF 24HSCK16 A48.016
CEC
4912

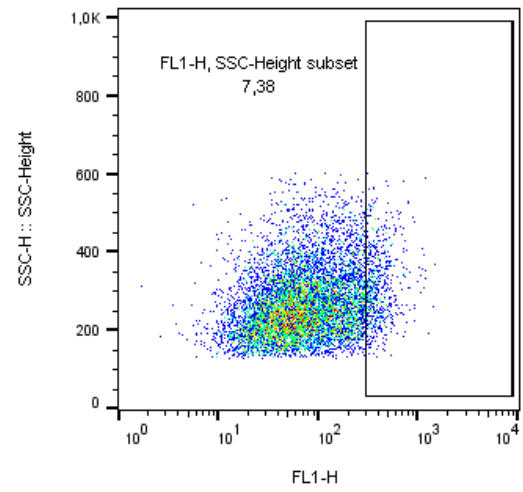


VEGF 24HS CK16 A488.012
CEC
7812

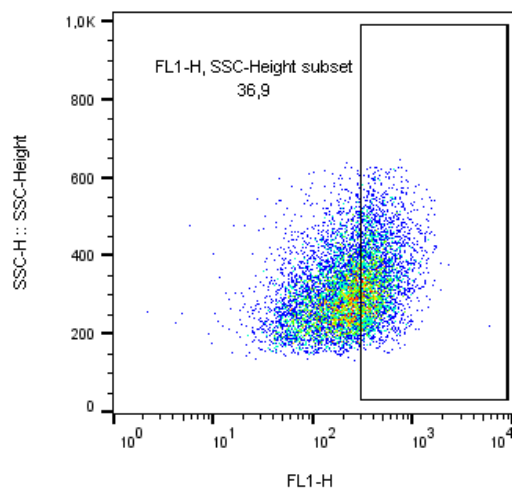
CK18 – 24 horas de experimento



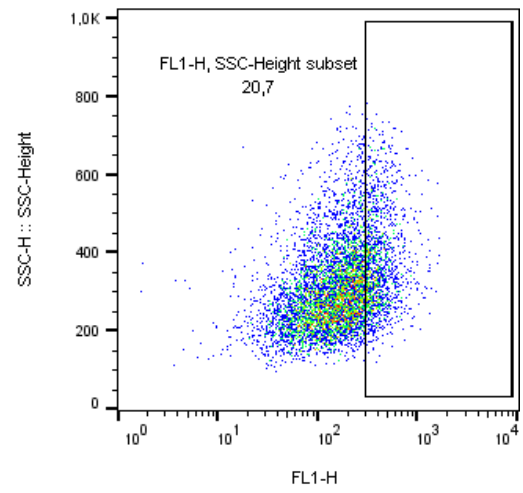
meio 24hs CK18 A488.003
CEC
10053



FGF 48H CK18 A488.021
CEC
8674

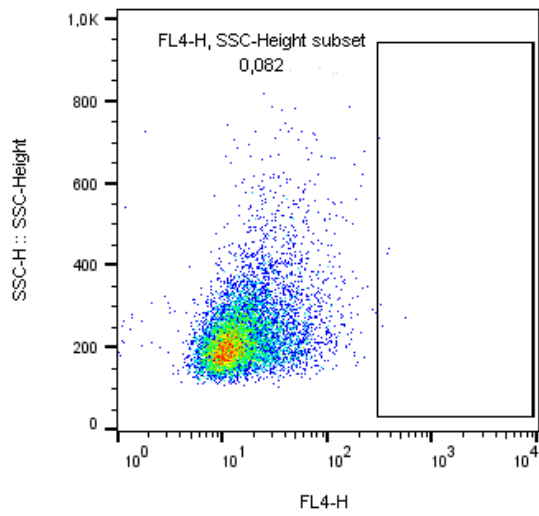


NGF 24HSCK18 A488.017
CEC
7957

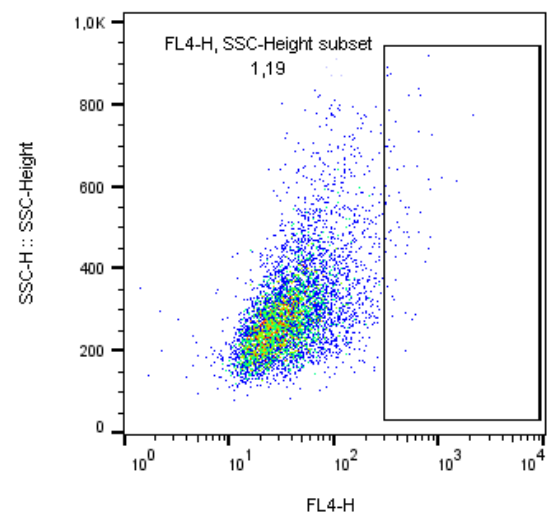


VEGF 24HS CK18 A488.013
CEC
6690

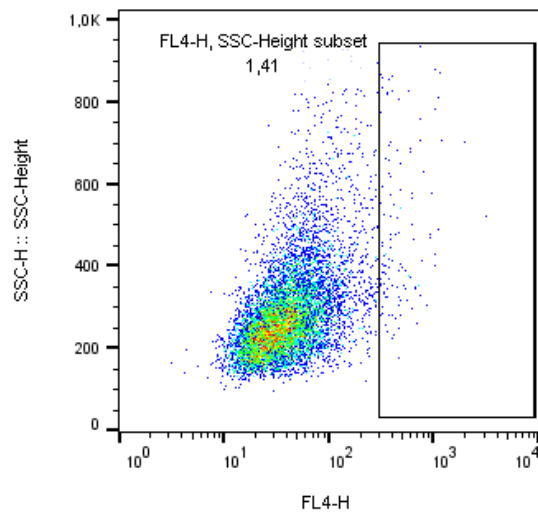
CK14 – 48 horas de experimento



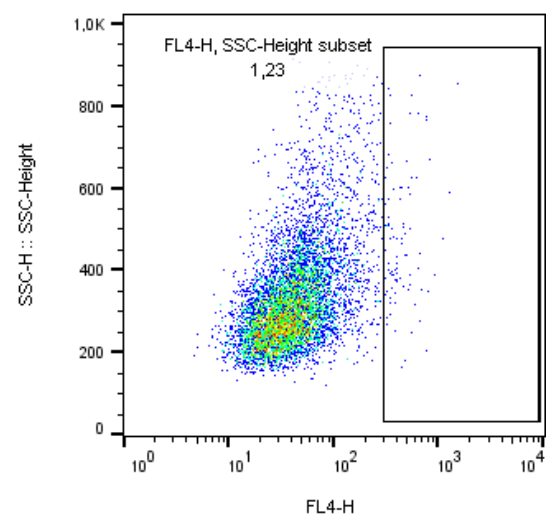
meio 48hs CK14 A647.004
CEC
8496



FGF 48H CK14 A647.019
CEC
5559

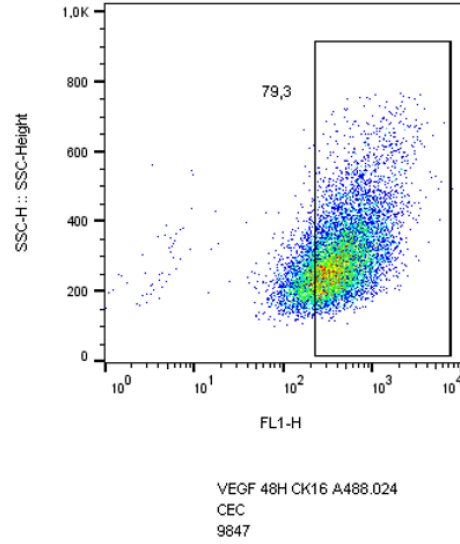
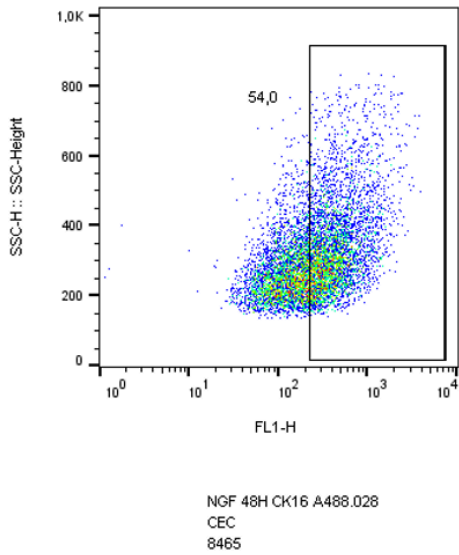
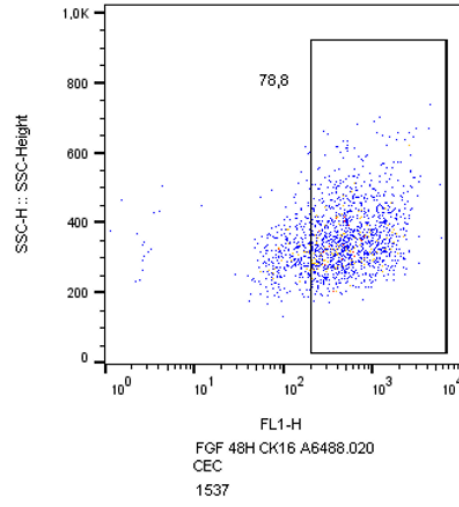
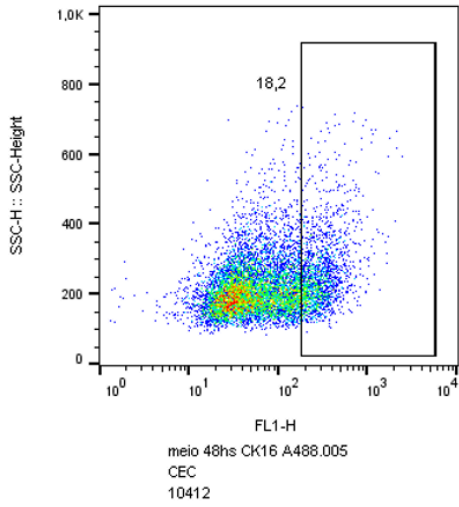


NGF 48H CK14 A647.027
CEC
8444

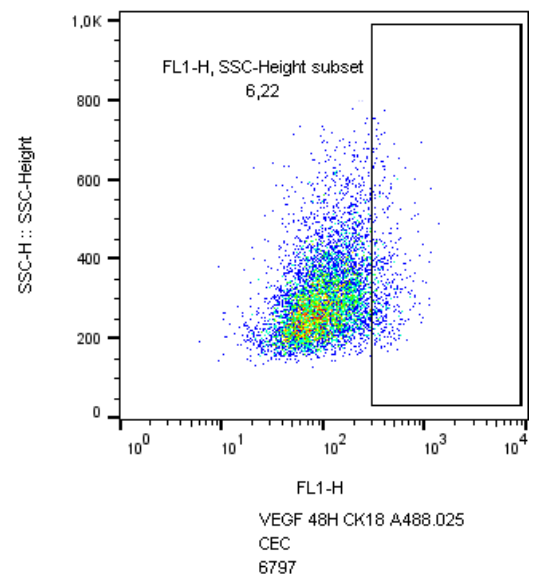
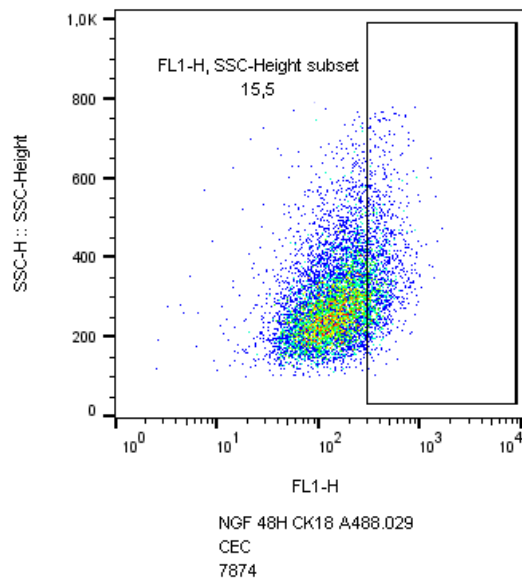
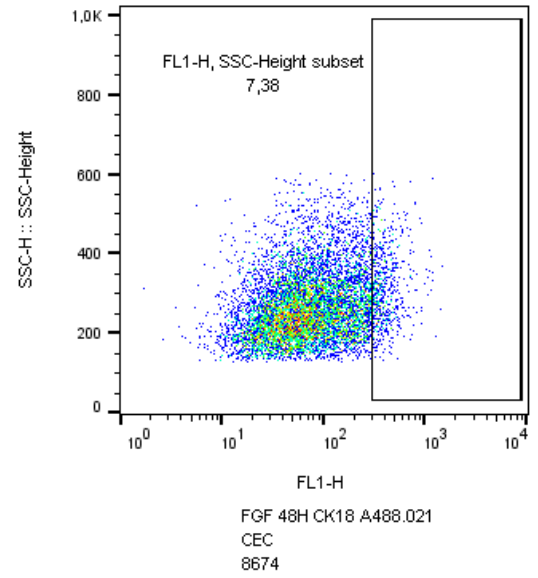
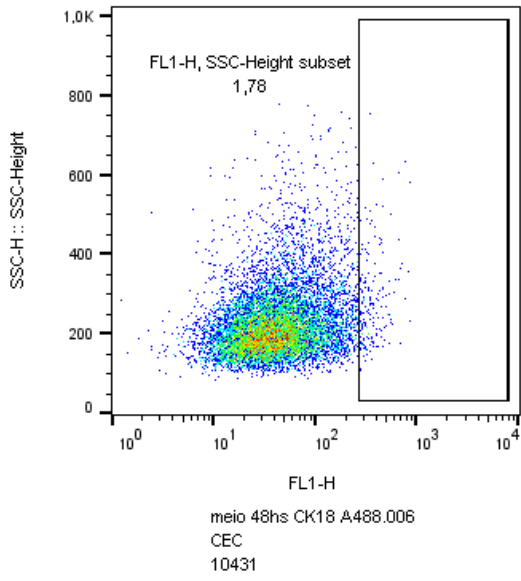


VEGF 48H CK14 A647.023
CEC
7424

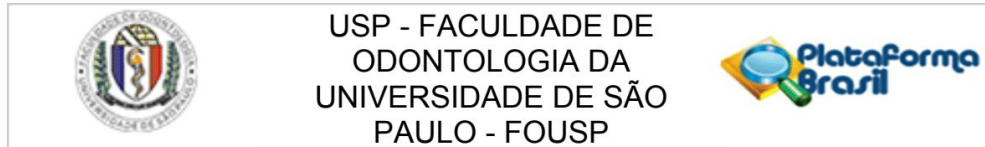
CK16 – 48 horas de experimento



CK18 – 48 horas de experimento



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE CRÍTICA DA EXPRESSÃO DE CITOQUERATINAS NA INVASÃO ANGIOLINFÁTICA, VASCULAR E PERINEURAL DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE

Pesquisador: Sílvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13706419.4.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.565.457

Apresentação do Projeto:

Muitos mecanismos de invasão do carcinoma epidermoide ainda não foram totalmente esclarecidos, um desses mecanismos poderia estar associado à mudança no padrão de expressão de citoqueratinas. O objetivo desse estudo retrospectivo é verificar se há alteração na expressão das citoqueratinas CK5, CK14, CK16, CK18 e CK19 no carcinoma epidermoide de língua e assoalho bucal, especificamente em regiões de invasão angiolímfática, vascular e perineural, validando os achados por meio de modelo experimental com cultura celular

Objetivo da Pesquisa:

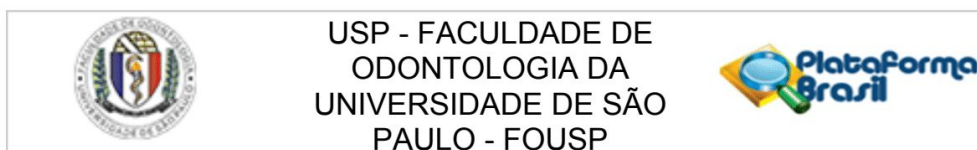
Objetivo Primário:

Verificar se há alteração na expressão das citoqueratinas CK5, CK14, CK16, CK18, CK19 no carcinoma epidermoide de língua e assoalho bucal, especificamente em regiões de invasão angiolímfática, vascular e perineural.

Objetivos Secundários:

- Caracterização dos dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos da amostra de CEC de língua com invasão linfática, vascular e perineural
- Verificar e detalhar o padrão de expressão de cada citoqueratina em regiões de invasão linfática, vascular e perineural, através de reações de imunohistoquímica e imunofluorescência
- Verificar experimentalmente em meio de cultura a expressão das citoqueratinas selecionadas,

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 3.565.457

simulando ambientes dos diferentes tipos de invasão

- Verificar estatisticamente se existe associação entre os aspectos clínicos e evolução da doença e a expressão de cada citoqueratina individualmente nos diferentes tipos de invasão

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador aponta como riscos:

Os riscos da pesquisa são aqueles inerentes à pesquisa com material de prontuário e atividades laboratoriais de risco baixo.

E aponta como Benefícios:

CIENTÍFICOS: O estudo poderá explicar aspectos ainda não esclarecidos da evolução do carcinoma epidermoide, aumentar as possibilidades de aprimorar os métodos de detecção precoce e precisa do grau de agressividade do tumor, facilitando a tomada de decisões clínicas e terapêuticas mais efetivas para o tratamento da doença. Também pode ser aplicado no desenvolvimento de novos fármacos no conceito de terapias-alvo.

ACADÊMICOS: aprendizado do aluno em diferentes técnicas de pesquisa e redação de trabalhos científicos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os resultados da pesquisa poderão contribuir para o conhecimento sobre mecanismos de invasão do carcinoma epidermoide de boca

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos pela Resolução CNS 466/12 foram anexados corretamente (Projeto Detalhado, Folha de Rosto, TCLE e/ou Autorização do Biobanco e/ou Autorização da Clínica Odontológica e/ou Autorização de Uso de Acervo).

Recomendações:

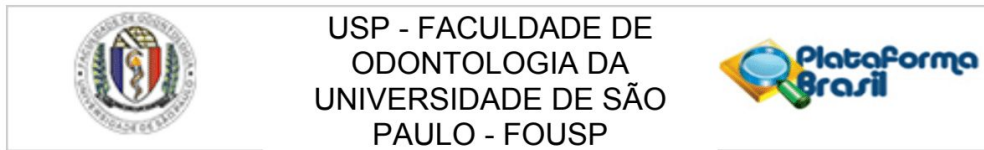
Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 3.565.457

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1284106.pdf	05/08/2019 16:25:55		Aceito
Outros	declaracaomenta.JPG	05/08/2019 16:25:26	Jaqueline Vaz Vanini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	05/08/2019 14:29:31	Jaqueline Vaz Vanini	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto2.pdf	14/05/2019 15:59:09	Jaqueline Vaz Vanini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Setembro de 2019

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br