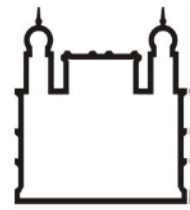




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

TESE DE DOUTORADO

**INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES *IN SILICO* E TRANSCRIPTOMA ESPACIAL PARA
O ESTUDO DE VIAS BIOLÓGICAS E ESTRUTURAS *CELL-IN-CELL*
NO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

LEONARDO DE OLIVEIRA SIQUARA DA ROCHA

Salvador - Bahia

2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES *IN SILICO* E TRANSCRIPTOMA ESPACIAL PARA
O ESTUDO DE VIAS BIOLÓGICAS E ESTRUTURAS *CELL-IN-CELL* NO
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

LEONARDO DE OLIVEIRA SIQUARA DA ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Humana e Experimental para obtenção
do grau de Doutor.

Orientadora: Profª. Dra. Clarissa Araújo Gurgel
Rocha

Salvador - Bahia

2025

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

R672i Rocha, Leonardo de Oliveira Siquara da

Integração de análises *in silico* e transcriptoma espacial para o estudo de vias biológicas e estruturas *cell-in-cell* no carcinoma oral de células escamosas. / Leonardo de Oliveira Siquara da Rocha. _alvador, 2025

141f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha.

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

1. Carcinomas de células escamosas orais. 2. Formação de célula em célula. 3. Transcriptoma. I. Título.

CDU 616-006.1

" INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES IN SILICO E TRANSCRIPTOMA ESPACIAL PARA O ESTUDO DE VIAS BIOLÓGICAS E ESTRUTURAS CELL-IN-CELL NO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS".

Leonardo de Oliveira Siquara da Rocha

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 30 de maio de 2025.

COMISSÃO EXAMINADORA



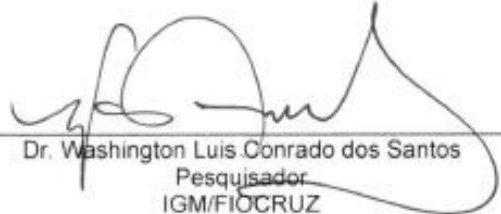
Dra. Aguida Cristina Gomes Henriques Leitão
Professora
UFBA



Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo
Professora
UFBA



Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor
UFBA



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Clarissa Araújo Gurgel
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior - Brasil (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq)
Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) Fiocruz-Bahia
Newton Fund - Academy of Medical Sciences

*À minha mãe, Maria Etiene Pinto de Oliveira,
por ser a base de cada sonho, conquista e passo que dou.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida.

À **minha mãe**, meu maior apoio e meu maior refúgio. Obrigado pelo seu amor incondicional, amparo constante e carinho reconfortante. De todos os tesouros e alegrias que posso ter na vida, a maior é ser seu filho. Te amo mais que tudo.

Aos **meus irmãos**, em especial a Daniella, Bruno, Tomás e Priscila, por me estenderem sempre a mão, vibrarem comigo e mostrarem amor sem medida.

À **minha família**, em especial a meu tio Alberto, tia Celina e tia Teresa, por me acompanharem, sempre torcendo e acreditando no meu sucesso.

A **Thaís**, pelo nosso elo de irmãos; pela cumplicidade e companheirismo que nos dá segurança de enfrentar tudo na vida, sabendo que teremos um ao outro.

A **Diego**, meu amor, pela parceria, confiança e incentivo. Obrigado por estar ao meu lado e dividir a vida comigo. Ela é muito mais doce e feliz ao seu lado.

Aos **meus amigos**, em especial a Bruno, Marcelle e Matheus, pela nossa amizade verdadeira, pelo acolhimento, compreensão e apoio mútuo. Amo vocês.

A **Sylvia, Solange e Guido**, por tornarem minha vida mais leve e plena.

À **minha orientadora, Dra. Clarissa Gurgel**, minha “ori”, obrigado mais uma vez por quem você é para mim. Obrigado pela amizade, pelo aprendizado, pelas conversas e pelos desafios enfrentados juntos. Obrigado por me ajudar a voar.

Ao **Dr. Daniel Lambert**, pela oportunidade e confiança que me foi dada, mas principalmente pelo acolhimento e suporte irrestrito.

Ao **Dr. Bruno Solano**, por me apoiar científica- e pessoalmente, se fazendo presente e me ajudando a ter visão para a realização dos meus objetivos.

A **Gisele Rocha**, principalmente pela amizade, mas também por todo o esforço e paciência ao longo do caminho. Sem você, esse trabalho não seria possível.

A **Zaki, meu amigo, e ao Dr. Khurram**, pela confiança e pela oportunidade de colaborarmos juntos. Acredito que estamos só no começo de nossa parceria.

A **Ludmila, Manuela, Rosane, Raíza e Vanessa**, pela nossa amizade que me dá força e pelos vários momentos de amor e alegria que preenchem a minha vida.

A **Iasmin, Marina e Roberto**, por serem base tão forte e presente no meu dia a dia. Obrigado pela confiança, suporte, acolhimento e compreensão sempre.

À **toda equipe e amigos do Gurgel Lab**, em especial a Viviane Saito e Raphael Nogueira, pelas palavras de apoio e encorajamento na realização desse sonho.

Aos meus amigos de Sheffield, por terem marcado a minha vida e pelas inúmeras memórias que criamos. Obrigado pela alegria e sorte de ter encontrado vocês e poder levá-los para a vida.

Aos amigos, equipe e funcionários do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, em especial a Roquelina Assis e Carolina Nonaka, pelo convívio e pelo imensurável suporte na realização desse trabalho.

A todos os amigos, equipe e funcionários do Instituto Gonçalo Moniz, em especial a Cleiton Guimarães, pela disposição e amizade de sempre.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), pela estrutura e receptividade na realização das minhas atividades.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia (PGPAT), pelo aprendizado e pelo acolhimento. Ser parte do PGPAT é um imenso orgulho.

Ao Instituto Gonçalo Moniz e à Fundação Oswaldo Cruz, pela pesquisa e trabalho sério e de qualidade, do qual eu tenho a honra de fazer parte.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina-UFBA, ao qual sou vinculado como estudante do PGPAT.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA), minha casa, por tudo que aprendi e que me comprometo a retribuir, pela educação e saúde pública brasileira.

À Universidade de Sheffield, pela oportunidade de realizar o sonho de estudar fora, e por enriquecer a construção da minha carreira.

À Universidade de Nottingham e equipe 10x Genomics, em especial a Monika Dabrowska, por viabilizar e acompanhar com zelo a execução desse trabalho.

Ao Newton Fund da Academy of Medical Sciences, pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

"Nunca subestime a grande importância das pequenas coisas."

(Matt Haig, A Biblioteca da Meia-Noite)

ROCHA, Leonardo de Oliveira Siquara da. **Integração de análises *in silico* e transcriptoma espacial para o estudo de vias biológicas e estruturas *cell-in-cell* no carcinoma oral de células escamosas**. 2025. 141f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma oral de células escamosas (COE) é um tumor agressivo cuja progressão é influenciada pelas interações no microambiente tumoral. Fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e estruturas *cell-in-cell* (CIC) têm emergido como elementos críticos na modulação da plasticidade tumoral, remodelação tecidual e evasão imune. Contudo, a influência espacial dos CAFs sobre a expressão gênica tumoral, particularmente relacionada à formação de CICs, ainda é pouco compreendida. **OBJETIVO:** Investigar os transcritos tumorais associados a processos biológicos de remodelação tecidual, adesão celular e plasticidade tumoral (incluindo a formação de estruturas CIC), bem como a influência dos CAFs e do microambiente tumoral no transcriptoma espacial de esferoides e tecido de COE, respectivamente. **MÉTODO:** Foi realizada uma análise *in silico* utilizando dados do TCGA para identificar transcritos tumorais com maior variabilidade de expressão e estabelecer redes de correlação gênica e enriquecimento funcional. Análises adicionais de expressão gênica foram realizadas em linhagens tumorais. Modelos tridimensionais de esferoides de COE foram gerados por bioprinting magnético (NanoShuttle-PL™, Greiner Bio-One) utilizando células tumorais (SCC-4 e H357) e fibroblastos normais e ativados (NHOF e NHOF-MYO). Após fixação, processamento e construção de TMA, foi realizada análise de transcriptoma espacial com a plataforma Xenium™ (10x Genomics). Um caso clínico de COE também foi analisado por transcriptoma espacial Visium™ (10x Genomics) e histologia para avaliação translacional dos achados. **RESULTADOS:** A análise *in silico* identificou os transcritos tumorais mais variáveis associados a remodelamento da matriz extracelular, plasticidade tumoral e adesão celular, além de redes funcionais associadas. A análise espacial revelou padrões de expressão gênica associados à presença de fibroblastos ativados nos esferoides tumorais e no caso clínico, envolvendo genes ligados a fenótipos mais agressivos e formação de estruturas CIC. **CONCLUSÕES:** O estudo sugere que fibroblastos associados ao câncer podem influenciar a expressão gênica de tumores de COE de forma espacialmente organizada, favorecendo perfis associados a remodelamento tecidual, plasticidade e formação de estruturas CIC. A abordagem integrativa envolvendo análises *in silico*, modelos tridimensionais e casos clínicos reforça o caráter translacional da pesquisa e contribui para uma compreensão mais abrangente das interações tumor-estroma no COE.

Palavras-chave: Carcinomas de células escamosas orais. Formação de célula em célula. Transcriptoma.

ROCHA, Leonardo de Oliveira Siquara da. **Integrating *in silico* analyses and spatial transcriptomics in the study of biological pathways and cell-in-cell structures in oral squamous cell carcinoma.** 2025. 141f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an aggressive tumor whose progression is influenced by tumor microenvironment interactions. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) and cell-in-cell (CIC) structures have emerged as critical elements in modulating tumor plasticity, tissue remodeling, and immune evasion. However, the spatial influence of CAFs on tumor gene expression, particularly regarding CIC formation, remains poorly understood. **AIM:** To investigate the tumor transcripts associated with key biological processes in tissue remodeling, cell adhesion, and tumor plasticity (including the formation of CIC structures), as well as the influence of CAFs and the tumor microenvironment on the spatial transcriptome of OSCC spheroids and tissue. **MATERIAL AND METHODS:** An *in silico* analysis was performed using TCGA data to identify highly variable tumor transcripts and to establish gene correlation and functional enrichment networks. Gene expression analyses were also conducted on OSCC cell lines. Three-dimensional tumor spheroids were generated via magnetic bioprinting (NanoShuttle-PL™, Greiner Bio-One) using OSCC cell lines (SCC-4 and H357) and normal or activated fibroblasts (NHOF and NHOF-MYO). After fixation, processing, and TMA construction, spatial transcriptomics analysis was performed using the Xenium™ platform (10x Genomics). Additionally, a clinical OSCC case was analyzed through Visium™ spatial transcriptomics and histology for translational evaluation. **RESULTS:** The *in silico* analysis identified the most variable tumor transcripts associated with extracellular matrix remodeling, tumor plasticity, and cell adhesion, as well as functional enrichment networks. Spatial transcriptomics revealed gene expression patterns associated with the presence of activated fibroblasts in tumor spheroids and in the clinical case, involving genes linked to more aggressive phenotypes and the formation of CIC structures. **CONCLUSIONS:** The findings suggest that cancer-associated fibroblasts may influence tumor gene expression in OSCC in a spatially organized manner, favoring profiles associated with tissue remodeling, plasticity, and CIC formation. The integrative approach, combining *in silico* analyses, 3D models, and clinical samples, reinforces the translational relevance of the study and contributes to a deeper understanding of tumor-stroma interactions in OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Cell-in-cell formation. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do microambiente tumoral no carcinoma oral de células escamosas (COE).	25
Figura 2	Representação esquemática dos fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no carcinoma oral de células escamosas (COE).	27
Figura 3	Mecanismos de formação de estruturas <i>cell-in-cell</i> (CIC).	31
Figura 4	Representação esquemática dos principais modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular utilizados na pesquisa em câncer.	34
Figura 5	Representação esquemática das etapas <i>in silico</i> .	41
Figura 6	Representação esquemática do processo de <i>bioprinting</i> magnético para formação de esferoides.	47
Figura 7	Fluxograma ilustrativo do protocolo experimental da plataforma Xenium.	49
Figura 8	Gráfico de dispersão (<i>volcano plot</i>) demonstrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados na análise do TCGA para carcinoma oral de células escamosas (COE).	53
Figura 9	Análise de agrupamento (<i>clustering</i>) dos genes em módulos de coexpressão identificados a partir dos dados do TCGA voltados para carcinoma de cabeça e pescoço (TCGA-HNSC).	54
Figura 10	<i>Heatmap</i> de correlação dos genes mais variados.	55
Figura 11	Fluxograma de identificação e seleção dos genes de interesse.	56
Figura 12	Relação entre os genes dos módulos <i>pink</i> , <i>blue</i> e <i>green</i> e processos biológicos no câncer, baseados no artigo seminal “The Hallmarks of Cancer - New Dimensions” (Hanahan, 2022).	58
Figura 13	Diagrama de corda (<i>chord plot</i>) do módulo <i>pink</i> .	59
Figura 14	Diagrama de corda (<i>chord plot</i>) do módulo <i>blue</i> .	60
Figura 15	Diagrama de corda (<i>chord plot</i>) do módulo <i>green</i> .	62
Figura 16	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>pink</i> em linhagens celulares tumorais e não tumorais de carcinoma oral de células escamosas (COE), classificadas também por grupos.	65

Figura 17	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>blue</i> em linhagens celulares tumorais e não tumorais de carcinoma oral de células escamosas (COE).	66
Figura 18	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>green</i> em linhagens celulares tumorais e não tumorais de COE.	67
Figura 19	Expressão relativa (<i>fold change</i>) de α -SMA em fibroblastos humanos orais normais (NHOF) após ativação com TGF- β .	69
Figura 20	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>pink</i> em esferoides tumorais cultivados <i>in vitro</i> .	71
Figura 21	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>blue</i> em esferoides tumorais cultivados <i>in vitro</i> .	72
Figura 22	<i>Heatmap</i> demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo <i>green</i> em esferoides tumorais cultivados <i>in vitro</i> .	73
Figura 23	Análise de transcriptômica espacial em esferoides tumorais.	75
Figura 24	Corte histológico acompanhado do mapa de <i>clusters</i> espaciais.	76
Figura 25	Expressão gênica para os módulos funcionais identificados no caso de COE.	78
Figura 26	Perfil de expressão de genes relacionados à angiogênese.	79
Figura 27	Perfil de expressão gênica relacionado à atividade de CAFs.	80
Figura 28	Perfil de expressão gênica relacionado à inflamação imunidade.	81
Figura 29	Perfil de expressão gênica relacionado à invasão/metástase.	82
Figura 30	Perfil de expressão gênica relacionado ao metabolismo/estresse.	83
Figura 31	Perfil de expressão gênica relacionado à resistência terapêutica.	84
Figura 32	Perfil de expressão gênica relacionado ao remodelamento da matriz extracelular (MEC).	85
Figura 33	Perfil de expressão gênica relacionado à <i>stemness</i> .	86
Figura 34	Perfil de expressão gênica relacionado à transição epitélio-mesenquimal (TEM).	87
Figura 35	Localização de estruturas <i>cell-in-cell</i> (CIC) no caso de carcinoma oral de células escamosas (COE).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos de esferoides utilizados no estudo	48
Tabela 2	Distribuição dos genes mais variados presentes nos módulos de coexpressão <i>pink</i> , <i>blue</i> e <i>green</i>	57
Tabela 3	Grupos funcionais identificados a partir da análise de enriquecimento dos módulos de coexpressão, incluindo os genes pertencentes a cada grupo e suas principais características funcionais	63
Tabela 4	Caracterização funcional dos módulos de coexpressão e suas principais funções biológicas	64
Tabela 5	Comparação do perfil de expressão gênica entre linhagens tumorais e não tumorais de COE por grupos funcionais	68
Tabela 6	Perfil de expressão gênica por grupo funcional em esferoides tumorais cultivados com NHOF ou CAF, destacando os principais genes alterados em cada condição	74
Tabela 7	Descrição dos <i>clusters</i> identificados na análise de segmentação espacial do caso de COE, destacando sua correspondência com características tumorais e localização	77
Tabela 8	Valores de expressão (\log_2FC) dos transcritos dos <i>clusters</i> com CIC	90

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
CAF	Fibroblasto associado ao câncer (<i>cancer-associated fibroblast</i>)
CC	Componentes Celulares
CIC	Célula-em-célula (<i>cell-in-cell</i>)
CL	<i>Cluster</i>
COE	Carcinoma oral de células escamosas
DEG	Genes diferencialmente expressos (<i>differentially expressed genes</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FF	Tecido fresco (<i>fresh-frozen</i>)
FFPE	Tecido fixado em formalina e incluído em parafina (<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
FM	Funções moleculares
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Ontologia Gênica (<i>Gene Ontology</i>)
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
Log2FC	<i>Variação logarítmica da expressão gênica (log2 fold change)</i>
ME	Eigengene do módulo (<i>module eigengene</i>)
MEC	Matriz extracelular
MM	Associação do gene ao módulo (<i>module membership</i>)
NHOF	Fibroblastos humanos orais normais (<i>normal human oral fibroblasts</i>)
NHOF-MYO	NHOFs com fenótipo miofibroblástico (<i>myofibroblastic NHOFs</i>)
NHOF NEG	Controle de NHOF não tratado com TGF- β
NTC	Controle negativo da reação (<i>no template control</i>)
PB	Processos biológicos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldeído (<i>paraformaldehyde</i>)
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>

TCGA-HNSC	Banco de dados voltados para carcinoma de cabeça e pescoço do TCGA (<i>head and neck squamous cell</i>)
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TMA	Microarranjo tecidual (<i>tissue microarray</i>)
TNM	– Sistema de estadiamento tumoral (tumor, linfonodo, metástase) (<i>tumor, node, metastasis staging system</i>)
WGCNA	Análise de Redes Ponderadas de Coexpressão Gênica (<i>Weighted Gene Co-Expression Network Analysis</i>)

LISTA DE GENES, PROTEÍNAS, MOLÉCULAS E VIAS

Para nomes e informações dos genes presentes nos módulos *pink*, *blue* e *green* (item 5.2.3), consultar a Tabela Suplementar S2. Abaixo estão listados os demais genes, proteínas e vias citados ao longo do texto. Genes e proteínas com o mesmo nome foram agrupados em um único registro (*gene/proteína*), e apenas itens com nomes abreviados foram incluídos para consulta.

<i>α-SMA</i>	Alfa-actina de músculo liso (<i>alpha-smooth muscle actin</i>)
<i>ACTB</i>	Actina beta (<i>actin beta</i>)
<i>AKT</i>	Proteína quinase B (<i>protein kinase B</i>)
<i>ANGPTL3</i>	Proteína semelhante à angiopoietina 3 (<i>angiopoietin-like 3</i>)
<i>Cav-1</i>	Caveolina-1 (<i>caveolin-1</i>)
<i>CD</i>	Proteína de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>) (ex.: CD68, CD86)
<i>CXCL12</i>	Quimiocina C-X-C motivo ligante 12 (<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>)
<i>EREG</i>	Epiregulina (<i>epiregulin</i>)
<i>ERK</i>	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
<i>FAP</i>	Proteína de ativação de fibroblastos (<i>fibroblast activation protein</i>)
<i>FERMT2</i>	Kindlina 2 com domínio FERM (<i>FERM domain containing kindlin 2</i>)
<i>HAS2</i>	Sintase 2 de ácido hialurônico (<i>hyaluronan synthase 2</i>)
<i>HIF1A/HIF1A</i>	Fator induzido por hipóxia 1 alfa (<i>hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>)
<i>IFN-γ</i>	Interferon gama (<i>interferon gamma</i>)
<i>IL</i>	Interleucina (<i>interleukin</i>) (ex.: IL-1β, IL-8)
<i>IL-1β/NF-κB</i>	Via interleucina 1 beta/Fator nuclear kappa B (<i>interleukin 1 beta/nuclear factor kappa B</i>)
<i>JAK/STAT</i>	Via Janus quinase/Transdutor de sinal e ativador de transcrição (<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>)
<i>LOX</i>	Lisil oxidase (<i>lysyl oxidase</i>)
<i>MAPK</i>	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
<i>MMP</i>	Metaloproteinases de matriz (ex.: MMP-1, MMP-2, MMP-3) (<i>matrix metalloproteinases</i>)

NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NOTCH3	Receptor Notch 3 (<i>notch receptor 3</i>)
p16INK4A	Proteína inibidora da quinase dependente de ciclina 2A (<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>)
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas BB (<i>platelet-derived growth factor BB</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (<i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PIK3CA	Subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>)
Rho-ROCK	Via de sinalização Rho-ROCK (proteínas Rho GTPase e Rho-associated kinase) (<i>Rho GTPase and Rho-associated kinase signaling pathway</i>)
SDF1	SDF1 – Fator derivado do estroma 1 (<i>stromal cell-derived factor 1</i>)
Smad	Proteína associada à transdução de sinal do TGF-β (<i>SMAD family member</i>)
SOX9	Fator de transcrição SRY-box 9 (<i>SRY-box transcription factor 9</i>)
STAT	Transdutor e ativador de transcrição de sinal (<i>signal transducer and activator of transcription</i>) (Ex.: STAT3)
TCF	Fator de transcrição (<i>transcription factor 15</i>) (ex.: TCF15)
TGF-β	TGF-β – Fator de crescimento transformador beta (ex.: TGF-β1) (<i>transforming growth factor beta</i>)
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases (ex.: TIMP-1, TIMP-3) (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TP53	Proteína tumoral p53 (<i>tumor protein p53</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VIM	Vimentina (<i>vimentin</i>)
Wnt	Via Wnt (<i>Wingless-related integration site</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Carcinoma oral de células escamosas	22
1.2	O microambiente tumoral	23
1.3	Fibroblastos associados ao câncer	26
1.4	Estruturas cell-in-cell	29
1.5	Modelos tridimensionais	33
1.6	Transcriptômica espacial	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	HIPÓTESE	39
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo geral	40
4.2	Objetivos específicos	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	Caracterização do estudo	41
5.2	In silico	41
5.2.1	Identificação dos DEGs em COE	41
5.2.2	Análise de coexpressão gênica	43
5.2.3	Enriquecimento funcional dos genes por módulo	42
5.2.4	Filtragem dos genes por painel de transcriptômica espacial	43
5.2.5	Análise de expressão em linhagens celulares tumorais e não tumorais	44
5.3	In vitro	45
5.3.1	Cultivo das linhagens celulares	45
5.3.2	Indução do fenótipo ativado em fibroblastos normais	45
5.3.3	Obtenção dos esferoides por bioprinting magnético	46
5.3.4	Fixação, inclusão e construção do TMA dos esferoides	48
5.3.5	Obtenção dos dados de transcriptômica espacial dos esferoides	48
5.3.6	Análise espacial de expressão gênica dos esferoides	50
5.4	Estudo de caso	50
5.4.1	Origem e caracterização do caso de COE	50
5.4.2	Obtenção dos dados de transcriptômica espacial e histologia do caso	51
5.4.3	Análise de expressão gênica espacial do caso	51
5.4.4	Avaliação de estruturas cell-in-cell nas imagens histológicas	52

6	RESULTADOS	53
6.1	Ensaio in silico	53
6.1.1	Análise do perfil transcriptômico de casos de COE (TCGA)40	53
6.1.2	Análise de módulos de coexpressão	54
6.1.3	Análise de enriquecimento funcional	57
6.1.3.1	Módulo pink	58
6.1.3.2	Módulo blue	60
6.1.3.3	Módulo green	61
6.1.4	Caracterização dos grupos funcionais	62
6.1.5	Análise do transcriptoma de linhagens celulares (GEO)	64
6.2	Ensaio in vitro	69
6.2.1	Obtenção dos perfis de fibroblastos ativado (NHOF-MYO)	69
6.2.2	Perfil transcriptômico dos esferoides tumorais obtidos in vitro	70
6.3	Análise do caso de COE	76
6.3.1	Perfil transcriptômico do caso de COE	76
6.3.1.1	Perfil funcional relacionado à angiogênese	78
6.3.1.2	Perfil funcional relacionado à atividade de CAFs	79
6.3.1.3	Perfil funcional relacionado à inflamação/imunidade	80
6.3.1.4	Perfil funcional relacionado à invasão/metástase	81
6.3.1.5	Perfil funcional relacionado ao metabolismo/estresse	82
6.3.1.6	Perfil funcional relacionado à resistência terapêutica	83
6.3.1.7	Perfil funcional relacionado ao remodelamento da MEC	84
6.3.1.8	Perfil funcional relacionado a stemness (perfil de células-tronco)	85
6.3.1.9	Perfil funcional relacionado à TEM	86
6.3.2	Perfil transcriptômico comparativo entre linhagens, esferoides e caso de CO	87
6.3.3	Avaliação das estruturas CIC no COE	88
7	DISCUSSÃO	91
8	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A - MATERIAIS SUPLEMENTARES	127
	APÊNDICE B - ARTIGOS DO AUTOR	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma oral de células escamosas

O carcinoma oral de células escamosas (COE) representa aproximadamente 90% dos casos de câncer de boca (González-Ruiz *et al.*, 2023; Tan, Yunhan *et al.*, 2023), configurando-se como um desafio significativo para a saúde global (Cunha *et al.*, 2023). As estimativas globais para esse tumor são de aproximadamente 377.000 novos casos e 177.000 mortes anuais (González-Ruiz *et al.*, 2023). O COE é um tumor de células epiteliais caracterizado pelo seu perfil agressivo (Cunha *et al.*, 2023). Apesar dos avanços nas modalidades de tratamento, sua taxa de sobrevivência em cinco anos permanece baixa, em torno de 50%, principalmente devido ao diagnóstico tardio (Abadeh *et al.*, 2019; González-Ruiz *et al.*, 2023; Tadikamalla, 2024). A etiopatogenia do COE é multifatorial, abrangendo tanto fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais, como o uso do tabaco e o consumo de álcool que possuem efeito protumoral sinérgico quando combinados (Cunha *et al.*, 2023; González-Ruiz *et al.*, 2023). Outros fatores de risco incluem exposição crônica ao sol (particularmente para cânceres de lábio) e infecção pelo papilomavírus humano (Keck *et al.*, 2015).

A base molecular do COE envolve alterações genéticas complexas que levam ao desenvolvimento do tumor. A progressão do COE ocorre através de mudanças genéticas que ativam oncogenes e inativam genes supressores de tumor, em especial mutações nos genes *TP53*, *PIK3CA* e *CDKN2A* (Almangush *et al.*, 2017; Cirillo *et al.*, 2017; Saluja *et al.*, 2020). Em alguns casos, o processo de progressão ocorre desde uma displasia, até a invasão tecidual que caracteriza um carcinoma (Khalid *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2011). Sua assinatura gênica envolve processos relacionados à infiltração imune (Almangush *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2022), plasticidade celular (células-tronco) (Lee, Jin Woo; Lee, 2021) e a vias específicas de sinalização, como a via do PI3K-AKT (Ghafouri-Fard *et al.*, 2022), Wnt, Notch, e Hedgehog (Guimaraes *et al.*, 2020; Patni *et al.*, 2021).

O manejo do COE permanece desafiador, exigindo uma abordagem multidisciplinar que combine cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Mohamad *et al.*, 2023). A cirurgia segue como a principal modalidade para casos não metastáticos, especialmente em estágios iniciais (Kusukawa, 2011). Para tumores localmente avançados, frequentemente são necessários procedimentos extensos, como mandibulectomias parciais ou totais, que resultam em severos comprometimentos funcionais, afetando mastigação, deglutição e fala (Kumari *et al.*, 2024).

Estas limitações impactam significativamente a qualidade de vida dos pacientes, promovendo isolamento social e dificuldades de reintegração profissional.

No contexto de doença localmente avançada ou metastática, a quimioterapia adjuvante ou paliativa, baseada em fármacos como cisplatina, 5-fluorocil (5-FU) e docetaxel, é amplamente empregada (Mohamad *et al.*, 2023; Tadikamalla, 2024). A quimioterapia neoadjuvante com esquemas como docetaxel-cisplatina-5-FU tem demonstrado algum benefício na redução do tamanho tumoral e na melhoria da ressecabilidade (Noronha *et al.*, 2024), porém sua efetividade permanece limitada, com taxas de recorrência de 25-45% (Kim, Hyosik; Lee; Ahn, 2024) e ganho modesto de sobrevida global. Além disso, os efeitos adversos sistêmicos, como mucosite, imunossupressão e nefrotoxicidade, limitam a adesão e a qualidade de vida dos pacientes (Jasiewicz; Qurban; Hughes, 2022).

Embora avanços terapêuticos recentes, como a imunoterapia com inibidores de *checkpoint* imunológico (pembrolizumabe, nivolumabe) (Silva *et al.*, 2023; Srikanthan *et al.*, 2024; Wondergem *et al.*, 2024) e a incorporação de terapias-alvo venham ampliando as opções para o tratamento do COE, os ganhos clínicos ainda são modestos e restritos a subgrupos específicos de pacientes (Li, Xia *et al.*, 2021; Liu, Chang *et al.*, 2024; Zhu, Xiayi *et al.*, 2025). Além disso, o custo elevado dessas estratégias impõe um desafio significativo para a sustentabilidade dos sistemas públicos de saúde, particularmente em países de baixa e média renda, onde as taxas de mortalidade por câncer de boca e cavidade oral permanecem elevadas (Cunha *et al.*, 2023).

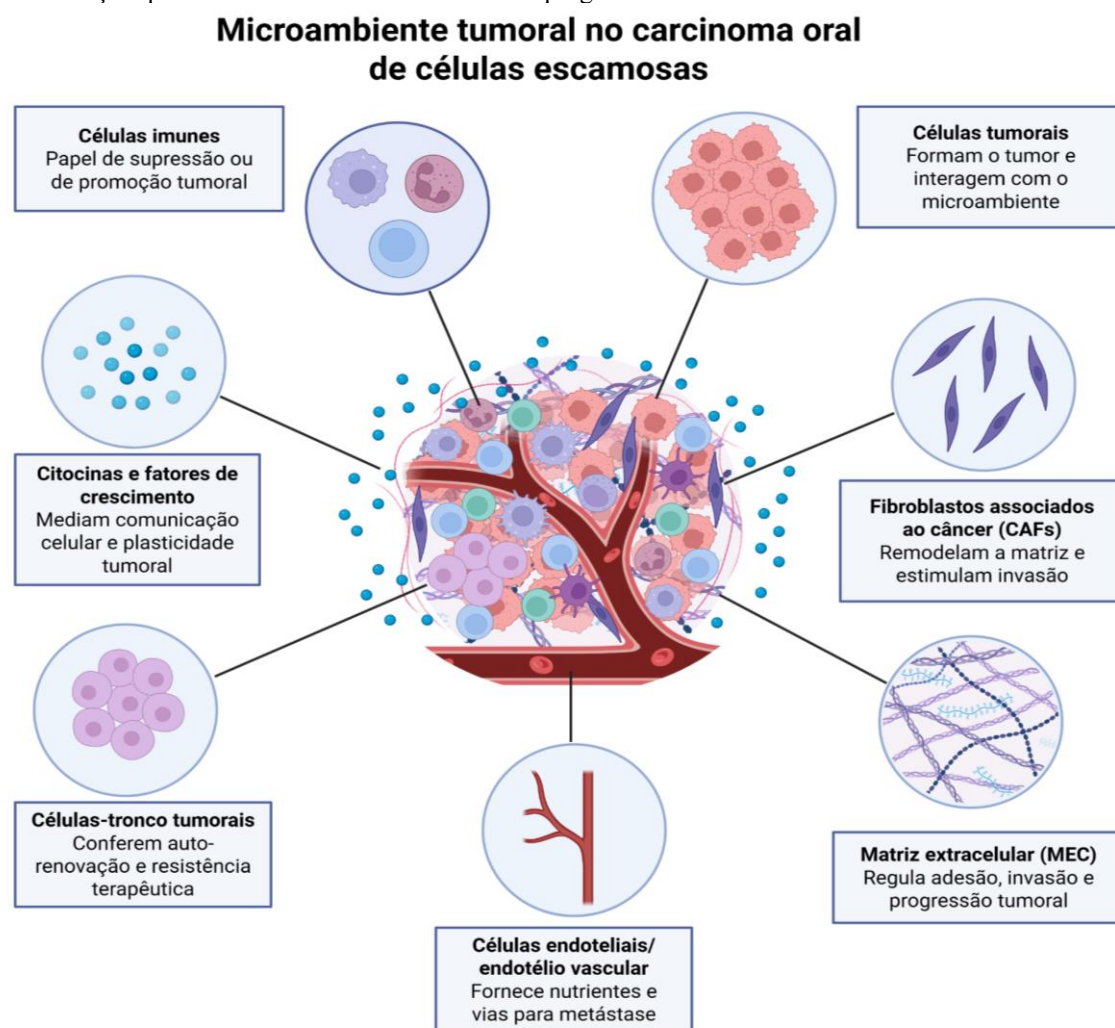
1.2 O microambiente tumoral

Por décadas, o desenvolvimento tumoral esteve relacionado a alterações genéticas não-letais em oncogenes e genes supressores tumorais. Atualmente, entretanto, o câncer é reconhecido como uma doença sistêmica complexa onde o microambiente, microbioma e sistemas biológicos, tais como a resposta imune (Liu, Chunxiao *et al.*, 2024; Ugai *et al.*, 2024, p. 202; Zhang, Haohong *et al.*, 2024), estão envolvidos no desenvolvimento e a progressão tumoral.

O microambiente tumoral é uma rede de componentes celulares e não-celulares que interagem com células tumorais, afetando seu desenvolvimento e resposta ao tratamento (Kim, Jue Young; Moon; Kim, 2022; Shrivastava *et al.*, 2023) (Figura 1). Estes elementos regulam a proliferação tumoral, invasão, angiogênese, metástase e resistência à quimioterapia (Kayamori *et al.*, 2016; Parkinson; James; Prime, 2016). Entre os componentes celulares, destacam-se as

células-tronco tumorais, que possuem capacidade de autorrenovação e são resistentes a terapias convencionais através de mecanismos como reparo de DNA e ativação de vias antiapoptóticas (Saluja *et al.*, 2020); os fibroblastos associados ao câncer (CAFs), que remodelam os componentes extracelulares e criam um ambiente pró-tumoral (Bello *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2021); e as células imunes, especialmente os macrófagos associados ao tumor, que promovem angiogênese e imunossupressão (Dong; Dong; Li, 2025; Mao *et al.*, 2021)(Dong; Dong; Li, 2025; Lin, Nan-Nan *et al.*, 2016; Zhang, Qian *et al.*, 2024). A atuação de células endoteliais e vasos sanguíneos fornece nutrientes e oxigênio além de criar vias para metástase (Kim, Jue Young; Moon; Kim, 2022). Como componente não-celular fundamental, a matriz extracelular (MEC) influencia o comportamento tumoral através de sua rigidez e composição proteica (Khan, Kahkashan *et al.*, 2024; Sheth *et al.*, 2024), com suas proteínas estruturais servindo como potenciais marcadores de progressão tumoral (Miyamoto *et al.*, 2023).

Figura 1 - Representação esquemática do microambiente tumoral no carcinoma oral de células escamosas (COE). A ilustração destaca os principais componentes celulares, incluindo as células tumorais, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células imunes, células-tronco tumorais e células endoteliais formando vasos sanguíneos. Os componentes não-celulares também são representados, como a matriz extracelular (MEC) rica em proteínas estruturais, fatores de crescimento e citocinas. As interações entre esses elementos formam a complexa rede de comunicação que influencia o desenvolvimento e a progressão tumoral.



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

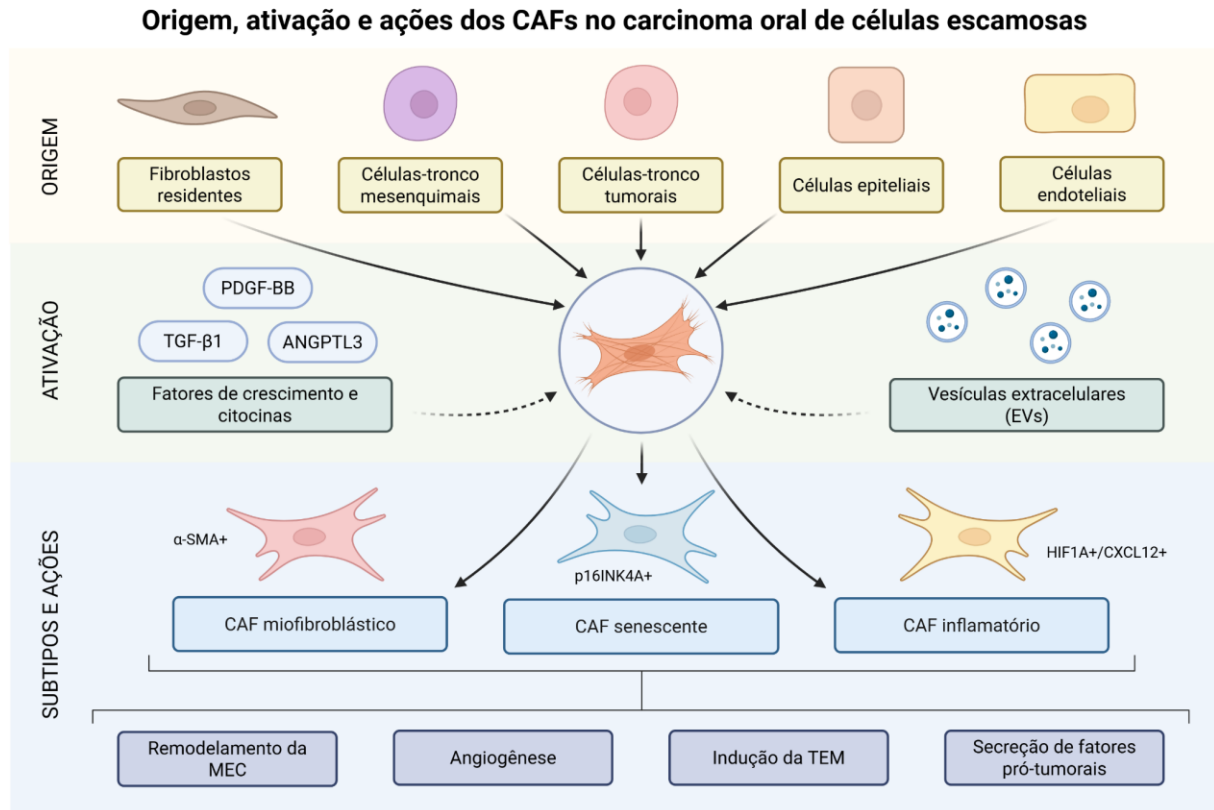
No COE, o microambiente tumoral desempenha um papel importante através de interações complexas que influenciam a ocorrência e o desenvolvimento do tumor através de vários mecanismos, incluindo o fornecimento de fatores de crescimento e citocinas, modificação da MEC, regulação da resposta imune e promoção da angiogênese (Cirillo *et al.*, 2017; Lin, Jingwen *et al.*, 2011)(Lin *et al.* 2011; Cirillo *et al.*, 2017; Wang, Zhang, *et al.*, 2019). Estas interações envolvem redes elaboradas de comunicação que ocorrem de diversas formas, seja através de sinalização parácrina mútua que promove a proliferação tumoral, via metaloproteinases de matriz que degradam a membrana basal, e/ou através de comunicação molecular envolvendo proteínas secretadas (Baghban *et al.*, 2020; Bonner; Willms, 2021; Kanemaru *et al.*, 2017).

1.3 Fibroblastos associados ao câncer

Os CAFs são os principais componentes do estroma tumoral e atuam na promoção do crescimento tumoral. Sua origem pode ser diversa, incluindo fibroblastos residentes (Ding *et al.*, 2018), células-tronco mesenquimais da medula óssea, células epiteliais (Dourado *et al.*, 2019), células endoteliais e células-tronco tumorais (Zhang, Qian *et al.*, 2024). O "recrutamento" e ativação dos CAFs ocorre em resposta a fatores de crescimento e citocinas no microambiente tumoral, como PDGF-BB, ANGPTL3 e TGF- β 1 (Kim, Jue Young; Moon; Kim, 2022; Sekiguchi *et al.*, 2023; Xu, Jianguo *et al.*, 2024), sendo ampliado por mecanismos de retroalimentação via IL-1 β /NF- κ B (Wei *et al.*, 2019). A ativação também responde a estresses ambientais, incluindo a exposição à quimioterapia, que aumenta a expressão de α -SMA (Schulze *et al.*, 2019). A comunicação por vesículas extracelulares (EVs) carregadas com proteínas oncogênicas mantém esse estado ativado (Lv, Tianzhu *et al.*, 2024; Mao *et al.*, 2021; Mayer *et al.*, 2023; Wang, Wei-Zhou *et al.*, 2023).

De um modo geral, CAFs são caracterizados principalmente pela expressão de α -SMA e FAP (Dourado *et al.*, 2019; Liu, Xue *et al.*, 2023). Estes marcadores têm importante valor prognóstico, com α -SMA correlacionando-se à invasividade tumoral (Ba *et al.*, 2019; Wang, Yujia *et al.*, 2019) e FAP à transição epitélio-mesenquimal (TEM), resistência terapêutica e pior prognóstico (Bienkowska; Hanley; Thomas, 2021). No entanto, os subtipos de CAFs apresentam especificidades, como: CAFs miofibroblásticos, que expressam altos níveis de α -SMA e podem ser especificamente associados a tumores primários ou metástases (Zhang, Qian *et al.*, 2024; Zhang, Qiuhua *et al.*, 2024); CAFs senescentes, que superexpressam p16INK4A e regulam a autofagia em tumores geneticamente instáveis (Tan, May Leng *et al.*, 2021); CAFs inflamatórios, que expressam *HIF1A* e secretam CXCL12 em regiões hipermetabólicas (Liu, Pan *et al.*, 2024); dentre outros (**Figura 2**).

Figura 2 - Representação esquemática dos fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no carcinoma oral de células escamosas (COE). A ilustração mostra as múltiplas origens dos CAFs, incluindo fibroblastos residentes, células-tronco mesenquimais da medula óssea, células-tronco tumorais, células epiteliais após transição epitélio-mesenquimal (TEM) e células endoteliais. São destacados os principais mecanismos de ativação, como os fatores de crescimento PDGF-BB, TGF- β 1, ANGPTL3, citocinas e vesículas extracelulares (EVs). Três diferentes subtipos de CAFs são ilustrados: os CAFs miofibroblásticos (α -SMA+), CAFs senescentes (p16INK4A+) e CAFs inflamatórios (HIF1A+/CXCL12+), bem como seus efeitos no microambiente tumoral, como remodelação da matriz extracelular (MEC), promoção da angiogênese, indução da TEM e secreção de fatores pró-tumorais.



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

A heterogeneidade dos subtipos de CAFs reforçam o amplo espectro de ação dos mesmos. Além de auxiliarem na remodelação do microambiente tumoral, essas células contribuem para a resistência terapêutica (Berndt *et al.*, 2014) através da redução da secreção de fatores parácrinos (Liao *et al.*, 2018) e da liberação de EVs (Kang *et al.*, 2024). De fato, análises proteômicas e estudos de espectrometria de massa revelaram que os CAFs são as principais células contribuintes para o secretoma tumoral (Lau *et al.*, 2024; Principe *et al.*, 2018), reforçando seu papel central na modulação do microambiente. Conseqüentemente, a alta densidade de CAFs no microambiente tumoral está associada a pior prognóstico e redução da sobrevida geral dos pacientes (Ko *et al.*, 2020; Wang, Yujia *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2015).

Um dos principais papéis dos CAFs no microambiente tumoral é a promoção da invasão. Essas células são promotoras da TEM, um processo no qual células epiteliais perdem suas características definidoras e adquirem um fenótipo mesenquimal altamente migratório e

invasivo. Essa transição é induzida por fatores secretados pelos CAFs, como SDF1, que ativa a cascata TGF- β 1/Smad (Gao, Pan *et al.*, 2018; Li, Yao-yin *et al.*, 2018; Yang, Wenbin *et al.*, 2022) e o eixo TGF- β /SOX9 (Haga *et al.*, 2021). Além disso, os CAFs são os principais produtores de metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 e TIMP-3, que degradam os componentes da MEC, favorecendo a disseminação tumoral (Fullár *et al.*, 2012). A produção elevada de HAS2 por CAFs também contribui para a progressão tumoral, estando associada a estágios avançados da doença e à metástase linfonodal (Lin, Nan-Nan *et al.*, 2016). De maneira semelhante, a expressão de *LOX* por CAFs aumenta a rigidez da MEC, criando um ambiente mecanicamente favorável à invasão celular (Zhang, Jia-Yi *et al.*, 2021).

O valor prognóstico dos CAFs no COE é evidenciado tanto pela expressão de marcadores moleculares específicos quanto pela sua densidade no estroma tumoral. Em termos moleculares, além dos marcadores clássicos α -SMA e FAP, os CAFs expressam proteínas associadas a desfechos clínicos desfavoráveis, como níveis elevados de VIM e reduzidos de Cav-1 (Kaya *et al.*, 2021; Principe *et al.*, 2018; Xu, Yuming *et al.*, 2021). A superexpressão de *NOTCH3* e *EREG* correlaciona-se com maior tamanho tumoral e metástase linfonodal (Kayamori *et al.*, 2016), enquanto a regulação positiva de *FERMT2* e a presença de CAFs podoplanina+/ α -SMA+ indicam menor sobrevida e maior disseminação linfonodal, respectivamente (Inoue *et al.*, 2014; Li, Yao-yin *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2024; Tadokoro *et al.*, 2023). Quanto à densidade estromal, estudos demonstram correlação direta com critérios de estadiamento TNM (Bello *et al.*, 2011; Idoska *et al.*, 2023; Sun, Li-Ping *et al.*, 2019), sendo que a presença aumentada de células CD86+/ α -SMA+ e uma elevada razão CAFs/estroma associam-se consistentemente a maior recorrência tumoral e pior prognóstico (Lin, Ching Shwun *et al.*, 2013; Lin, Nan-Nan *et al.*, 2016; Qiu; Jiang; Shang, 2023; Vered *et al.*, 2019).

Em síntese, os CAFs emergem como elementos-chave da modulação pro-tumoral do microambiente. Após sua ativação, orquestram uma complexa cascata de eventos a favor do tumor, desde o estabelecimento de suporte metabólico (Xia *et al.*, 2024), até o remodelamento da MEC para facilitar a invasão e progressão tumoral (Piwocka *et al.*, 2024; Wright *et al.*, 2023). Dessa forma, promovem adaptações que garantem a sobrevivência do tumor, incluindo evasão imunológica e resistência à quimioterapia (Piwocka *et al.*, 2024).

1.4 Estruturas *cell-in-cell*

De forma semelhante aos CAFs, as estruturas *cell-in-cell* ou célula-em-célula (CIC) também estão associadas à sobrevivência tumoral. Inicialmente descobertas há mais de um século pelo seu padrão morfológico, e hoje facilmente identificadas através de microscopia avançada (Gottwald *et al.*, 2020; Kroemer; Perfettini, 2014; Schenker *et al.*, 2017), estas estruturas ocorrem quando uma célula hospedeira maior encapsula uma ou mais células vivas dentro de um vacúolo (Siquara da Rocha *et al.*, 2022). Sua morfologia característica consiste em uma célula com seu núcleo deslocado para a periferia e comprimido em formato semilunar, devido à presença de uma outra célula internalizada (Almangush *et al.*, 2020; Florey; Kim; Overholtzer, 2015; Jain, M, 2015; Wang, Xinlong *et al.*, 2019), resultando em uma aparência que lembra um "olho de pássaro" ou "anel de sinete". São identificadas por coloração H&E e marcadores moleculares como E-caderina e N-caderina (Ruan *et al.*, 2019). Embora sejam frequentemente observadas em malignidades agressivas como o COE, a ausência de uma classificação padronizada dificulta seu estudo, uma vez que apresentam múltiplos mecanismos de formação e diversos perfis de expressão gênica (Siquara da Rocha *et al.*, 2022).

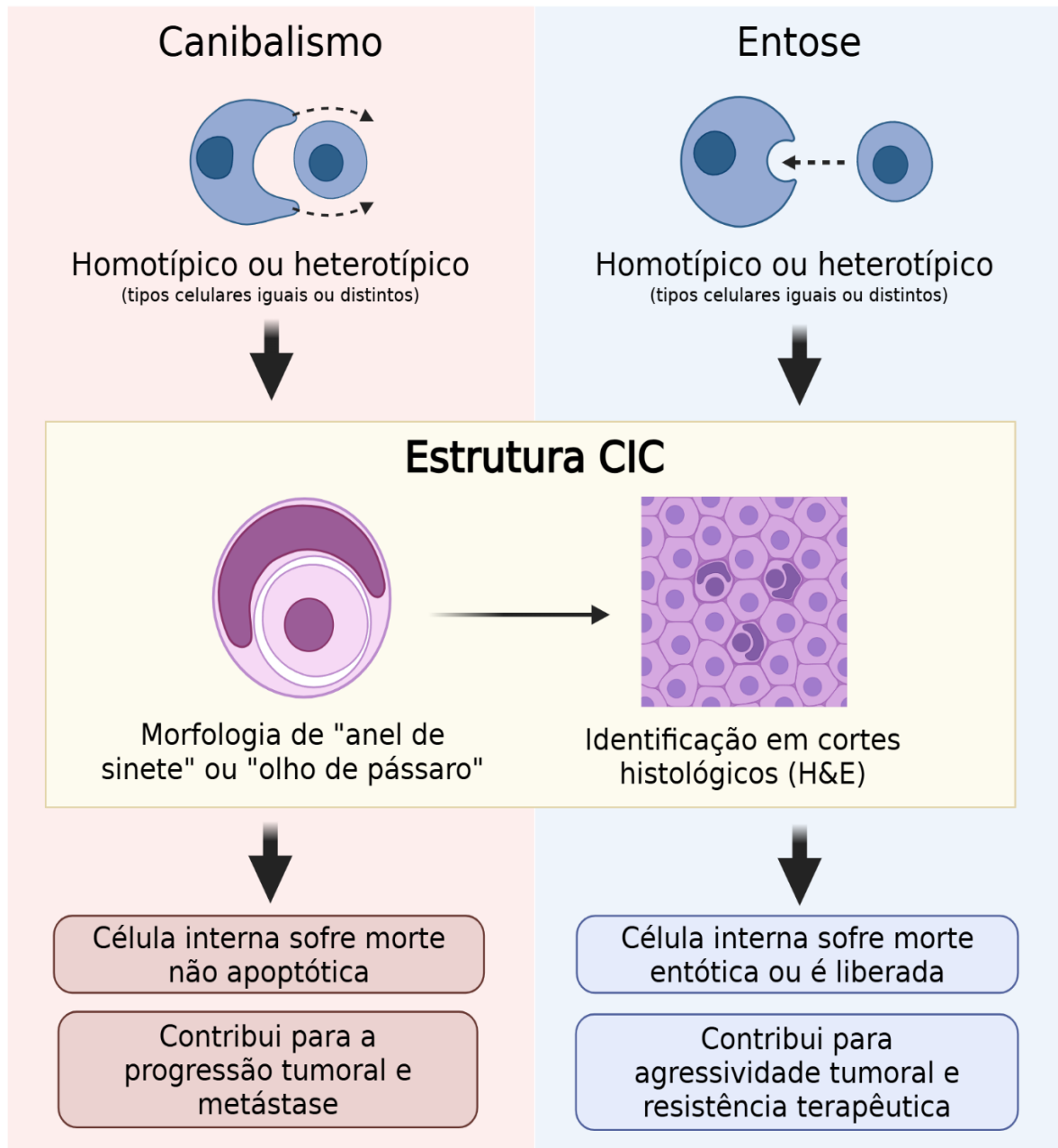
As estruturas CIC surgem como mecanismos críticos de competição celular, frequentemente descritos como exemplos do princípio da "sobrevivência do mais apto" em nível celular (Kroemer; Perfettini, 2014; Mousavi; Razi, 2021; Sun, Qiang *et al.*, 2014; Sun, Qiang; Huang; Overholtzer, 2015). No processo de englobamento celular, as células malignas promovem expansão clonal, aumentar agressividade e facilitar a colonização tecidual (Almangush *et al.*, 2020; Huang, Hongyan *et al.*, 2015). Em cenários de estresse, a formação de CICs confere vantagem adaptativa ao eliminar competidores menos aptos, promover instabilidade genética (Wang, Ruizhi *et al.*, 2023), facilitar resistência terapêutica (Tonnessen-Murray; Jackson, 2020) e reforçar a capacidade de invasão (Huang, Hongyan *et al.*, 2015; Overholtzer *et al.*, 2007).

As estruturas CIC no COE têm sido intimamente associadas à presença de CAFs, como demonstrado em estudos recentes utilizando modelos de cultura celular 3D. Essas investigações revelam que esferoides heterotípicos contendo CAFs mostram maior prevalência de estruturas CIC, sugerindo que o componente estromal influencia ativamente esse comportamento celular (Siquara da Rocha *et al.*, 2023). Essa observação alinha-se com o entendimento de que tanto as CAFs quanto as estruturas CIC contribuem para a progressão tumoral através de múltiplos mecanismos, incluindo a promoção da invasão e metástase.

A formação de estruturas CIC envolve uma multiplicidade de mecanismos moleculares e celulares, refletindo a complexidade desses processos. Embora marcadores específicos como E-caderina, Cav-1 e IL-8 estejam envolvidos em interações homotípicas, comunicação tumor-estroma e adesão intercelular, respectivamente (Fu *et al.*, 2017; Huang, Hongyan *et al.*, 2015; Ruan *et al.*, 2018; Saquel *et al.*, 2024), a heterogeneidade dessas estruturas tem levado a diferentes sistemas de classificação na literatura (Siquara da Rocha *et al.*, 2022). Alguns autores as identificam coletivamente como canibalismo celular tumoral, independente de suas assinaturas moleculares específicas, enquanto outros preferem nomenclaturas baseadas nos tipos celulares envolvidos, como no caso do engolfamento de neutrófilos ou leucócitos (Huang, Hongyan *et al.*, 2015; Sarode, Sachin C.; Sarode, 2014). Dentre os principais mecanismos por trás da formação dessas estruturas, destacam-se o canibalismo e a entose, cada um representando processos distintos com características e implicações únicas para a biologia do câncer (**Figura 3**).

Figura 3 - Mecanismos de formação de estruturas *cell-in-cell* (CIC). No canibalismo celular (superior), uma célula hospedeira engloba passivamente outra célula, podendo ocorrer entre células do mesmo tipo (homotípico) ou diferentes (heterotípico). A célula internalizada geralmente sofre morte não-apoptótica, contribuindo para a sobrevivência tumoral em condições de estresse. Na entose (inferior), que também pode ser homotípica ou heterotípica, uma célula invade ativamente outra célula através de mecanismos dependentes de E-caderina e da via Rho-ROCK. A célula internalizada pode ser degradada por enzimas lisossomais ou, ocasionalmente, liberada. Ambas as estruturas têm apresentação morfológica semelhante, como “anel de sinete” ou “olho de pássaro”, podendo ser identificadas em cortes histológicos corados em H&E. Ambos os processos influenciam a progressão tumoral através da seleção clonal, aumento da agressividade e resistência terapêutica.

Estruturas *cell-in-cell* (CIC)



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

O canibalismo celular é o primeiro mecanismo por trás da formação de estruturas CIC, no qual uma célula é passivamente englobada por outra, diferenciando-se de processos como a

fagocitose (Sarode, Gargi S.; Sarode; Karmarkar, 2012; Sharma *et al.*, 2015). Este processo pode ser classificado em canibalismo homotípico, envolvendo células do mesmo tipo, e canibalismo heterotípico, quando envolve células de tipos diferentes (Jain, M, 2015). O canibalismo envolve a participação de proteases lisossomais, atividade de catepsina B, formação de caveolas e manutenção da integridade do citoesqueleto de ezrina (Sarode, Gargi S.; Sarode; Karmarkar, 2012). As células canibalísticas em COE costumam expressar marcadores como lisozima e CD68, associados ao comportamento agressivo do tumor (Sarode, Sachin C.; Sarode, 2013). Após a internalização, a célula englobada geralmente sofre morte não-apoptótica, favorecendo a sobrevivência do tumor em microambientes hostis, caracterizados por hipóxia, acidose e escassez de nutrientes (Siddiqui *et al.*, 2019). Embora o canibalismo possa, teoricamente, tanto promover quanto suprimir o crescimento tumoral, no contexto do COE ele está associado à progressão tumoral, alto grau histológico e maior potencial metastático (Jain, M, 2015; Jain, Megha *et al.*, 2017; Siddiqui *et al.*, 2019). A forma denominada "canibalismo complexo" foi descrita especificamente no COE, no qual mais de uma célula encontra-se englobada em outra, estando associada a uma maior capacidade metastática, atuando como marcador histopatológico relevante (Keerthika *et al.*, 2024; Sarode, Gargi S.; Sarode; Karmarkar, 2012).

A entose é um processo particular de formação de estruturas CIC no qual uma célula invade ativamente outra célula, desencadeando uma forma de morte celular não-apoptótica denominada morte entótica (Florey; Kim; Overholtzer, 2015; Kroemer; Perfettini, 2014; Overholtzer *et al.*, 2007). Apesar de conceituada por alguns como exclusivamente homotípica (Kianfar *et al.*, 2022), há relatos de entose entre células fenotípicamente distintas (Armistead *et al.*, 2020; Yang, Xinyu *et al.*, 2024). A falta de consenso na classificação desse fenômeno é frequente na literatura (Siquara da Rocha *et al.*, 2022). Os mecanismos moleculares da entose dependem da adesão mediada por E-caderina e da contração actomiosina regulada pela via de sinalização Rho-ROCK (Overholtzer *et al.*, 2007; Sun, Qiang; Huang; Overholtzer, 2015). A célula internalizada é usualmente degradada por enzimas lisossomais, embora em alguns casos possa ser liberada intacta (Dziuba *et al.*, 2023). No câncer, a entose apresenta um papel dual: pode favorecer a evolução tumoral ao eliminar células competidoras (Fais; Overholtzer, 2018; Sun, Qiang *et al.*, 2014), mas também pode atuar como mecanismo supressor ao promover a morte de células potencialmente malignas (Florey; Kim; Overholtzer, 2015). No COE, a presença de entose e fenômenos relacionados tem sido associada a maior agressividade e resistência terapêutica, ressaltando sua relevância na progressão tumoral (Siquara da Rocha *et al.*, 2022).

1.5 Modelos tridimensionais

O estudo do COE *in vitro* é desafiador devido à sua complexidade biológica e morfológica (Baghban *et al.*, 2020; Bhat *et al.*, 2021; Huang, Yisheng *et al.*, 2021). Modelos bidimensionais (2D) de cultivo celular, amplamente utilizados em pesquisas oncológicas, apresentam limitações críticas na reprodução da complexidade dos tumores sólidos. O cultivo em monocamada resulta em uma distribuição homogênea de células, com exposição uniforme a nutrientes e oxigênio, o que não reflete a heterogeneidade observada *in vivo* (Salinas-Vera *et al.*, 2022; Suarez-Martinez *et al.*, 2022). A ausência de gradientes de concentração impede a formação de zonas de hipóxia, áreas proliferativas e núcleos necróticos, características dos tumores sólidos que influenciam diretamente seu comportamento biológico (Doctor *et al.*, 2020; Ham *et al.*, 2016; Ostapowicz *et al.*, 2024). Além disso, a interação entre células tumorais e a MEC é pouco representada em culturas 2D, comprometendo a avaliação de processos como adesão, migração e remodelação tecidual (Infanger; Lynch; Fischbach, 2013; Marques, Joana Rita Oliveira Faria *et al.*, 2023). Essas limitações comprometem a capacidade dos modelos 2D de reproduzir a dinâmica real do microambiente tumoral, impactando a validade translacional dos achados laboratoriais.

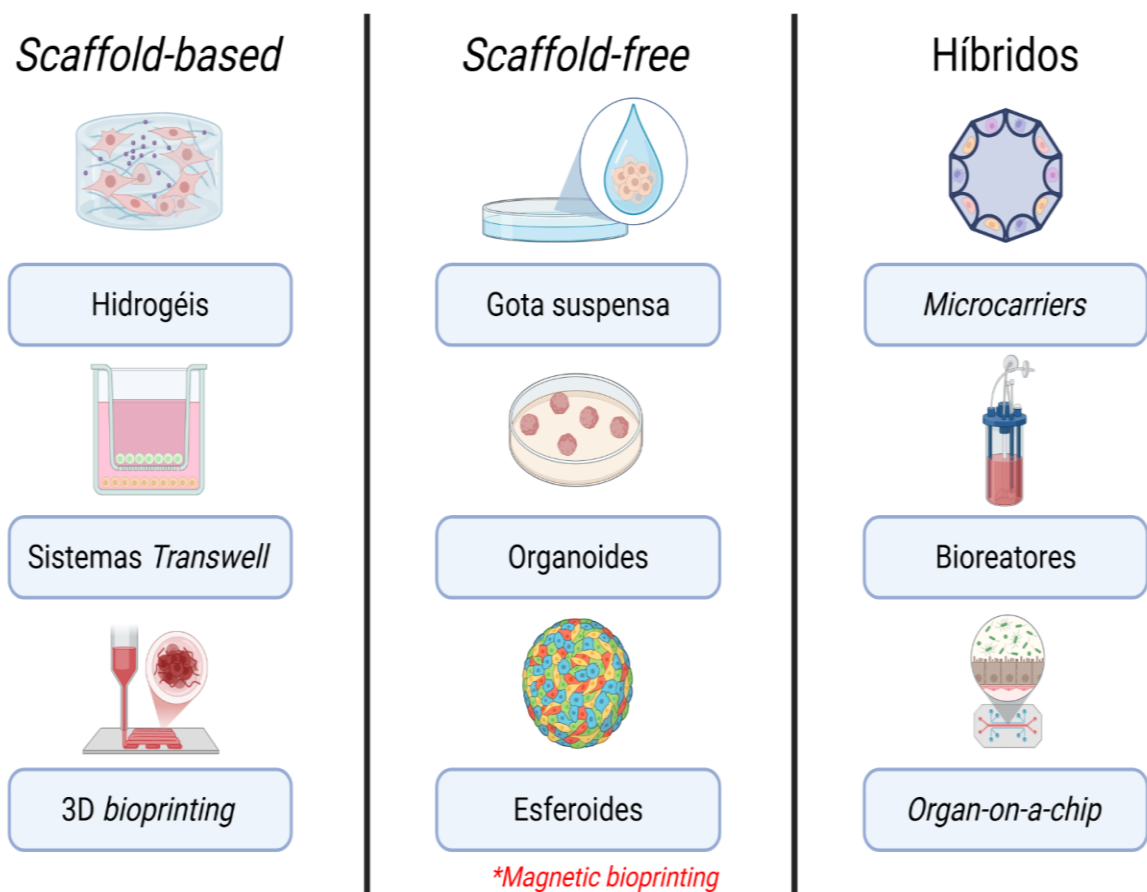
Um modelo experimental para câncer, portanto, deve considerar várias populações celulares e suas interações, incluindo células inflamatórias, células hematopoiéticas, células de defesa e fibroblastos (Chang *et al.*, 2014; Flores Molina *et al.*, 2020), bem como componentes da MEC que influenciam a invasão tumoral (Conklin; Keely, 2012; Correa de Sampaio *et al.*, 2012; Risom *et al.*, 2022). Embora os modelos *in vivo* usando camundongos representem um avanço em relação à cultura celular 2D, eles também têm limitações em representar a doença humana. Estes modelos estão sujeitos tanto a influências externas das condições laboratoriais (Van Norman, 2019) quanto a questões próprias do seu metabolismo e resposta imune (Chan, Yi-Hao; Lum; Ng, 2015; Enriquez *et al.*, 2020). Além disso, há preocupações éticas significativas em relação à pesquisa com animais (Andersen; Winter, 2019).

Os modelos celulares 3D estão revolucionando a pesquisa em câncer ao fornecer plataformas fisiologicamente relevantes para estudar interações celulares complexas e mecanismos moleculares (Figura 4). Esses sistemas podem ser classificados em três categorias principais: modelos *scaffold-free*, onde as células se auto-organizam sem suporte estrutural externo, como o modelo de esferoides (Białkowska *et al.*, 2020; Miyamoto *et al.*, 2023), organoides (Bajpai *et al.*, 2022; El Harane *et al.*, 2023) e gota suspensa (Pandey *et al.*, 2021; Shri *et al.*, 2017); modelos *scaffold-based*, que utilizam suportes físicos ou matrizes

tridimensionais para guiar o crescimento celular, como os hidrogéis (Abuwatfa; Pitt; Hussein, 2024; Ahmed, Monieb A.M.; Nagelkerke, 2021; Khan, Anowar H. *et al.*, 2022), os sistemas *Transwell* (Abuwatfa; Pitt; Hussein, 2024; Nelson; Bissell, 2006) e o *bioprinting* 3D (Nelson; Bissell, 2006; Salinas-Vera *et al.*, 2022); e os sistemas híbridos, que combinam elementos de ambos os tipos para maior complexidade fisiológica, como os *microcarriers* (De Soure *et al.*, 2016; Handral; Wyrobnik; Lam, 2023), os biorreatores (Hsieh *et al.*, 2015) e o *organ-on-a-chip* (Sun, Wujin *et al.*, 2019).

Figura 4 - Representação esquemática dos principais modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular utilizados na pesquisa em câncer. Os métodos são classificados em *scaffold-based* (com suporte de matriz), *scaffold-free* (sem suporte de matriz) e híbridos, ilustrando exemplos como esferoides, organoides, *microcarriers*, bioreatores e sistemas *organ-on-a-chip*. Entre os modelos *scaffold-free*, destaca-se também a formação de esferoides por *bioprinting* magnético. Esses modelos oferecem microambientes mais fisiológicos para o estudo do comportamento tumoral.

Modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

Nesse contexto, a cultura de esferoides destaca-se como um método confiável para estudar vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama (Calar *et al.*, 2020; Vidavsky *et al.*, 2018), câncer renal (Filipiak-Duliban *et al.*, 2022), neuroblastoma (Asthana *et al.*, 2020) e COE (Miyamoto *et al.*, 2023). Os esferoides permitem a simulação de características-chave dos tumores sólidos, representando gradientes de nutrientes, tensão de oxigênio e zonas celulares distintas (camada externa proliferativa, região quiescente e centro hipóxico) (Dini *et al.*, 2016; Marques, Inês Alexandra *et al.*, 2022). Além disso, esses sistemas tridimensionais permitem análises mais fisiológicas das interações tumor-estroma, dos mecanismos de invasão mediados por fibroblastos e das propriedades físicas da MEC (Kayamori *et al.*, 2016; Li, Huan *et al.*, 2015; Zhang, Jia-Yi *et al.*, 2021), bem como o estudo da dormência tumoral, migração orientada por CAFs e resistência terapêutica (Bartosh *et al.*, 2016; Bozkurt *et al.*, 2021; Haga *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2024).

No câncer oral, esferoides possibilitaram a avaliação de terapias como cisplatina e cetuximabe em modelos com adesão e arquitetura mais próximas das observadas *in vivo* (Ono *et al.*, 2022). Modelos derivados de pacientes têm revelado respostas heterogêneas correlacionadas ao perfil clínico e permitido o estudo de células-tronco tumorais (Ikeda-Motonakano *et al.*, 2023; Mehta, Geeta *et al.*, 2012). O uso de esferoides em dispositivos microfluídicos simula gradientes fisiológicos e reforça seu potencial para a medicina personalizada (Ham *et al.*, 2016; Mehta, Viraj *et al.*, 2024). Além disso, esses modelos têm contribuído para o estudo da heterogeneidade metabólica associada à agressividade e resistência no COE (Miao *et al.*, 2024).

Dentre os métodos de obtenção de esferoides tumorais, o *bioprinting* ou bioimpressão magnética se destaca por sua reprodutibilidade e escalabilidade, permitindo a formação rápida e consistente de estruturas multicelulares complexas (Caleffi *et al.*, 2021; Datta *et al.*, 2018). Essa tecnologia utiliza nanopartículas biocompatíveis que interagem eletrostaticamente com as membranas celulares e, após cerca de oito dias, se desprendem parcialmente, permanecendo retidas na MEC sem comprometer as funções celulares (Koudan *et al.*, 2021; Matschegewski *et al.*, 2019). Baseando-se nesta metodologia, nossa equipe (de Araújo *et al.*, 2024)(de Araujo et al., 2024) (Apêndice) otimizou o protocolo de *bioprinting* utilizando o sistema NanoShuttle-PL™ (Greiner Bio-One), reduzindo o tempo de incubação e concentração de nanopartículas utilizadas. Além disso, nosso grupo otimizou o modelo para coculturas heterotípicas de células tumorais e CAFs, viabilizando o estudo aprofundado de interações celulares complexas, incluindo a formação de estruturas CIC (de Araújo *et al.*, 2024; Siquara da Rocha *et al.*, 2023) (Apêndice). Esses modelos representam um avanço relevante para a

pesquisa translacional em câncer, oferecendo plataformas fisiologicamente relevantes para o estudo da progressão tumoral e para a triagem de terapias personalizadas.

1.6 Transcriptômica espacial

As plataformas de transcriptômica espacial têm se consolidado como ferramentas cada vez mais populares na pesquisa oncológica, oferecendo vantagens significativas em relação às abordagens convencionais de sequenciamento de RNA. Esse modelo preserva a arquitetura tecidual, permitindo mapear a expressão gênica com a localização precisa das células dentro do microambiente tumoral (Arora *et al.*, 2023; Cilento; Sweeney; Butler, 2024). Essa capacidade é fundamental para a compreensão da organização tecidual que influencia a sobrevivência tumoral, a progressão da doença e a resposta terapêutica (Arora *et al.*, 2023; Iwasa *et al.*, 2023), permitindo caracterizar a heterogeneidade espacial, identificar assinaturas gênicas localizadas e integrar dados com outras plataformas ômicas, viabilizando abordagens de medicina personalizada (Haller *et al.*, 2024; Wang, Liping *et al.*, 2023).

No contexto do COE, a aplicação da transcriptômica espacial tem aprofundado a caracterização do tumor, evidenciando diferenças marcantes entre o núcleo tumoral e a borda de invasão, com esta última associada a piores desfechos clínicos (Arora *et al.*, 2023). Estudos também demonstraram que a proximidade entre tumor e nervos periféricos, revelada pela análise espacial da expressão gênica, pode ser um preditor de prognóstico negativo mesmo em casos sem invasão neural clássica (Deleanu; Ceafalan; Dricu, 2021). Adicionalmente, métodos de análise de expressão gênica espacial têm sido usados para investigar mecanismos de resistência imunoterapêutica (Iwasa *et al.*, 2023), e para explorar a distribuição espacial de RNA microbiano nos tecidos de COE, abrindo novas perspectivas sobre a interação entre o microbioma e o câncer (Park *et al.*, 2024). A aplicação da análise espacial do RNA no estudo do COE tem proporcionado avanços relevantes na caracterização das interações celulares no microambiente tumoral, revelando, por exemplo, o papel dos CAFs inflamatórios na indução de imunossupressão e dos CAFs miofibroblásticos na promoção da metastatização linfonodal (Haller *et al.*, 2024; Liu, Zheqi *et al.*, 2024; Schmitd *et al.*, 2022).

No entanto, apesar do crescimento das aplicações das estratégias de transcriptômica espacial no COE, a integração dessa tecnologia com modelos tridimensionais, como esferoides tumorais, permanece pouco explorada na literatura. Esta lacuna limita a compreensão das interações tumor-estroma e a heterogeneidade funcional dos tumores (Cordani *et al.*, 2024; Ono *et al.*, 2022). Assim, a combinação de análises de transcriptômica espacial com esferoides

tumorais representa uma estratégia inovadora e necessária para expandir o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os CAFs modulam a expressão gênica associada à adesão celular, remodelação da MEC, plasticidade tumoral e formação de estruturas CIC no COE. Esta abordagem integrativa e translacional tem o potencial de elucidar novos alvos terapêuticos e biomarcadores, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate à progressão tumoral.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no entendimento do papel CAFs na progressão tumoral, as interações entre esses componentes e sua contribuição para a heterogeneidade molecular ainda são pouco exploradas no COE. Além disso, as limitações dos modelos bidimensionais convencionais dificultam a reprodução da complexidade espacial e funcional do microambiente tumoral, restringindo a investigação de processos biológicos como remodelação tecidual, adesão celular, plasticidade tumoral e a formação de estruturas CIC.

Este estudo propõe integrar análises *in silico* — para identificar transcritos diferencialmente expressos e variáveis associados a esses processos — com abordagens experimentais em modelos tridimensionais de esferoides contendo CAFs e em tecido tumoral humano. A aplicação do transcriptoma espacial nesses contextos permitirá mapear a expressão gênica em sua organização espacial, possibilitando a caracterização de perfis moleculares distintos e refletindo a heterogeneidade das interações tumor–microambiente. Esta abordagem visa ampliar a compreensão sobre a biologia tumoral do COE e fornecer subsídios para futuras investigações de biomarcadores com potencial translacional.

3 HIPÓTESE

A expressão de transcritos tumorais mais variados em amostras de tumor envolvidos na remodelação tecidual, adesão celular e plasticidade tumoral — incluindo estruturas *cell-in-cell* (CIC) — definem perfis moleculares distintos em esferoides contendo fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e em tecidos humanos de carcinoma oral de células escamosas (COE).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os transcritos tumorais mais variados associados a processos biológicos relevantes — remodelação tecidual, adesão celular, plasticidade tumoral (incluindo a formação de estruturas *cell-in-cell*) — bem como a influência dos fibroblastos associados ao câncer e microambiente tumoral, no transcriptoma espacial de esferoides e tecido de carcinoma oral de células escamosas, respectivamente.

4.2 Objetivos específicos

- Definir, *in silico*, os transcritos diferencialmente expressos e mais variáveis em COE, avaliando o seu papel em processos biológicos tumorais.
- Estudar, *in silico*, o perfil transcriptômico de linhagens celulares de COE.
- Analisar, em esferoides e caso de COE, os transcritos tumorais mais variáveis identificados na etapa *in silico*.
- Estudar a influência de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) na expressão de transcritos tumorais relacionados à adesão celular, remodelação tecidual e plasticidade tumoral.
- Comparar o perfil de expressão de transcritos relacionados a processos de atividade de CAFs, invasão, metástase, remodelamento da matriz extracelular (MEC) e transição epitélio-mesenquimal (TEM) em esferoides e caso de COE.
- Analisar os transcritos dos grupos funcionais identificados na estratégia *in silico* em COE com ênfase nas estruturas CIC.

5 MATERIAL E MÉTODOS

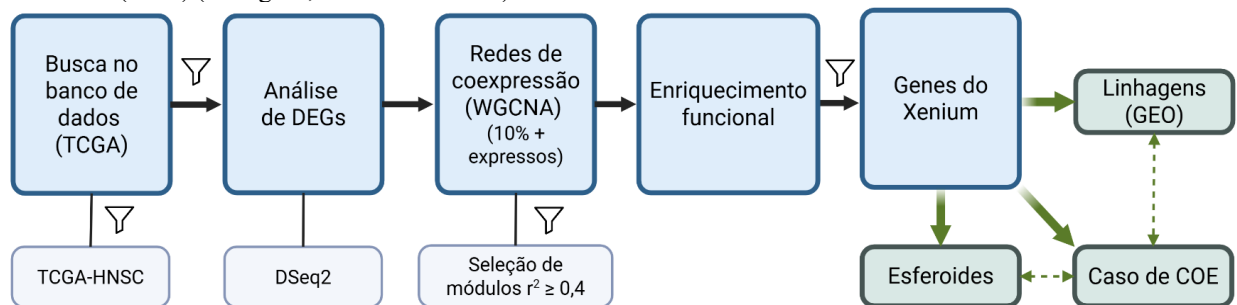
5.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo experimental, analítico e comparativo, na área de cancerologia.

5.2 *In silico*

Esquemáticamente, a Figura 5 apresenta um fluxograma representando a metodologia aplicada para a análise *in silico*. Todas as análises foram realizadas no ambiente R.

Figura 5 - Representação esquemática das etapas *in silico*. A partir dos dados de transcriptoma disponíveis no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), foram feitas filtrações acompanhadas da construção de redes de coexpressão e enriquecimento funcional para fornecer a base para as análises das amostras de carcinoma oral de células escamosas (COE) (linhagens, esferoides e caso).



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

5.2.1 Identificação dos DEGs em COE

Com o objetivo de identificar os principais transcritos associados à progressão do COE, os dados do transcriptoma (RNA-seq) foram obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Utilizou-se amostras tumorais e não-tumorais do banco de dados do TCGA voltados para carcinoma de cabeça e pescoço (TCGA-HNSC), disponibilizado pelo TCGA (Firehouse Legacy). Foram selecionados apenas os identificadores (IDs) dos pacientes cujos tumores estavam localizados na "base da língua", "assoalho da boca", "cavidade oral" ou "língua". Essa etapa teve como finalidade inicial identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) entre amostras tumorais e não tumorais de cavidade oral. Para assegurar a comparabilidade entre as amostras, os dados foram normalizados com o pacote edgeR (versão 4.4.2), minimizando vieses técnicos. Genes de baixa expressão foram filtrados, e amostras com valores extremos foram inspecionadas para preservar a integridade dos dados. Os dados de RNA-seq foram obtidos

usando o TCGAbiolinks (Colaprico *et al.*, 2016). Os identificadores gênicos de cada amostra foram refinados por meio do mapeamento dos IDs Ensembl para símbolos gênicos, excluindo pseudogenes e entradas não anotadas. Além disso, sondas redundantes foram colapsadas, mantendo-se aquelas com maior variabilidade de expressão. A identificação dos DEGs foi conduzida por meio do método DESeq2 (versão 3.21) (<https://bioconductor.org/packages/DESeq2>) e edgeR (versão 4.4.2), considerando $\text{LogFC} > 2.0$ e $p < 0.05$.

5.2.2 Análise de coexpressão gênica

Na etapa subsequente, foi realizada a ampliação da seleção de genes para além dos DEGs, identificando os genes mais variáveis entre as amostras tumorais. Essa abordagem permitiu abarcar também genes com potencial relevância biológica que não necessariamente apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Para isso, os dados foram novamente processados utilizando os pacotes de análise de redes ponderadas de coexpressão gênica (WGCNA, versão 1.73). Foram selecionados os 10% genes com maior variância do perfil expressão entre os casos tumorais. Essa filtragem resultou na geração de um conjunto de genes para a construção da rede de coexpressão gênica. Essa abordagem possibilitou a identificação de módulos de genes coexpressos e sua relação com as amostras tumorais.

A matriz de expressão gênica foi convertida em uma matriz de adjacência utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. O parâmetro de limiarização suave (*soft-thresholding power*) foi determinado usando a função `PickSoftThreshold` para garantir uma rede livre de escala. Em seguida, a matriz de sobreposição topológica foi calculada de acordo com o valor de limiarização suave correspondente ($\beta=3$). O agrupamento hierárquico foi realizado para identificar os módulos de genes densamente interconectados. A correlação entre o Eigengene do módulo (ME), que representa o primeiro componente principal do módulo, e as características clínicas (tumoral e não-tumoral) foi calculada para identificar módulos de genes associados aos fenótipos clínicos. Os valores de associação dos genes individuais com os módulos (MM) foram usados para classificar o gene quanto sua relevância no módulo. Os valores de MM foram definidos como a correlação entre os perfis de expressão gênica individuais e o ME de um determinado módulo.

Para as análises posteriores de enriquecimento funcional e expressão gênica nos modelos *in vitro* e no caso, foram selecionados apenas os módulos que apresentaram

correlações moderadas a fortes, definidas por um limiar de correlação de $r \geq 0,4$. De acordo com a literatura (Langfelder; Horvath, 2008), correlações moderadas são geralmente classificadas entre 0,4 e 0,69, enquanto correlações fortes são aquelas com $r \geq 0,7$. O objetivo dessa seleção foi garantir maior robustez na identificação de padrões biológicos consistentes.

5.2.3 Enriquecimento funcional dos genes por módulo

Com o objetivo de compreender os processos biológicos, vias de sinalização e aspectos funcionais associados aos genes dos módulos de coexpressão selecionados, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional. Essa etapa teve como finalidade caracterizar funcionalmente tanto o conjunto de genes de cada módulo quanto cada gene individualmente, para embasar as análises posteriores de expressão gênica dos modelos tumorais utilizados.

As análises foram realizadas por meio de ferramentas de enriquecimento funcional no servidor DAVID (Ontologia Gênica e KEGG) (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) e REACTOME (vias de sinalização) (<https://reactome.org/>). Reactome como referência principal para identificação de vias e processos biológicos. A análise teve caráter exploratório e descritivo, e contemplou tanto o nível coletivo, para avaliação de padrões gerais dos módulos, quanto o nível individual dos genes.

5.2.4 Filtragem dos genes por painel de transcriptômica espacial

Para viabilizar a análise comparativa entre os achados *in silico* e os dados gerados experimentalmente por análise espacial, foi realizada uma etapa de filtragem dos genes identificados nos módulos de coexpressão selecionados. O objetivo foi enfatizar os genes presentes no painel nas análises subsequentes.

A filtragem foi realizada com base no Human Multi-Tissue and Cancer Panel, desenvolvido para a plataforma de transcriptômica espacial Xenium (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA). Esse painel é composto por uma lista pré-definida de genes expressos em tecidos tumorais e não tumorais, selecionados com base em sua relevância biológica para diferentes tipos de câncer e tecidos humanos. A lista completa de genes contidos neste painel pode ser consultada em <https://www.10xgenomics.com/products/xenium-panels>.

Após a filtragem, os dados de enriquecimento funcional foram utilizados para triagem dos genes e agrupamento dos mesmos por associação com processos funcionais.

5.2.5 Análise de expressão em linhagens celulares tumorais e não tumorais

Para explorar o perfil de expressão gênica dos transcritos mais variáveis em modelos celulares, foi realizada uma análise *in silico* com dados públicos de linhagens tumorais e não tumorais de cavidade oral. Essa etapa buscou avaliar o comportamento dos genes selecionados em linhagens tumorais, a partir dos módulos identificados (item 5.2.2) e grupos funcionais estabelecidos (item 5.2.4), permitindo uma comparação direta com o modelo *in vitro* e com o caso avaliado nas fases posteriores do estudo.

Os dados transcriptômicos (*microarray*) foram obtidos da base Gene Expression Omnibus (GEO) por meio da seleção de datasets contendo linhagens celulares humanas de COE e linhagens epiteliais orais não tumorais. Os critérios de seleção incluíram disponibilidade de dados de *microarray* processados e descrição clara da origem celular. Cada conjunto foi associado à sua respectiva plataforma tecnológica (GPL). Os arquivos de expressão correspondentes (séries GSE e amostras GSM) foram previamente baixados e organizados em uma lista única para processamento (Tabela suplementar S1). As matrizes de expressão foram extraídas de cada conjunto de dados, priorizando-se informações de intensidades normalizadas.

Para a harmonização dos dados, os identificadores de sondas foram convertidos em símbolos de genes (*gene symbols*) utilizando os pacotes de anotação específicos para cada plataforma disponíveis no Bioconductor, como *illuminaHumanv4.db* e *agilent.human.1a.db*. As matrizes individuais foram então integradas em uma única matriz de expressão, unificadas com base nos nomes dos genes. Para garantir a comparabilidade entre as amostras, foi avaliada a necessidade de transformação logarítmica (\log_2). Amostras cujas distribuições indicavam ausência de transformação foram normalizadas aplicando-se a função $\log_2(x + 1)$. Dessa forma, toda a matriz final passou a estar padronizada na escala \log_2 . Considerando que os dados foram gerados em diferentes experimentos e plataformas, a presença de efeito de *batch* foi avaliada e corrigida. A variável "*batch*" foi definida com base na plataforma (GPL) de origem de cada amostra. A correção foi realizada utilizando a função `removeBatchEffect`, do pacote *limma* (version 3.62.2), incorporando um modelo de design que preservava as variáveis biológicas de interesse (ex., identidade da linhagem celular). Ao final desse processamento, obteve-se uma matriz única e integrada de expressão gênica, com as amostras normalizadas em escala \log_2 e corrigidas para possíveis efeitos de *batch* associados à plataforma tecnológica, apta para análise subsequente de expressão diferencial e interpretação biológica.

5.3 *In vitro*

5.3.1 Cultivo das linhagens celulares

Com o objetivo de obter células viáveis para a formação dos esferoides tumorais tridimensionais, foram cultivadas em monocamada duas linhagens de COE: a linhagem metastática SCC-4 (ATCC) e a linhagem não metastática H357 (ECACC). As células foram mantidas em frascos de cultura contendo meio DMEM High-glucose (Gibco™, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Gibco™, Waltham, MA, EUA) e 1% de antibiótico (Pen Strep, Gibco™, Waltham, MA, EUA). As culturas foram mantidas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂, sendo monitoradas diariamente por microscópio Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA).

A linhagem de fibroblastos orais normais (NHOF) foi obtida e isolada a partir de amostras de pacientes da Universidade de Sheffield, sob aprovação do comitê de ética (IRAS Ref No: 120745; STH Ref No: STH17021). As células foram cultivadas previamente à formação dos esferoides utilizando meio DMEM/F-12 (Gibco™, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro de bovino recém-nascido (CALF – Gibco™, Waltham, MA, EUA), sob condições de incubação padrão (37°C, 5% de CO₂). Os fibroblastos foram utilizados até a 10^a passagem.

As células tumorais e os fibroblastos foram mantidos em cultivo até que atingissem confluência de aproximadamente 70–80%, com trocas de meio a cada dois dias. Para dissociação e subcultivo, as células foram lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco™, Waltham, MA, EUA) e em seguida tripsina a 0,5% (Gibco™, Waltham, MA, EUA), sendo transferidas para novos frascos. O teste de contaminação por *Mycoplasma sp.* foi realizado a cada 15 dias.

5.3.2 Indução do fenótipo ativado em fibroblastos normais

Para a ativação dos fibroblastos e simulação do fenótipo de CAFs, os NHOFs foram submetidos tratados com TGF-β1 recombinante humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA) (Yu *et al.*, 2013). As células foram expostas a este fator de crescimento em concentração de 10 ng/mL, diluído em meio DMEM/F-12 completo, durante um período de 72 horas sob incubação a 37 °C com 5% de CO₂.

Para confirmação da ativação, foi realizada a extração de RNA total utilizando o Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, ref. T2010S), conforme instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o High Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, ref. 4387406/4388950). A expressão do gene *ACTA2* (α -SMA), marcador do perfil de miofibroblastos (Sharon *et al.*, 2013), foi avaliada por q-PCR, utilizando o gene endógeno *ACTB* (β -actina) como normalizador. A reação foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemanha), sob as seguintes condições: etapa inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 45 segundos, com aquisição de fluorescência nos canais Green (*ACTA2*) e Yellow (*ACTB*). Os controles técnicos foram realizados em todas as etapas, incluindo controle negativo (NTC) e o controle endógeno. O teste foi feito em réplica técnica e tríplica biológica e a expressão relativa foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Estes fibroblastos ativados foram denominados "NHOF-MYO", em referência ao seu perfil de miofibroblasto.

5.3.3 Obtenção dos esferoides por *bioprinting* magnético

Os esferoides de COE foram obtidos utilizando o sistema de *bioprinting* magnético Bio-Assembler™ (n3D Biosciences, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). Esse método baseia-se na magnetização das células por adesão eletrostática de nanopartículas biocompatíveis (Nanoshuttle-PL™, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), compostas por óxido de ferro, ouro e poli-L-lisina. Essas partículas aderem à membrana celular, permitindo que as células respondam à força magnética e se organizem tridimensionalmente, formando estruturas esferoidais.

O protocolo foi adaptado a partir das orientações do fabricante, com base no modelo descrito e publicado pela nossa equipe (de Araújo *et al.*, 2024) (Apêndice). Inicialmente, as células tumorais e os fibroblastos foram cultivados em sistema bidimensional, até alcançarem 70–80% de confluência. Em seguida, foram dissociadas com tripsina 0,5% (Gibco™, Waltham, MA, EUA), lavadas com PBS (Gibco™, Waltham, MA, EUA) e submetidas a centrifugação a 1.500 rpm por três minutos, repetida três vezes.

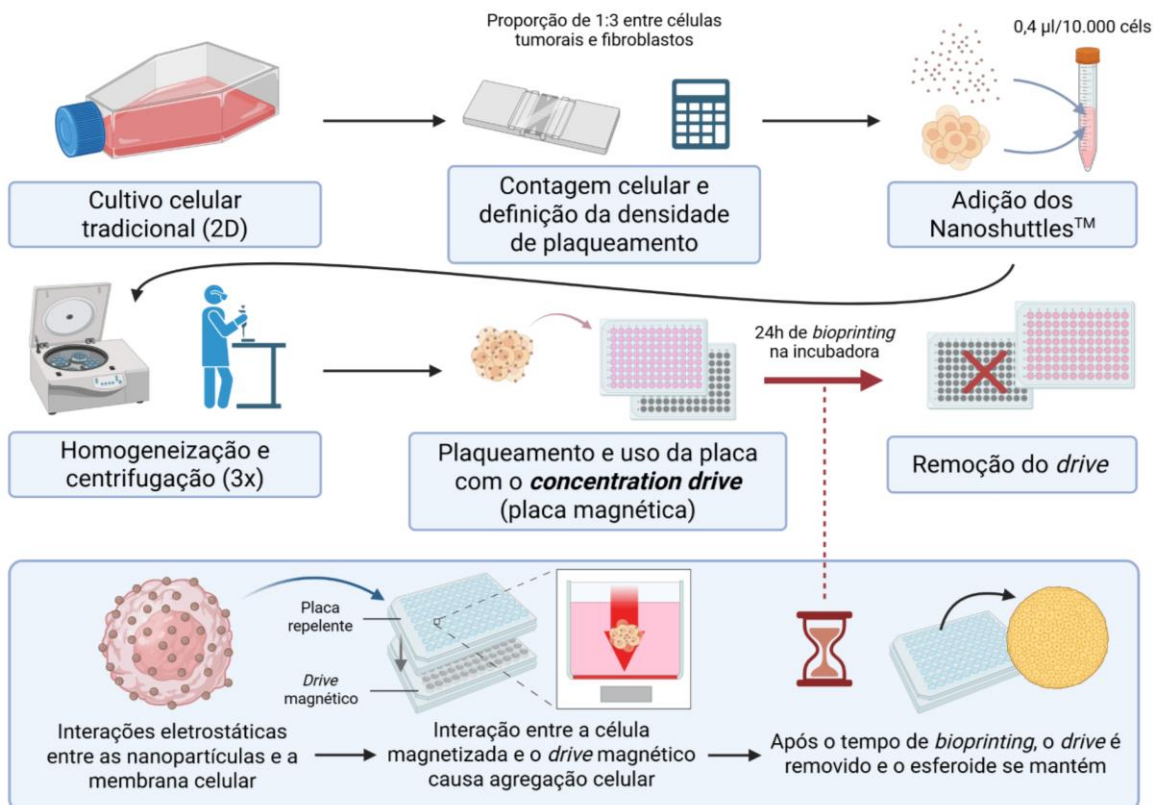
Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio DMEM High Glucose (Gibco™, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de FBS (Gibco™, Waltham, MA, EUA) e 1% de antibiótico (Pen Strep, Gibco™, Waltham, MA, EUA), e quantificadas por exclusão de azul de tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na câmara de Neubauer.

Definida a densidade celular, as populações foram combinadas na proporção de 1:3 entre células tumorais e fibroblastos, conforme o modelo experimental adotado.

As nanopartículas Nanoshuttle-PL™ (n3D Biosciences, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram então adicionadas à suspensão celular na proporção de 0,4 µL para cada 10.000 células. A mistura de células magnetizadas foi homogeneizada e plaqueada em placas de 96 poços com superfície repelente (Cell-Repellent Surface, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), que foram acopladas a uma base magnética (*concentration drive*, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). Durante 24 horas de incubação a 37 °C com 5% de CO₂, a força magnética induziu a organização celular em esferoides tridimensionais suspensos.

Após esse período, o *drive* magnético foi removido e os esferoides foram cultivados por até 72 horas (Figura 6). Os esferoides foram gerados em triplicata técnica e réplica biológica, incluindo modelos homotípicos (somente células tumorais) e heterotípicos (células tumorais com NHOF ou NHOF-MYO), conforme descrito na Tabela 1.

Figura 6 - Representação esquemática do processo de *bioprinting* magnético para formação de esferoides. O processo inclui a magnetização das células com nanopartículas (Nanoshuttle-PL™, n3D Biosciences, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), o plaqueamento em placas de 96 poços com superfície repelente (Cell-Repellent Surface, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), e a indução da organização tridimensional utilizando base magnética (*concentration drive*, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). O sistema Bio-Assembler™ (n3D Biosciences, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) permite a formação de esferoides heterotípicos compostos por células tumorais e fibroblastos, que reproduzem aspectos do microambiente tumoral.



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

Tabela 1 - Grupos de esferoides utilizados no estudo.

Linhagens tumorais	Esferoide controle	Esferoide com NHOF	Esferoide com NHOF-MYO
SCC-4	SCC-4	SCC-4 + NHOF	SCC-4 + NHOF-MYO
H357	H357	H357 + NHOF	H357 + NHOF-MYO

Nota: NHOF = Fibroblastos orais humanos normais; NHOF-MYO = Fibroblastos orais humanos com fenótipo miofibroblástico.

Fonte: Autor

5.3.4 Fixação, inclusão e construção do TMA dos esferoides

Para possibilitar a análise histológica e espacial dos esferoides, foi realizada sua fixação, processamento e organização em microarranjos teciduais (TMA). Inicialmente, o meio de cultura foi cuidadosamente removido dos poços e os esferoides foram lavados com PBS (Gibco™, Waltham, MA, EUA), mantendo-se em posição por meio da ação de uma placa magnética acoplada à base das placas de cultivo. A fixação foi conduzida com paraformaldeído (PFA) a 4% gelado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando ponteiras de 1000 µL com extremidades cortadas para preservar a integridade estrutural dos esferoides durante a manipulação.

O processamento histológico foi realizado no Setor de Histotecnologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Sheffield (Reino Unido), segundo protocolos padronizados de desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Para otimizar as análises subsequentes e maximizar o rendimento experimental, os esferoides foram organizados em TMAs utilizando o equipamento TMA Assembler (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA). Este sistema utiliza uma agulha de punção para extrair cilindros de parafina dos blocos doadores contendo os esferoides e transferi-los para um bloco receptor, de acordo com um mapeamento previamente definido.

5.3.5 Obtenção dos dados de transcriptômica espacial dos esferoides

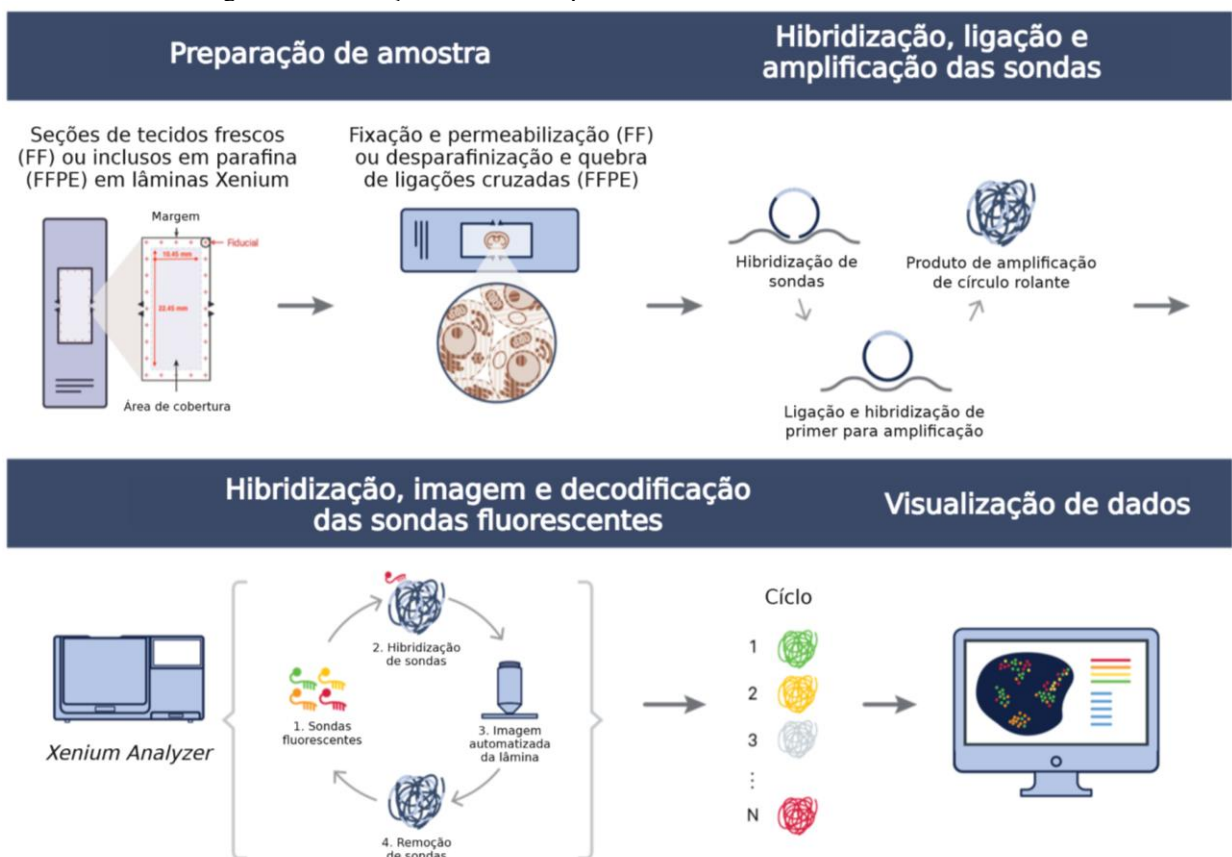
Para a obtenção dos dados de transcriptômica espacial dos esferoides, foi utilizado o sistema Xenium Analyzer da 10x Genomics (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA). Essa plataforma permite a detecção da expressão gênica com resolução de célula única, mantendo a

informação espacial do tecido, por meio de um sistema automatizado de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes específicas.

Inicialmente, foram realizados cortes dos blocos de TMA em secções de 4 µm, fixados em lâminas compatíveis com o sistema Xenium. As lâminas foram então submetidas ao protocolo padrão do fabricante, que inclui etapas de preparação da amostra, hibridização de sondas específicas, amplificação do sinal e lavagens sucessivas.

Em seguida, o processamento automatizado foi realizado no Xenium Analyzer da Universidade de Nottingham (Reino Unido), envolvendo ciclos de hibridização de sondas fluorescentes, captura de imagens em alta resolução e decodificação dos transcritos. Cada gene foi identificado por um código de barras único, mantendo sua posição espacial original no tecido. O fluxo completo do protocolo experimental está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma ilustrativo do protocolo experimental da plataforma Xenium. A figura descreve as principais etapas do processo, incluindo preparo da amostra, hibridização e amplificação de sondas, captura automatizada de imagens e visualização dos dados espaciais.



Fonte: Figura adaptada da 10x Genomics (<https://www.10xgenomics.com/blog/answering-your-questions-about-xenium-in-situ-spotlight-on-getting-started-and-panel-design>), traduzida para o português e criada utilizando a plataforma BioRender.com.

Neste estudo, foi utilizado um painel inventariado Human Multi-Tissue and Cancer Panel da 10x Genomics (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA), contendo alvos moleculares relacionados a diferentes tipos de tecidos e processos tumorais.

5.3.6 Análise espacial de expressão gênica dos esferoides

Para investigar os padrões de expressão gênica nos modelos tumorais de esferoides, foram analisados os dados gerados pelo sistema Xenium Analyzer (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA) que consistiram na quantificação espacial da expressão de transcritos individuais. Para análise de expressão gênica, os esferoides foram agrupados de acordo com o perfil metastático (metastáticos ou não-metastáticos) e condição experimental (controle tumoral, tumoral + NHOE e tumoral + CAF). A avaliação da expressão gênica foi feita considerando os módulos e grupos funcionais definidos na etapa *in silico* (itens 5.2.2 e 5.2.3).

As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando o *software* Xenium Explorer (versão 3.2.0, 10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA). Esse programa permite a visualização de transcritos específicos sobrepostos à morfologia tecidual, com exportação em diferentes formatos gráficos. As visualizações foram organizadas por grupo funcional, conforme definido a partir da análise de enriquecimento funcional dos módulos obtidos na etapa *in silico* (item 5.2.4).

5.4 Estudo de caso

5.4.1 Origem e caracterização do caso de COE

Para fins de estudo dos processos biológicos identificados através da análise *in silico*, um caso de COE foi disponibilizado pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Sheffield (Reino Unido), por meio de colaboração internacional. Todo o material foi fornecido de forma anonimizada, com identificação codificada, e o uso da amostra foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Sheffield (IRAS Ref No: 312622; STH Ref No: STH21728).

5.4.2 Obtenção dos dados de transcriptômica espacial e histologia do caso

Os dados utilizados nesta etapa foram gerados previamente pela equipe da Universidade de Sheffield, com o apoio técnico da 10x Genomics, e fornecidos já processados para análise no presente estudo: (i) a imagem histológica do corte utilizado; (ii) os dados brutos de expressão por *spot*; (iii) os arquivos de anotação para identificação das áreas do tecido; e (iv) dados de *clustering* celular.

Para o caso de COE incluído, foi disponibilizada uma imagem histológica corada por H&E em alta resolução, além dos dados de transcriptômica espacial e análise de *clusters* obtidos pela plataforma Visium (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA).

A tecnologia Visium permite a análise da expressão gênica em cortes de tecido preservando a localização espacial dos transcritos, com base em um sistema de captura de RNA por oligonucleotídeos com códigos de barra moleculares impressos em lâminas compatíveis. Como resultado, a plataforma fornece mapeamento espacial detalhado, entretanto, sem a resolução *single-cell*, agrupando transcritos em *spots* que representam pequenas áreas do tecido. O protocolo padrão da 10x Genomics envolve a fixação e coloração do tecido, seguida de permeabilização, captura de RNA e geração de cDNA, que é posteriormente sequenciado e associado à sua posição original no corte histológico.

5.4.3 Análise de expressão gênica espacial do caso

Para estudar a expressão gênica espacial no caso de COE, foi realizada a análise dos dados brutos fornecidos pela plataforma Visium Spatial Gene Expression (10x Genomics, Pleasanton, CA, EUA). Esses dados correspondem à quantificação de transcritos em regiões delimitadas do tecido, preservando sua distribuição espacial original e permitindo correlação com a morfologia tumoral.

A análise foi direcionada para dois eixos principais: os módulos de coexpressão gênica identificados na etapa *in silico* (item 5.2.2) e os grupos funcionais temáticos definidos com base em funções biológicas comuns (item 5.2.4). Adicionalmente, foram investigados os *clusters* de células identificados pela plataforma com base nos perfis de expressão gênica.

Os dados foram organizados para permitir análises descritivas com destaque para os padrões de expressão gênica nas diferentes regiões do tumor (*front* de invasão superficial e *core* tumoral) e *clusters* celulares definidos pelo painel Visium.

5.4.4 Avaliação de estruturas *cell-in-cell* nas imagens histológicas

Para investigar a presença de estruturas CIC no caso de COE, foi realizada uma análise morfológica exploratória com base na imagem histológica corada por H&E. A avaliação foi conduzida de forma qualitativa, com foco na identificação pontual da presença ou ausência de estruturas CIC em regiões tumorais específicas e *clusters* celulares. A análise foi realizada por inspeção visual direta em imagem digitalizada de alta resolução, com observação da morfologia celular e critérios histológicos clássicos descritos na literatura. Achados CIC são descritos como uma célula internalizada em outra, cujo núcleo encontra-se em forma semilunar e deslocado para a periferia da célula (Siquara da Rocha *et al.*, 2022; Wang, Xinlong *et al.*, 2019).

A partir dos dados de *clusters* e distribuição espacial da expressão gênica nas regiões onde foram encontradas estruturas CIC, buscou-se associá-las a perfis de expressão de genes e aos grupos funcionais estabelecidos (item 5.2.4), integrando assim a observação morfológica com os achados da análise espacial dos tumores.

6 RESULTADOS

6.1 Ensaios *in silico*

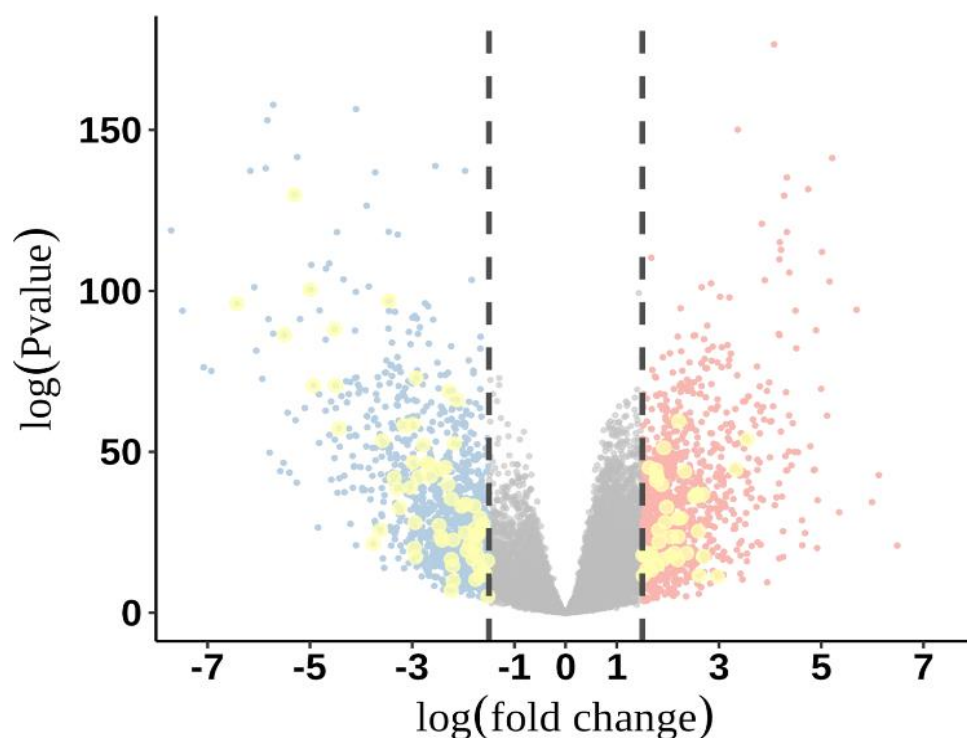
6.1.1 Análise do perfil transcriptômico de casos de COE (TCGA)

Para avaliação do perfil transcriptômico em casos de COE, foram identificados DEGs a partir de estudos disponíveis no TCGA (TCGA-HNSC). A análise revelou um total de 2.410 DEGs ($|\log_2FC| > 2$), sendo de genes subexpressos, 1.197, e, superexpressos, 1.213.

Ao compararmos o conjunto de DEGs encontrados e o painel de marcadores analisado através de transcriptômica espacial (Xenium), encontramos 103 genes (27%) coincidentes (**Figura 8**).

Figura 8 - Gráfico de dispersão (*volcano plot*) demonstrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados na análise do TCGA para carcinoma oral de células escamosas (COE). Os pontos em vermelho representam genes superexpressos ($\log_2 \text{fold change} > 2$), enquanto os pontos em azul indicam genes subexpressos ($\log_2 \text{fold change} < -2$). Os pontos destacados em amarelo representam os genes coincidentes entre a análise e o painel Xenium. Esta visualização permite identificar genes relevantes que são tanto diferencialmente expressos em COE quanto passíveis de análise no estudo dos esferoides através do painel do Xenium.

Distribuição dos DEGs identificados no TCGA-HNSC



Fonte: Autor

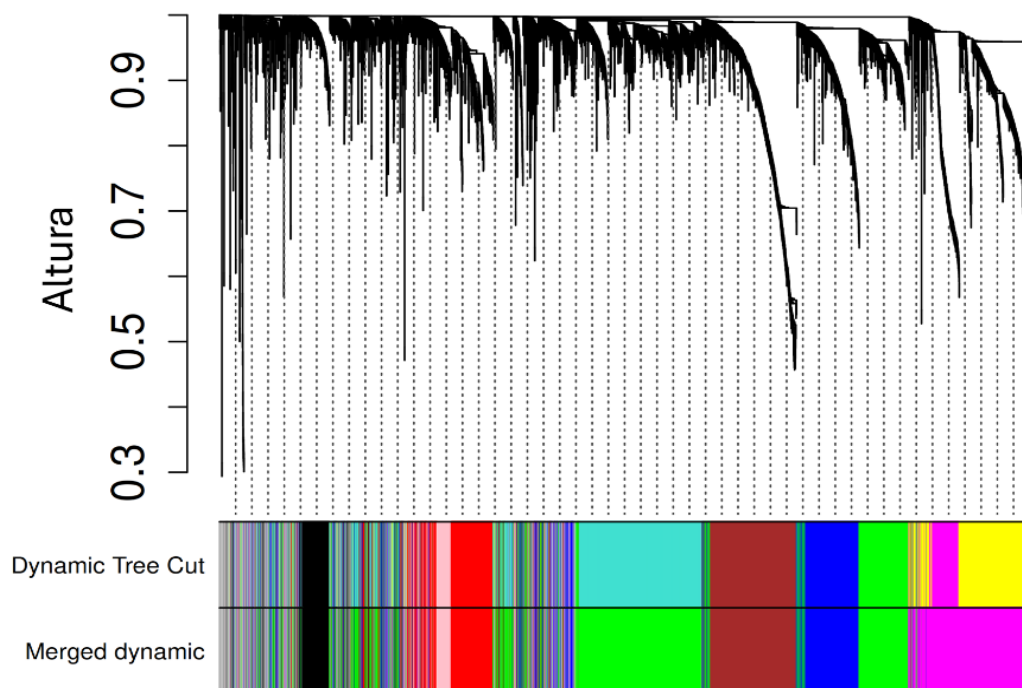
Para expandir as análises de assinatura gênica em COE, além dos DEGs convencionais, incluímos os 10% de genes com maior variabilidade de expressão entre amostras tumorais e não tumorais. Essa abordagem permite incluir genes que possam refletir a heterogeneidade tumoral e/ou ativação de vias específicas. Foram encontrados 6.742 genes mais variados, com 247 (66%) deles presentes no painel usado na análise de transcriptômica espacial (Xenium). Esses dados reforçam a importância da inclusão de genes altamente variáveis para estudos em câncer.

6.1.2 Análise de módulos de coexpressão

A fim de identificar padrões de expressão entre os genes mais variados, realizamos uma análise de correlação que resultou na identificação de sete módulos (Figuras 9-10). Os agrupamentos resultantes foram organizados em módulos de coexpressão, identificados por cores arbitrárias (ex: *pink*, *blue* e *green*).

Figura 9 - Análise de agrupamento (*clustering*) dos genes em módulos de coexpressão identificados a partir dos dados do TCGA voltados para carcinoma de cabeça e pescoço (TCGA-HNSC). A altura das ramificações no dendrograma representa a distância ou dissimilaridade entre os grupos de genes, onde ramificações mais próximas indicam maior correlação na expressão gênica.

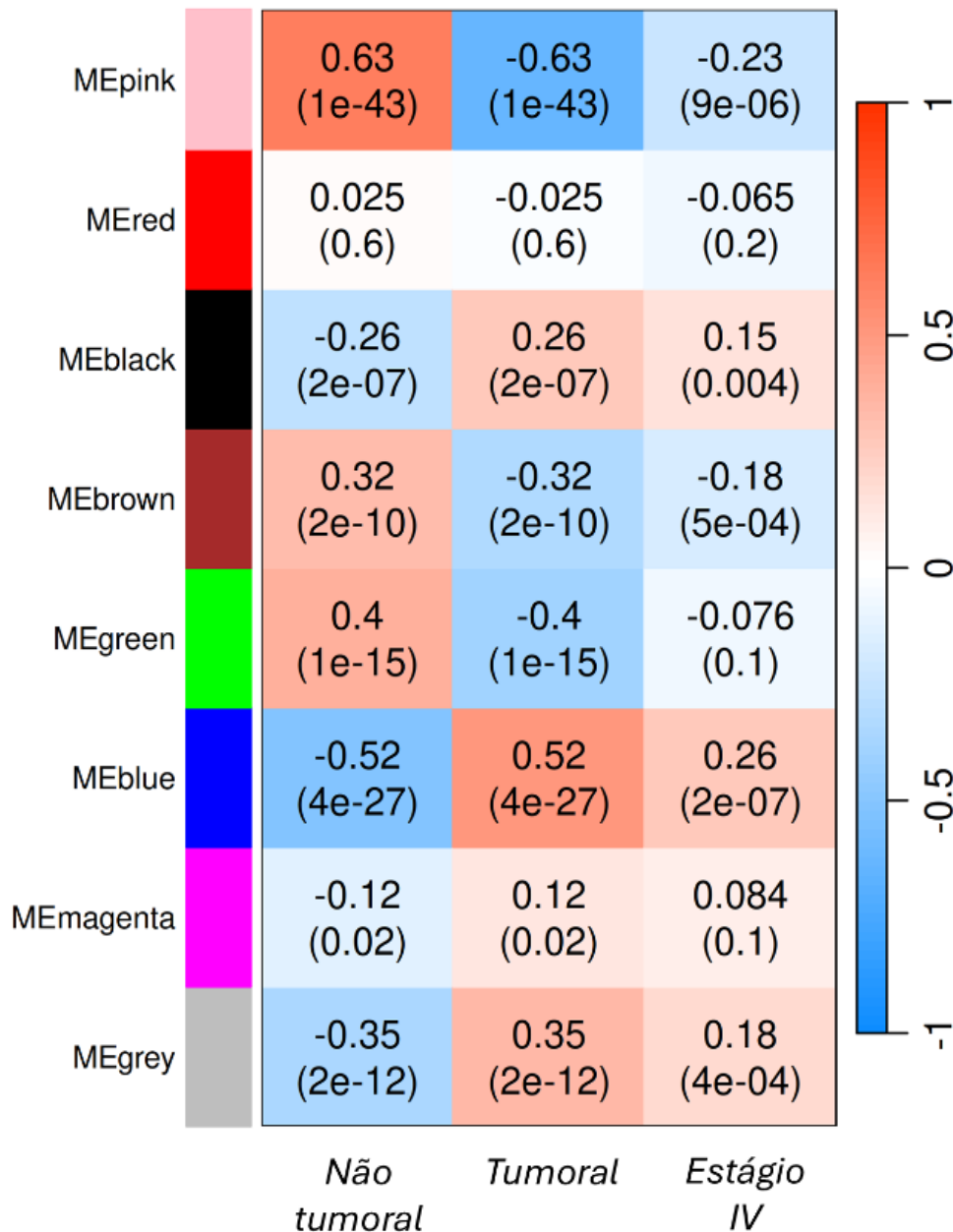
Dendrograma dos genes mais variados



Fonte: Autor

Figura 10 - *Heatmap* de correlação dos genes mais variados. Os genes foram agrupados em módulos de coexpressão gênica, considerando um valor $r^2 \geq 0,4$ (correlações moderadas a fortes) para seleção dos módulos de interesse. Por esses parâmetros, os módulos que se destacam são o *pink*, *blue* e *green*. O módulo *grey* é o conjunto de genes que não apresentaram correlação entre si.

Correlação entre Módulos de Coexpressão Gênica

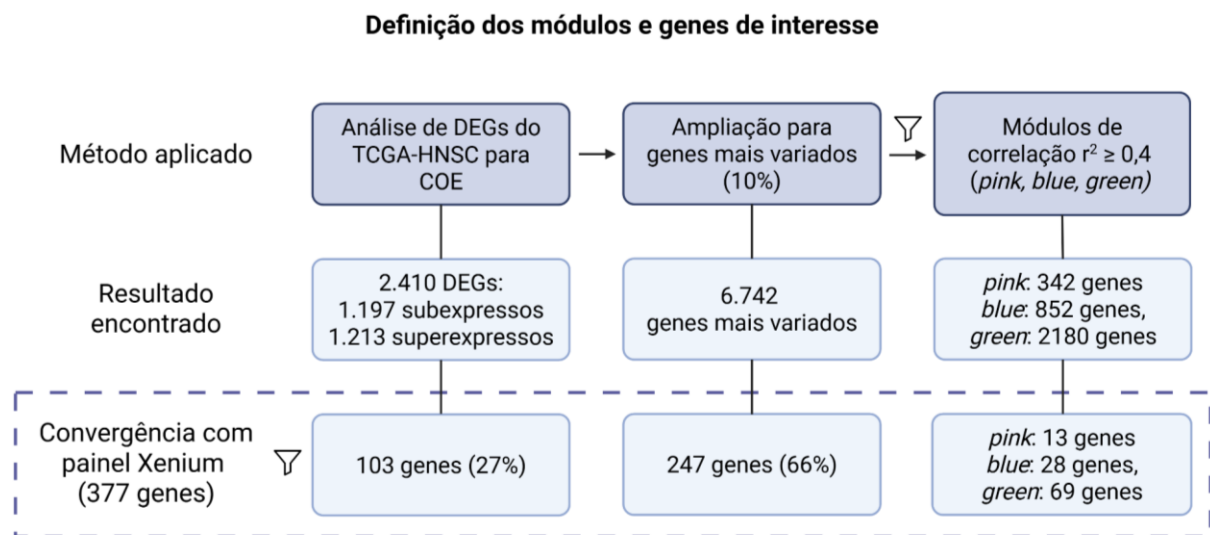


Fonte: Autor

Conforme ilustrado no *heatmap* da Figura 10, três módulos se destacaram por apresentarem correlação moderada a forte ($r^2 \geq 0,4$) entre os grupos tumorais e não-tumorais: o módulo rosa (*pink*) com 342 genes, o módulo azul (*blue*) com 852 genes, e o módulo verde

(*green*), o mais extenso, com 2180 genes. Ao analisar a presença dos 247 genes mais variados (coincidentes entre o TCGA-HNSC e o painel para análise de transcriptômica espacial) entre estes módulos em destaque, identificamos 13 genes no módulo rosa (*pink*), 28 genes no módulo azul (*blue*) e 69 genes no módulo verde (*green*) (Tabela 2). O processo de obtenção e categorização dos genes de interesse no estudo está ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma de identificação e seleção dos genes de interesse. A partir dos genes diferencialmente expressos (DEGs) obtidos do TCGA (TCGA-HNSC) específicos para carcinoma oral de células escamosas (COE), foi ampliada a seleção para 10% dos genes mais variados entre as amostras. Após o estabelecimento dos módulos de correlação, os três de destaque com maior força de correlação foram o *pink*, *blue* e *green*. Em todas as etapas, foi analisada a convergência dos genes resultantes com o painel utilizado para transcriptômica espacial (Xenium).



Fonte: Figura criada com a plataforma BioRender.com.

Tabela 2 - Distribuição dos genes mais variados presentes nos módulos de coexpressão *pink*, *blue* e *green*.

Módulos	Genes
Módulo <i>pink</i>	<i>ACE2, ALDH1A3, CAV1, CYP1A1, CYP3A4, DNASE1L3, EHF, ELF5, FSTL3, GPX2, IL1R2, SFTA2, UPK3B</i>
Módulo <i>blue</i>	<i>ACTA2, AQP9, ASPN, BASP1, CFHR3, COL5A2, CTSK, FBNI, IL7R, LGR5, LIF, MCEMP1, MFAP5, PCOLCE, PDGFRB, PDPN, RETN, SEMA3C, SFRP2, SRPX, STC1, STC2, THBS2, THY1, TNC, TMEM52B, TREM2, VCAN</i>
Módulo <i>green</i>	<i>ACKR1, ACTG2, ADH1C, AQP2, AR, ARFGFEF3, ASCL1, ASCL3, BAMBI, BMX, BTNL9, CAPN8, C7, CAVIN2, CFTR, CLIC6, CNN1, CYP2B6, CYP2F1, CYP4B1, DMBT1, DPT, EPCAM, FGF2, FOXA1, FOXI1, FOXJ1, GATM, GPC3, HEPACAM2, HMGCS2, IGF1, IL7R, INMT, KIT, KRT20, KRT7, LPL, LYVE1, MCF2L, MCEMP1, MEDAG, MLPH, MMRN1, OGN, OPRPN, PCP4, PCOLCE, PCSK2, PDGFRA, PLAC9, PPARG, PPP1R1B, PTGDS, PTN, RETN, RTKN2, SCGB2A1, SCGN, SELE, SFRP4, SNTN, SOX2, SPDEF, SFTA2, TCIM, TFF2, TMC5, TMEM100</i>

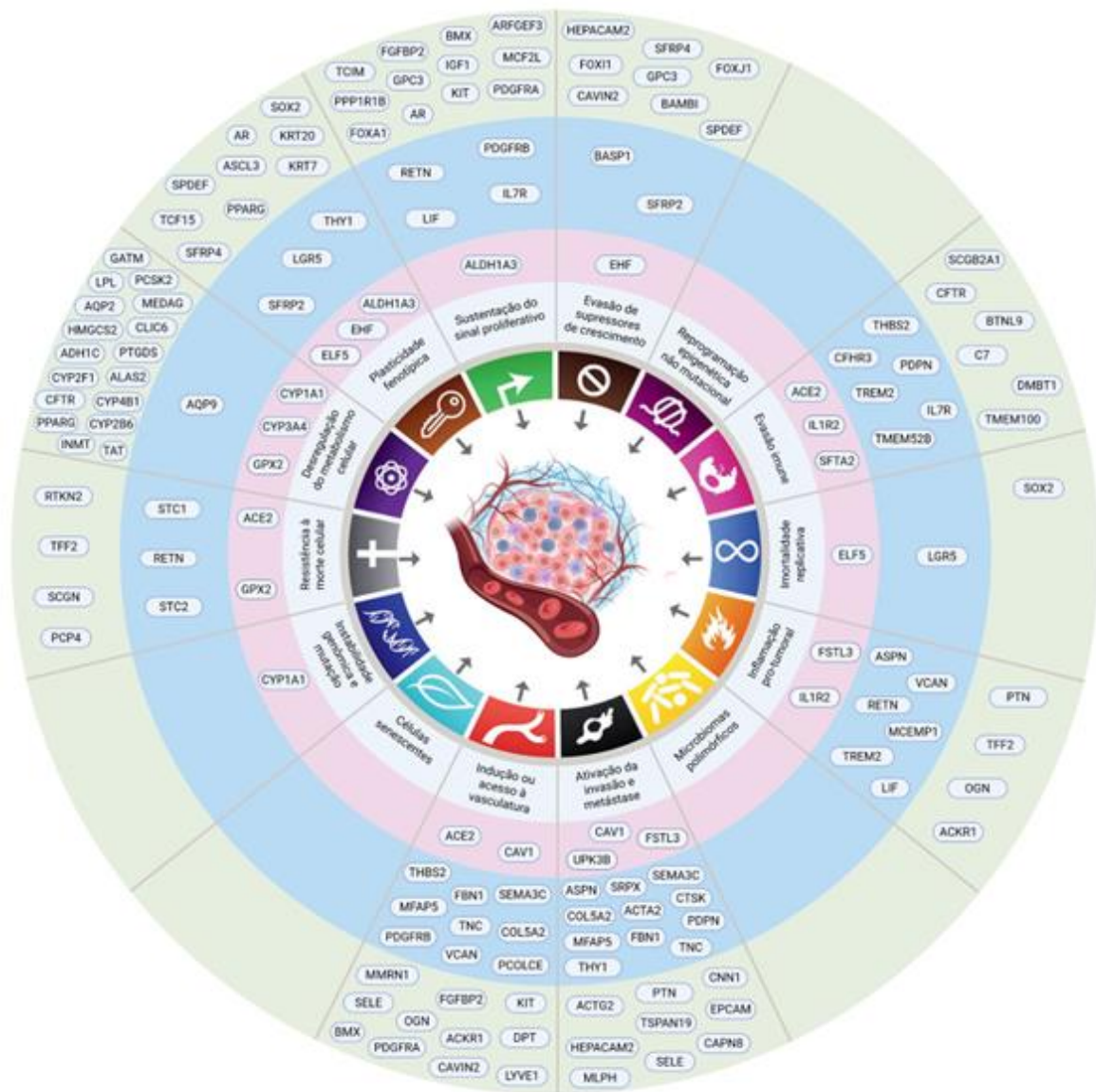
Fonte: Autor

6.1.3 Análise de enriquecimento funcional

A análise abrangente das vias de sinalização e processos biológicos associados aos módulos encontrados foi realizada através das plataformas Reactome e DAVID. A Tabela suplementar S2 resume os achados do enriquecimento funcional dos genes por módulo e a Figura 12 ilustra a relação entre a análise de enriquecimento e processos biológicos importantes para o câncer.

Figura 12 - Relação entre os genes dos módulos *pink*, *blue* e *green* e processos biológicos no câncer, baseados no artigo seminal “The Hallmarks of Cancer - New Dimensions” (Hanahan, 2022). Figura criada com a plataforma BioRender.com.

Distribuição dos genes dos módulos nos *Hallmarks* do Câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan 92022)

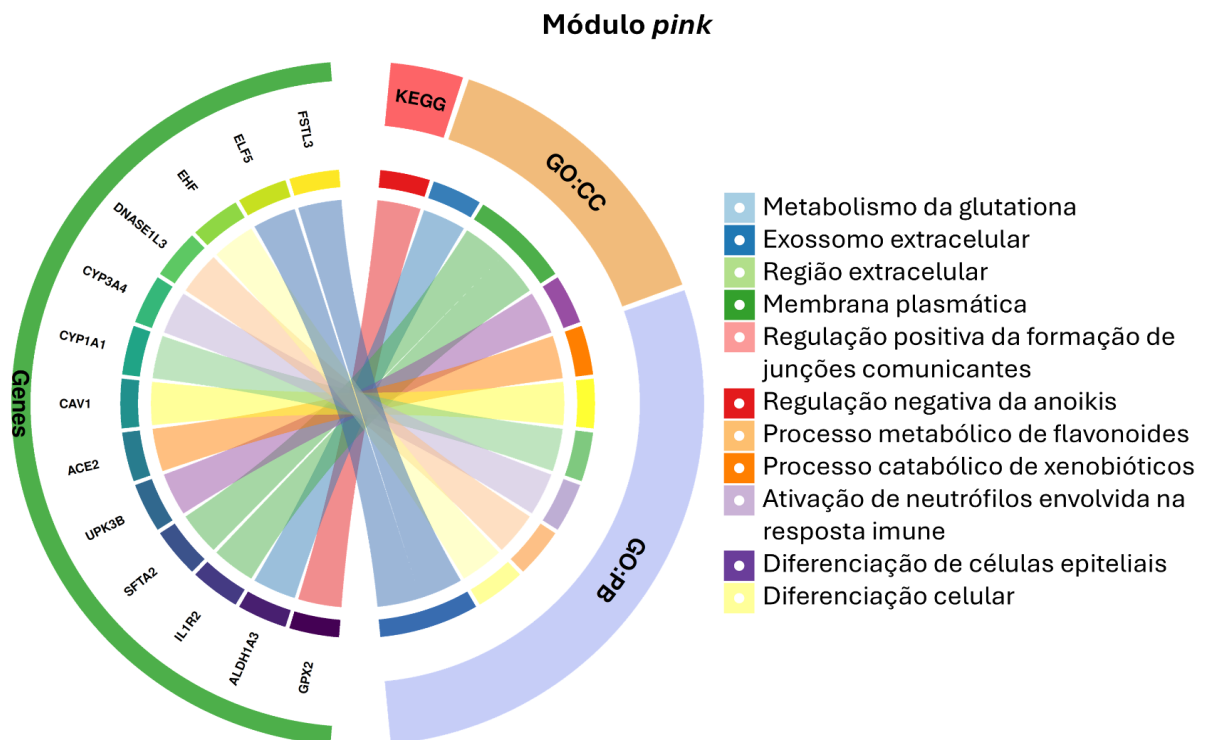
6.1.3.1 Módulo *pink*

Os genes do módulo *pink* (n=13) apresentaram forte correlação ($r^2 = 0,63$). Este módulo é composto por genes principalmente associados a processos da resposta imune, manutenção da homeostase epitelial, regulação da inflamação e modulação do microambiente tumoral, com destaque para vias de sinalização inflamatórias e de remodelamento da MEC, como ilustrado

na Figura 13. Dentre os principais processos biológicos representados, observam-se a resposta à inflamação e à hipóxia (*SFTA2*, *DNASE1L3*, *ACE2*), a TEM (*EHF*, *FSTL3*, *ALDH1A3*), e a homeostase redox (*GPX2*). Quanto às vias de sinalização, há envolvimento de PI3K/AKT (*ACE2*, *GPX2*, *ALDH1A3*), Wnt/ β -catenina (*FSTL3*, *GPX2*), IFN- γ (*ELF5*), VEGF/ERK (*ACE2*) e HIF-1 α (*ACE2*, *FSTL3*), sugerindo forte influência sobre a angiogênese, imunomodulação e resistência terapêutica.

Em relação aos componentes celulares, predominam genes expressos em células epiteliais (*ELF5*, *EHF*, *GPX2*), pneumócitos tipo II (*SFTA2*) e células imunes ou relacionadas à imunidade inata (*DNASE1L3*). Genes como *ELF5*, *EHF* e *DNASE1L3* apresentam função supressora tumoral, enquanto *FSTL3*, *GPX2* e *ALDH1A3* estão associados à progressão tumoral, invasão e metástase. A presença de genes como *UPK3B* e *CYP1A1* indica possível atuação complementar em vias de diferenciação epitelial e metabolismo de xenobióticos, respectivamente. Esse conjunto sugere que o módulo *pink* está funcionalmente ligado à regulação da inflamação, plasticidade celular e remodelamento tecidual.

Figura 13 - Diagrama de corda (*chord plot*) do módulo *pink*. O diagrama ilustra as interações entre genes e vias biológicas relacionados à resposta imune, homeostase epitelial, regulação da inflamação e modulação do microambiente tumoral. As conexões (cordas) mostram as associações funcionais entre os genes do módulo (à esquerda) e as principais vias de sinalização (KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), componentes celulares (Gene Ontology, GO:CC) e processos biológicos (PB) relacionados (à direita).



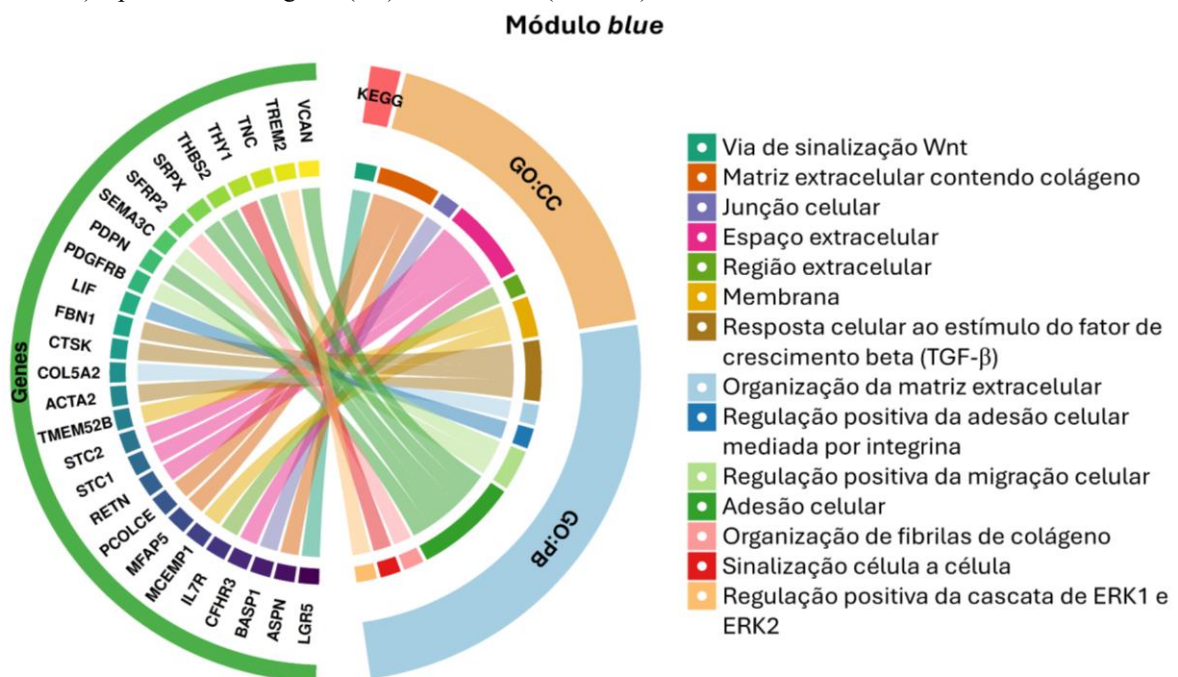
Fonte: Autor

6.1.3.2 Módulo *blue*

Os genes do módulo *blue* apresentaram forte correlação ($r^2 = 0,52$) entre seus genes constituintes ($n=28$). Ele é central para mecanismos de invasão, metástase e resistência terapêutica (Figura 14). Dentre os principais processos biológicos, destacam-se o remodelamento da MEC (*ACTA2*, *CTSK*, *ASPN*, *FBN1*, *COL5A2*), a TEM (*ACTA2*, *LGR5*, *FBN1*, *ASPN*, *IL7R*, *LIF*, *MCEMP1*), e a manutenção da pluripotência (*LGR5*) e sinalização de células-tronco (*BASPI*). As vias TGF- β /Smad (*ACTA2*, *FBN1*, *ASPN*, *LIF*), Wnt/ β -catenina (*LGR5*, *AQP9*, *BASPI*), PI3K/AKT (*IL7R*, *AQP9*, *FBN1*), JAK/STAT (*LIF*, *IL7R*), e MAPK/ERK (*ASPN*, *MCEMP1*) também foram destaque.

Quanto aos componentes celulares, predominam genes expressos em CAFs (*ACTA2*, *ASPN*, *FBN1*, *LIF*), mastócitos/monócitos (*MCEMP1*), e células-tronco tumorais (*LGR5*). Genes como *ASPN*, *CTSK*, *LGR5*, *BASPI* e *MCEMP1* estão fortemente relacionados à progressão tumoral, metástase e evasão imunológica, enquanto *AQP9*, *CFHR3* e *COL5A2* apresentam potenciais papéis supressores, dependendo do contexto tumoral.

Figura 14 - Diagrama de corda (*chord plot*) do módulo *blue*. O diagrama ilustra processos relacionados ao remodelamento da matriz extracelular (MEC), transição epitélio-mesenquimal (TEM) e modulação do microambiente tumoral, sendo central para mecanismos de invasão, metástase e resistência terapêutica. As conexões (cordas) mostram as associações funcionais entre os genes do módulo (à esquerda) e as principais vias de sinalização (KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), componentes celulares (Gene Ontology, GO:CC) e processos biológicos (PB) relacionados (à direita).

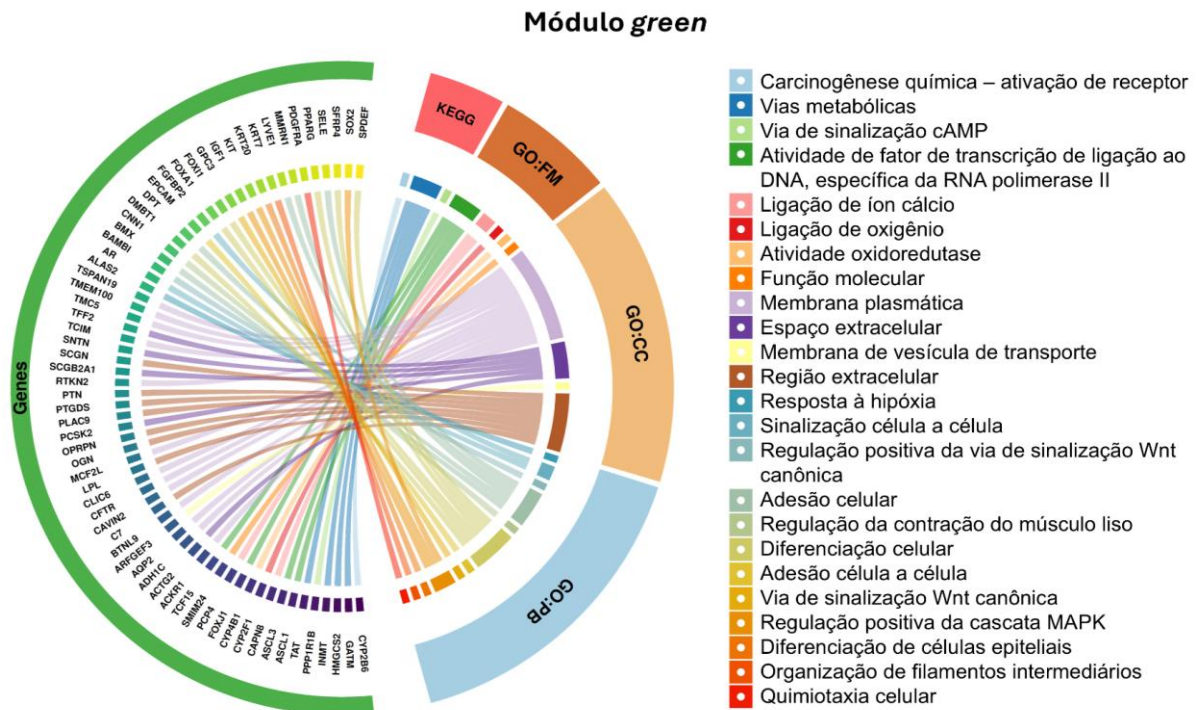


6.1.3.3 Módulo *green*

Os genes do módulo *green* (n=69) apresentaram correlação moderada ($r^2 = 0,4$) (Figura 15), sendo relacionados ao metabolismo celular, microambiente tumoral, regulação da invasividade e resistência terapêutica, refletindo a plasticidade tumoral e adaptação ao estresse. Entre os processos biológicos mais relevantes, observam-se a TEM (*SFRP4*, *CNN1*, *FOXA1*, *TCF15*, *KRT7*, *BAMBI*, *SOX2*), a diferenciação epitelial e plasticidade (*FOXA1*), a modulação de processos metabólicos e a diferenciação (*PPARG*), assim como metabolismo energético e lipídico (*HMGCS2*, *LPL*, *GATM*, *MEDAG*). Quanto às vias de sinalização, destacam-se TGF- β /Smad (*BAMBI*, *TMEM100*), Wnt/ β -catenina (*SFRP4*, *RTKN2*), PI3K/AKT (*PDGFRA*, *IGF1*, *PPP1R1B*), além de vias associadas à inflamação (NF- κ B, STAT3).

No que diz respeito aos componentes celulares, o módulo inclui genes expressos em CAFs (*BTNL9*, *PPARG*, *PTN*), células-tronco tumorais (*EPCAM*, *SOX2*) e células epiteliais diferenciadas ou em transição (*KRT20*, *TSPAN19*). Diversos genes estão ligados a invasão e metástase (*MLPH*, *PDGFRA*, *LYVE1*, *TSPAN19*), angiogênese, inflamação ou remodelamento da MEC (*FGFBP2*, *DPT*, *OGN*, *SCGB2A1*). Outros genes deste módulo foram *SFRP4*, *PPARG* e *GPC3*, envolvidos principalmente em plasticidade celular, metabolismo e diferenciação celular, respectivamente.

Figura 15 - Diagrama de corda (*chord plot*) do módulo *green*. O diagrama ilustra processos relacionados ao metabolismo celular, modulação do microambiente tumoral, regulação da transição epitélio-mesenquimal (TEM) e resistência terapêutica, refletindo um perfil de plasticidade tumoral e adaptação ao estresse. As conexões (cordas) mostram as associações funcionais entre os genes do módulo (à esquerda) e as principais vias de sinalização (KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), funções moleculares (Gene Ontology, GO:FM), componentes celulares (CC) e processos biológicos (PB) relacionados (à direita).



Fonte: Autor

6.1.4 Caracterização dos grupos funcionais

A partir da análise de enriquecimento funcional dos genes dos módulos *pink*, *blue* e *green*, os genes foram classificados em nove grupos funcionais principais com base em suas funções moleculares e vias de sinalização. Estes grupos representam processos biológicos importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral: angiogênese, atividade de CAF, inflamação/imunidade, invasão/metástase, metabolismo/estresse, remodelamento da MEC, resistência terapêutica, *stemness* (perfil de células-tronco tumorais) e TEM. Cabe considerar que nem todos os genes eram associados a um determinado grupo e que vários genes estavam presentes em múltiplos grupos. A Tabela 3 resume os grupos funcionais e indica através de setas (↑/↓) quais genes estão com expressão aumentada (↑) ou diminuída (↓).

Tabela 3 - Grupos funcionais identificados a partir da análise de enriquecimento dos módulos de coexpressão, incluindo os genes pertencentes a cada grupo e suas principais características funcionais.

Grupo funcional	Genes identificados	Descrição
Angiogênese	<i>ACE2</i> ↓, <i>CAVI</i> ↑, <i>CYP1A1</i> ↓, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>DNASE1L3</i> ↓	Fatores de crescimento e receptores associados à vascularização.
Atividade de fibroblastos associados ao câncer (CAFs)	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>ELF5</i> ↓, <i>IL1R2</i> ↑, <i>ACTA2</i> ↑, <i>PDGFRA</i> ↑, <i>PTN</i> ↑, <i>THBS2</i> ↓	Genes expressos por ou moduladores de fibroblastos tumorais.
Inflamação/ imunidade	<i>ACE2</i> ↓, <i>CAVI</i> ↓, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>DNASE1L3</i> ↑, <i>EHF</i> ↓, <i>IL1R2</i> ↑, <i>SCGB2A1</i> ↑	Ligados a quimiocinas, citocinas e infiltração de células imunes.
Invasão/ metástase	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↑, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>DNASE1L3</i> ↓, <i>EHF</i> ↓, <i>IL1R2</i> ↑, <i>THY1</i> ↓	Envolvidos na migração, colonização e disseminação tumoral.
Metabolismo/ estresse	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↑, <i>CYP1A1</i> ↑, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>EHF</i> ↓, <i>GPX2</i> ↑	Ligados ao metabolismo lipídico, glicolítico e detox.
Remodelamento da matriz extracelular (MEC)	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↑, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>EHF</i> ↓, <i>ELF5</i> ↓, <i>FBNI</i> ↓, <i>MMP11</i> ↓, <i>MMP9</i> ↑, <i>MMP2</i> ↑	Envolve a estrutura da matriz, rigidez, migração e invasão.
Resistência terapêutica	<i>ACE2</i> ↑, <i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↑, <i>CYP1A1</i> ↓, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>EHF</i> ↓, <i>FBNI</i> ↓, <i>GPX2</i> ↑	Genes que favorecem a sobrevivência celular sob tratamento.
<i>Stemness</i> (perfil de células-tronco tumorais)	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>GPX2</i> ↑, <i>AQP9</i> ↓, <i>BASP1</i> ↑, <i>LGR5</i> ↑	Reguladores de pluripotência, auto-renovação e resistência.
Transição epitélio-mesenquimal (TEM)	<i>ACE2</i> ↓, <i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>CYP3A4</i> ↑, <i>DNASE1L3</i> ↓, <i>ELF5</i> ↓, <i>SFRP4</i> ↓	Indicam plasticidade tumoral, ativação/inibição da TEM.

Fonte: Autor

A caracterização funcional dos módulos *pink*, *blue* e *green* foi feita com base na distribuição de seus genes entre os grupos funcionais (Tabela 4). Mais de 80% dos genes do módulo *pink* apresentaram forte associação com angiogênese, TEM, resistência terapêutica e invasão/metástase. Os genes do módulo *blue* estavam nos grupos de atividade de CAFs, inflamação/imunidade, invasão/metástase, metabolismo/estresse e TEM. Já os genes do módulo *green* apresentaram uma distribuição mais equilibrada, com presença expressiva em praticamente todos os grupos funcionais, especialmente invasão/metástase e resistência terapêutica. O grupo funcional *stemness* apresentou baixa representação geral.

Tabela 4 - Caracterização funcional dos módulos de coexpressão e suas principais funções biológicas.

Módulo	Grupos fortemente associados ao módulo (%)	Resumo Funcional
<i>Pink</i> (13 genes)	Angiogênese (100%), TEM (92%), Resistência terapêutica (92%), Invasão/metástase (85%), Inflamação/imunidade (77%)	Alta associação com plasticidade, evasão e resistência; perfil pró-tumoral agressivo.
<i>Blue</i> (28 genes)	Invasão/metástase (96%), TEM (96%), Inflamação/imunidade (89%), Metabolismo/estresse (86%)	Regulação do microambiente, inflamação adaptativa e invasividade.
<i>Green</i> (69 genes)	Invasão/metástase (74%), Resistência terapêutica (72%), TEM (67%), Inflamação/imunidade (62%)	Multifuncional, presente em quase todos os grupos.

Nota: TEM = transição epitélio-mesenquimal

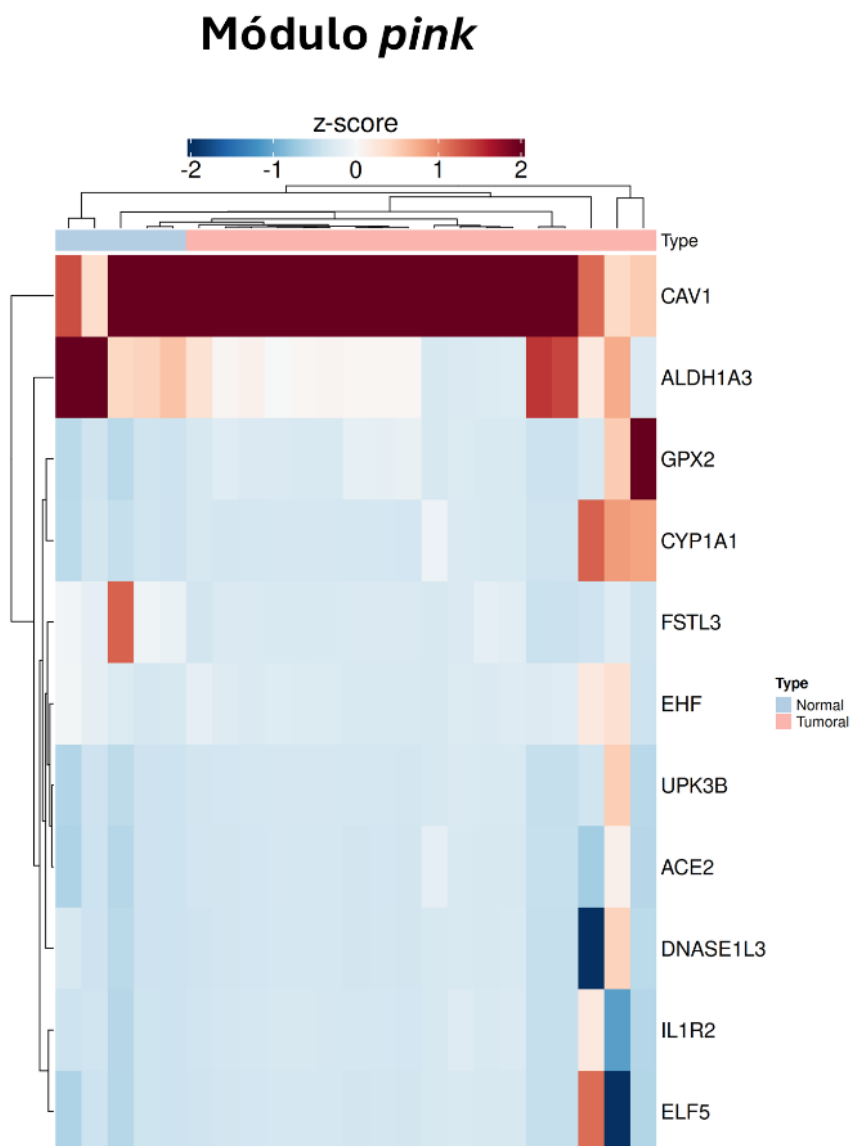
Fonte: Autor

6.1.5 Análise do transcriptoma de linhagens celulares (GEO)

A análise dos dados do GEO revelou diferentes perfis de expressão gênica caracterizando padrões distintos de expressão nos módulos *pink*, *blue* e *green* entre linhagens celulares tumorais e não tumorais de COE (Figuras 16-18). De forma geral, observou-se que os genes do módulo *pink* estavam pouco expressos nas linhagens tumorais em comparação às não tumorais, com destaque para genes como *CAV1*, *EHF* e *ACE2*. Quanto ao módulo *blue*, destacaram-se os genes *IL7R*, *CTSK* e *MFAP5*, com os dois primeiros sendo subexpressos,

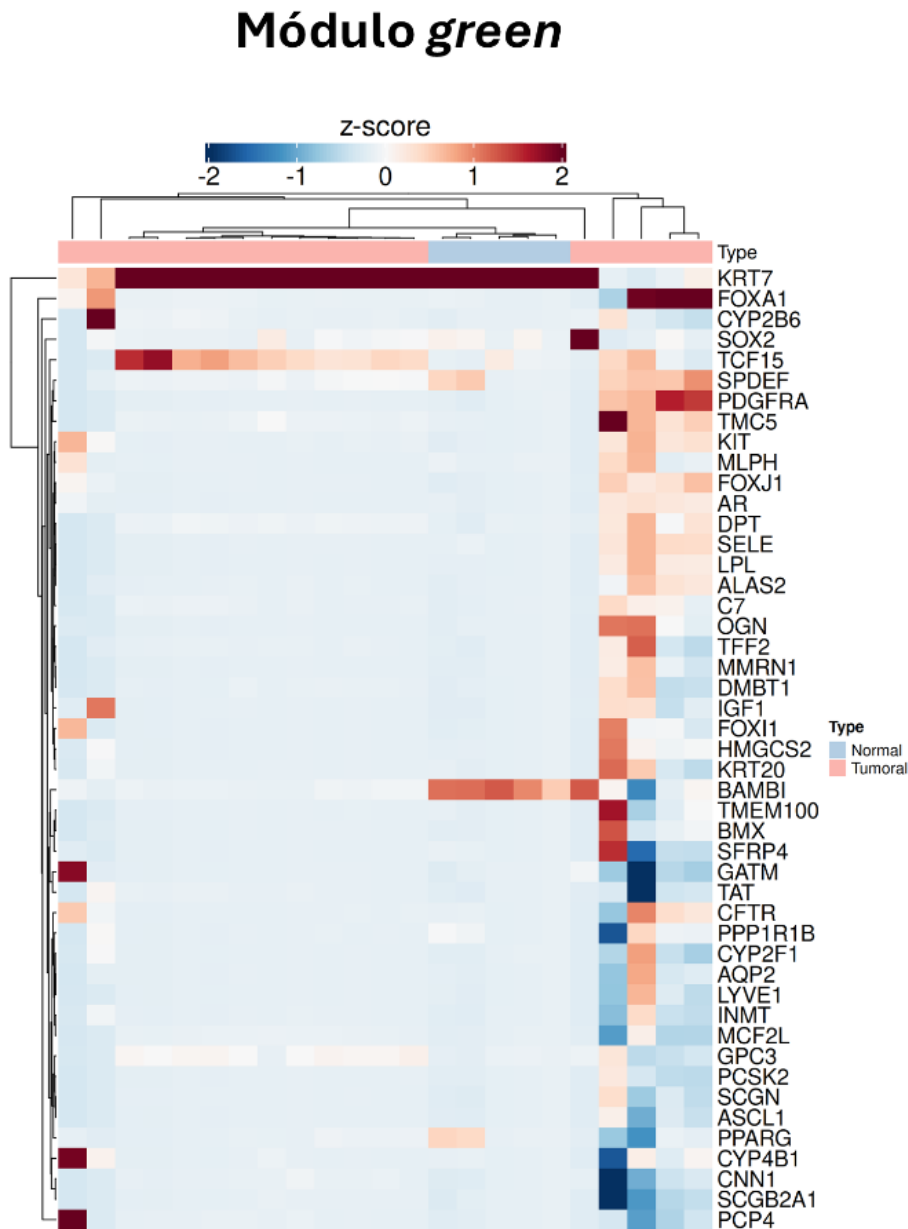
enquanto *MFAP5* foi um dos poucos genes a apresentar superexpressão. Já o módulo *green*, por sua vez, mostrou uma média de expressão gênica global maior nas linhagens tumorais. Genes como *SOX2*, *TMC5* e *MLPH*, relacionados a plasticidade celular, estiveram entre os de maior expressão nesse grupo. Em contrapartida, *CNN1* e *PPARG* estavam subexpressos. Os padrões de expressão observados nestas análises refletem processos biológicos relacionados a perda de diferenciação epitelial, ativação de programas de stemness e supressão de vias imunorregulatórias.

Figura 16 - *Heatmap* demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo *pink* em linhagens celulares tumorais e não tumorais de carcinoma oral de células escamosas (COE), classificadas também por grupos. As colunas representam as diferentes linhagens celulares agrupadas em tumorais e não tumorais, enquanto as linhas mostram os genes de cada módulo e sua expressão nas amostras (Z-score).



Fonte: Autor

Figura 18 - *Heatmap* demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo *green* em linhagens celulares tumorais e não tumorais de COE. As colunas representam as diferentes linhagens celulares agrupadas em tumorais e não tumorais, enquanto as linhas mostram os genes de cada módulo e sua expressão nas amostras (Z-score).



Fonte: Autor

Na análise dos grupos funcionais (Tabela 5), percebe-se que, nas linhagens tumorais, houve predomínio de ausência de expressão ou expressão baixa, com destaque para os genes relacionados aos grupos de angiogênese e inflamação/imunidade, como *IL7R*, *ACE2* e *CTSK*. No entanto, houve aumento de expressão de genes como *SOX2*, parte dos grupos de invasão/metástase, resistência terapêutica e *stemness*. *ALDH1A3*, do grupo de invasão/metástase e *stemness*, também encontrou-se com aumento de expressão. No grupo de

resistência terapêutica, o gene *MFAP5* também teve aumento de expressão, ao contrário de genes como *IL7R* e *EHF*. No grupo de *stemness*, também foi observado aumento de expressão de *TNC*. Os genes *CNN1* e *PPARG*, relacionados a diferenciação epitelial, permaneceram entre os genes com menor expressão. De forma geral, os padrões de expressão funcional evidenciam que a expressão de genes relacionados a sobrevivência, plasticidade e evasão imune, bem como uma menor expressão de genes associados a diferenciação e imunorregulação são características das linhagens tumorais analisadas.

Tabela 5 - Comparação do perfil de expressão gênica entre linhagens tumorais e não tumorais de COE por grupos funcionais.

Grupo funcional	Expressão em linhagens tumorais	Expressão em linhagens não tumorais
Angiogênese	<i>CNN1</i> ↓, <i>CAV1</i> ↓, <i>EHF</i> ↓, <i>MFAP5</i> ↑, <i>TNC</i> ↑	Leve expressão de genes estruturais (<i>CNN1</i> , <i>CTSK</i>)
Atividade de fibroblastos associados ao câncer (CAFs)	<i>PDGFRA</i> ↑, <i>MFAP5</i> ↑, <i>CNN1</i> ↓, <i>IL7R</i> ↓, <i>CAV1</i> ↓	Predomínio de expressão estrutural com fenótipo quiescente
Inflamação/ imunidade	<i>IL7R</i> ↓, <i>ACE2</i> ↓, <i>CTSK</i> ↓	Expressão leve ou ausente de genes imunorreguladores
Invasão/ metástase	<i>SOX2</i> ↑, <i>ALDH1A3</i> ↑, <i>TMC5</i> ↑, <i>CAV1</i> ↓, <i>EHF</i> ↓, <i>CTSK</i> ↓	Ausente
Metabolismo/ estresse	<i>ALDH1A3</i> ↑, <i>MFAP5</i> ↑, <i>TMC5</i> ↑, <i>IL7R</i> ↓, <i>CNN1</i> ↓, <i>CAV1</i> ↓, <i>THY1</i> ↓	Leve ou ausente
Remodelamento da matriz extracelular (MEC)	<i>MFAP5</i> ↑, <i>TMC5</i> ↑, <i>ALDH1A3</i> ↑, <i>CNN1</i> ↓, <i>CAV1</i> ↓, <i>EHF</i> ↓	Leve ou ausente
Resistência terapêutica	<i>SOX2</i> ↑, <i>MFAP5</i> ↑, <i>IL7R</i> ↓, <i>EHF</i> ↓, <i>CAV1</i> ↓	Ausente
<i>Stemness</i> (perfil de células-tronco tumorais)	<i>SOX2</i> ↑, <i>ALDH1A3</i> ↑, <i>TNC</i> ↑, <i>CNN1</i> ↓, <i>PPARG</i> ↓	Ausente
Transição epitélio-mesenquimal (TEM)	<i>SOX2</i> ↑, <i>MFAP5</i> ↑, <i>ACE2</i> ↓, <i>IL7R</i> ↓, <i>CNN1</i> ↓	Perfil epitelial predominante, sem plasticidade celular

Nota: COE = carcinoma oral de células escamosas.

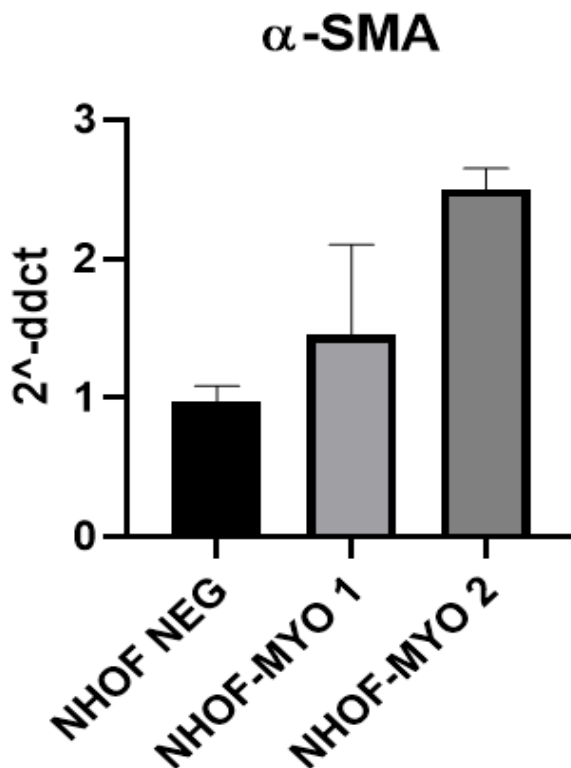
Fonte: Autor

6.2 Ensaios *in vitro*

6.2.1 Obtenção dos perfis de fibroblastos ativados (NHOF-MYO)

Para avaliação da ativação dos fibroblastos NHOF tratados com TGF- β , foi realizada a análise da expressão de α -SMA. A análise por qPCR demonstrou aumento na expressão relativa de α -SMA nas células tratadas (NHOF-MYO), em comparação ao controle não tratado (NHOF NEG) (Figura 19), compatível com o fenótipo de CAF.

Figura 19 - Expressão relativa (*fold change*) de α -SMA em fibroblastos humanos orais normais (NHOF) após ativação com TGF- β . Os NHOFs foram tratados com TGF- β por 72 horas para indução do fenótipo de miofibroblasto (NHOF-MYO). A análise por PCR foi realizada em réplica experimental e triplicata biológica, demonstrando aumento da expressão de α -SMA nas amostras tratadas em comparação ao controle (NHOF NEG).



Fonte: Autor

Nas análises subsequentes, os esferoides obtidos de células tumorais com NHOF-MYO serão referidos como esferoides com CAFs, em referência ao perfil de fibroblasto ativado.

6.2.2 Perfil transcriptômico dos esferoides tumorais obtidos *in vitro*

Padrões diferenciais de expressão dos genes relacionados aos respectivos módulos (conforme análises *in silico*) foram observados nos esferoides dos grupos controle, NHOF e CAF (Figuras 20-22).

De forma geral, os genes do módulo *pink* apresentaram-se subexpressos em esferoides com NHOF, enquanto nos esferoides com CAFs, os transcritos tiveram expressão similar ao grupo controle (esferoides sem fibroblastos). Entre os genes deste módulo, destacaram-se *CAVI*, *CNN1* e *EHF*, com subexpressão acentuada nos esferoides com NHOF. No módulo *blue*, também observou-se mais genes subexpressos nos esferoides cultivados com NHOF. Neste módulo, os genes *MFAP5*, *TNC* e *BASPI*, relacionados às interações entre tumor e estroma, estiveram entre os mais expressos nos esferoides com CAFs. Em contraste, *IL7R*, *CTSK* e *CNN1* estavam subexpressos, principalmente nos grupos NHOF e controle. O módulo *green*, *SOX2* e *TMC5* tiveram aumento de expressão em todos os grupos, com leve destaque no grupo CAF.

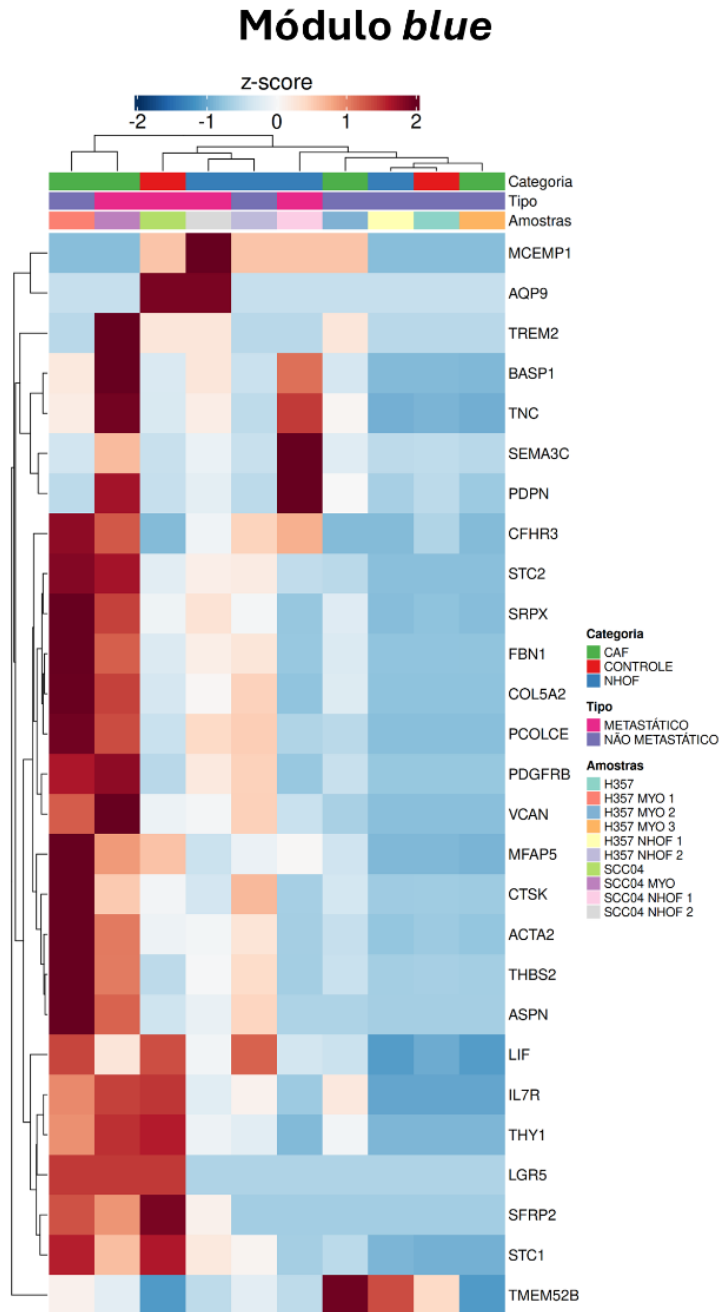
A análise comparando a expressão gênica em relação ao perfil de célula tumoral dos esferoides, metastática (SCC-4) e não metastáticas (H357), revelou que essa classificação permite um agrupamento dos perfis de expressão gênica, evidenciando características das linhagens utilizadas.

Figura 20 - Heatmap demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo *pink* em esferoides tumorais cultivados *in vitro*. As colunas representam as condições experimentais (controle, NHOF e CAF) em linhagens metastáticas (SCC-4) e não metastáticas (H357), enquanto as linhas indicam os genes de cada módulo e seu Z-score de expressão. Quanto ao módulo *pink*, houve menor expressão de genes nos esferoides com NHOF. NHOF = fibroblastos humanos orais normais; CAF = fibroblastos associados ao câncer; MYO = perfil de miofibroblastos.



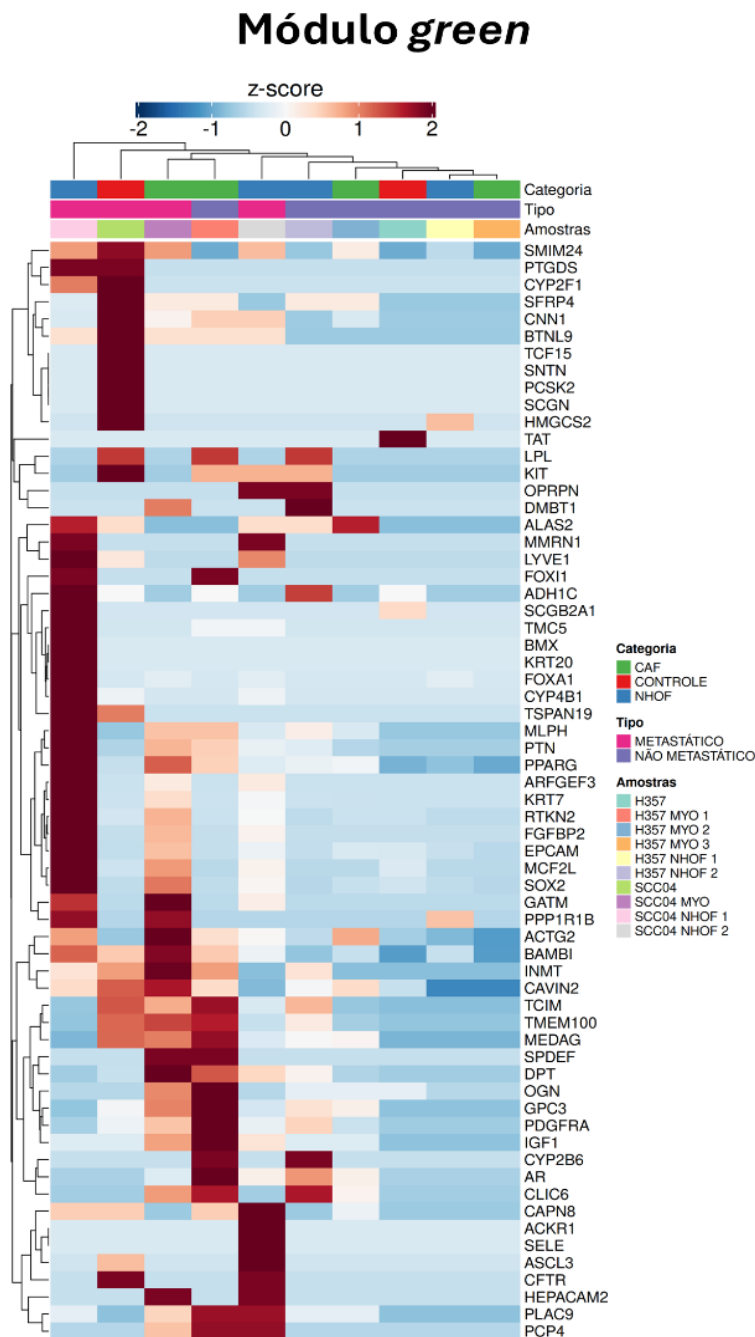
Fonte: Autor

Figura 21 - *Heatmap* demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo *blue* em esferoides tumorais cultivados *in vitro*. As colunas representam as condições experimentais (controle, NHOF e CAF) em linhagens metastáticas (SCC-4) e não metastáticas (H357), enquanto as linhas indicam os genes de cada módulo e seu z-score de expressão. Para os genes do módulo *blue*, observou-se menor expressão gênica nos esferoides NHOF, enquanto no grupo CAF, houve aumento de expressão de alguns genes. NHOF = fibroblastos humanos orais normais; CAF = fibroblastos associados ao câncer; MYO = perfil de miofibroblastos.



Fonte: Autor

Figura 22 - Heatmap demonstrando o perfil de expressão dos genes do módulo *green* em esferoides tumorais cultivados *in vitro*. As colunas representam as condições experimentais (controle, NHOF e CAF) em linhagens metastáticas (SCC-4) e não metastáticas (H357), enquanto as linhas indicam os genes de cada módulo e seu z-score de expressão. A maioria dos genes do módulo *green* apresentaram expressão relativa em todos os grupos, sendo levemente menor nos esferoides NHOF, e mais ausente nos esferoides CAF. NHOF = fibroblastos humanos orais normais; CAF = fibroblastos associados ao câncer; MYO = perfil de miofibroblastos.



Fonte: Autor

A análise dos padrões de expressão dos esferoides conforme grupos funcionais está resumida na Tabela 6. De um modo geral, os esferoides com NHOF apresentaram menor expressão em todos os grupos funcionais. Os esferoides com CAFs apresentaram aumento de

expressão de *STC2*, presente no grupo de remodelamento da MEC, e *BASPI*. Já os genes *CAVI*, relacionado à diferenciação epitelial, e *UPK3B* e *SFTA2* estavam subexpressos. Padrões semelhantes foram encontrados para os genes dos grupos de atividade de CAF, invasão/metástase e TEM. Nos grupos ligados a metabolismo/estresse, resistência terapêutica e *stemness*, a expressão de *STC2* e *BASPI* também foi observada. A distribuição espacial desses padrões de expressão gênica por grupos funcionais nos esferoides pode ser observada na Figura 23.

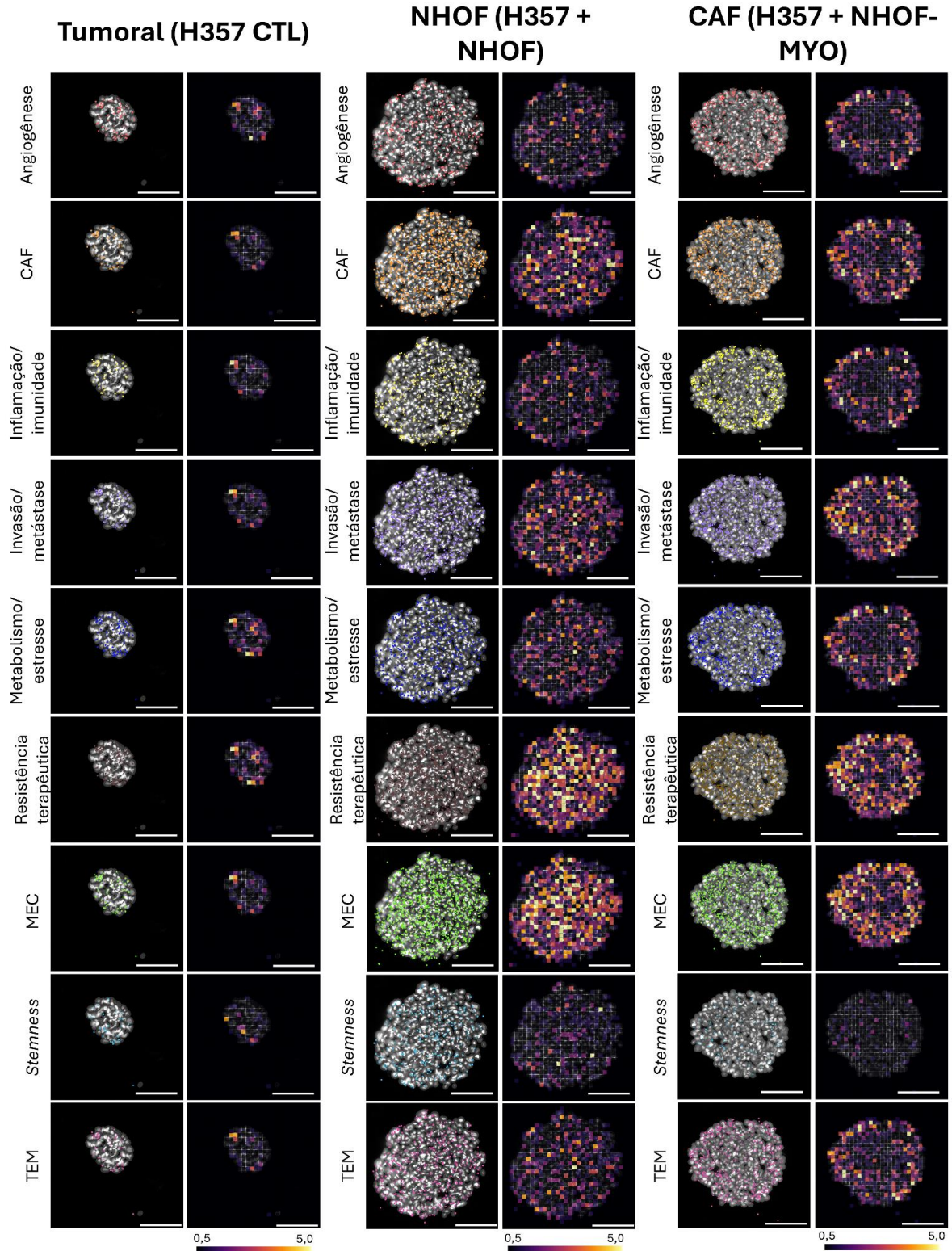
Tabela 6 - Perfil de expressão gênica por grupo funcional em esferoides tumorais cultivados com NHOF ou CAF, destacando os principais genes alterados em cada condição.

Grupo funcional	Esferoides tumorais	Esferoides com NHOF	Esferoides com CAF
Angiogênese	Expressão leve (<i>CAVI</i>)	<i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>BASPI</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓
Atividade de fibroblastos associados ao câncer (CAFs)	Expressão leve	<i>CAVI</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓
Inflamação/ imunidade	<i>STC2</i> e <i>CAVI</i> levemente expressos	<i>STC2</i> ↓, <i>CAVI</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>BASPI</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓
Invasão/ metástase	<i>CAVI</i> presente, <i>UPK3B</i> ↓	<i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>BASPI</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓
Metabolismo/ estresse	Expressão leve (<i>CAVI</i>) a intermediária (<i>STC2</i>)	<i>STC2</i> ↓, <i>CAVI</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓
Remodelamento da matriz extracelular (MEC)	Expressão leve (<i>CAVI</i>)	<i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>UPK3B</i> ↓
Resistência terapêutica	Expressão leve (<i>CAVI</i>) a intermediária (<i>STC2</i>)	<i>STC2</i> ↓, <i>CAVI</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>BASPI</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓
<i>Stemness</i> (perfil de células-tronco)	Expressão leve (<i>CAVI</i>)	<i>CAVI</i> ↓	<i>BASPI</i> ↑
Transição epitélio-mesenquimal (TEM)	<i>SFTA2</i> ↓, expressão epitelial preservada	<i>CAVI</i> ↓, <i>SFTA2</i> ↓	<i>STC2</i> ↑, <i>BASPI</i> ↑, <i>CAVI</i> ↓, <i>SFTA2</i> ↓

Nota: NHOF = fibroblastos humanos orais normais.

Fonte: Autor

Figura 23 - Análise de transcriptômica espacial em esferoides tumorais. Representação por grupos funcionais em três condições experimentais: esferoides de células tumorais (esquerda), esferoides de células tumorais cocultivados com fibroblastos orais normais (NHOF, centro) e esferoides de células tumorais cocultivados com fibroblastos ativado (CAF, direita). Para cada condição, são apresentadas duas colunas: imagens da distribuição espacial dos transcritos (primeira coluna) e densidade de expressão gênica (segunda coluna). As fileiras representam diferentes grupos funcionais. CAF = fibroblastos associados ao câncer. MEC = matriz extracelular. TEM = transição epitélio-mesenquimal. Escala: 100 µm.



Fonte: Autor

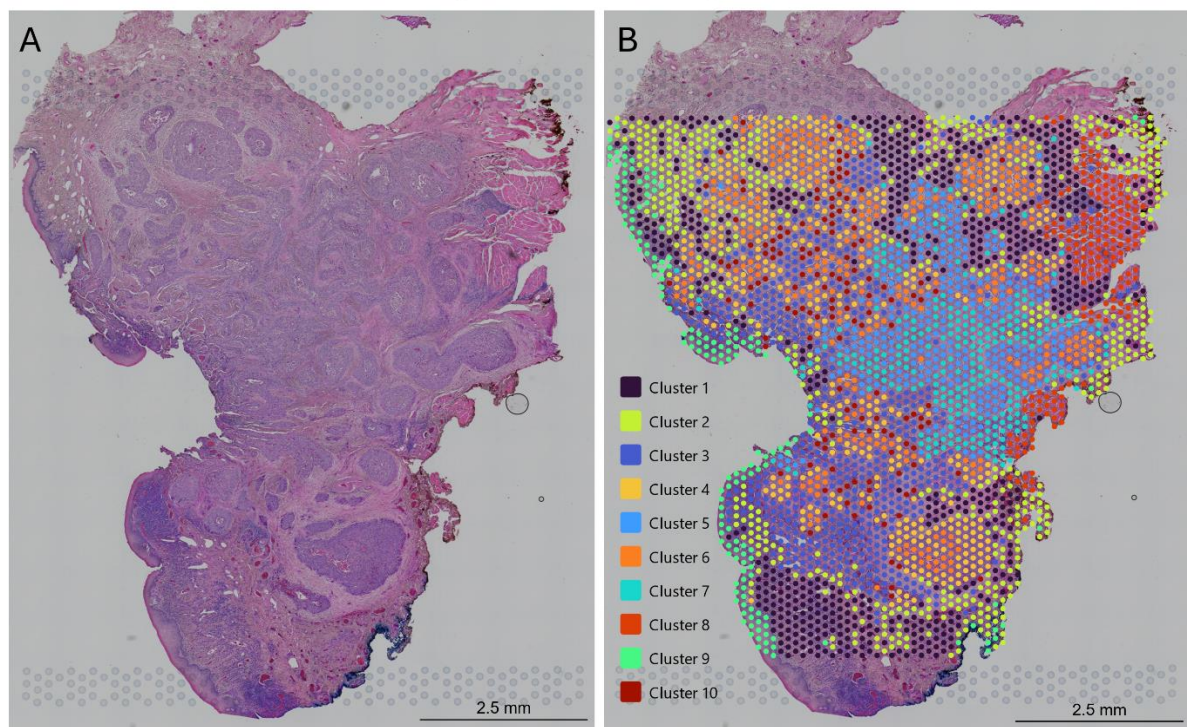
6.3 Análise do caso de COE

6.3.1 Perfil transcriptômico do caso de COE

O caso em destaque representa um COE bem diferenciado. Para análise transcriptômica espacial, foi realizada uma avaliação do *clustering* espacial com o suporte de ferramentas de segmentação espacial, que resultou na identificação de dez agrupamentos com distribuição tecidual distinta (Figura 24). Esses *clusters* foram relacionados às características histológicas observadas. Os *clusters* 1, 2, 3 e 7 estavam associados ao estroma tumoral, com o *cluster* 3 localizado preferencialmente na região de invasão superficial. Os *clusters* 4, 5, 6 e 10 foram relacionados a ilhas e cordões tumorais do *core*. O *cluster* 8 foi predominante na margem mais profunda do tumor e áreas de tecido muscular, e o *cluster* 9 estava distribuído no epitélio de revestimento, o qual encontrava-se displásico. A distribuição espacial e as respectivas características histológicas dos *clusters* identificados estão detalhadas na Tabela.

Figura 24 - Corte histológico acompanhado do mapa de *clusters* espaciais. Análise de segmentação que identificou dez agrupamentos distintos (*clusters* 1-10) com distribuição topográfica específica na amostra. Os *clusters* 1, 2, 3 e 7 correspondem ao estroma tumoral, com o *cluster* 3 localizado no *front* de invasão superficial. Os *clusters* 4, 5, 6 e 10 representam ilhas e cordões tumorais do *core*, com diferentes graus de diferenciação. O *cluster* 8 está associado à margem profunda do tumor, com possível envolvimento muscular, e o *cluster* 9 corresponde ao epitélio de revestimento displásico da margem.

Corte histológico e distribuição dos *clusters*



Fonte: Autor

Tabela 7 - Descrição dos *clusters* identificados na análise de segmentação espacial do caso de COE, destacando sua correspondência com características tumorais e localização.

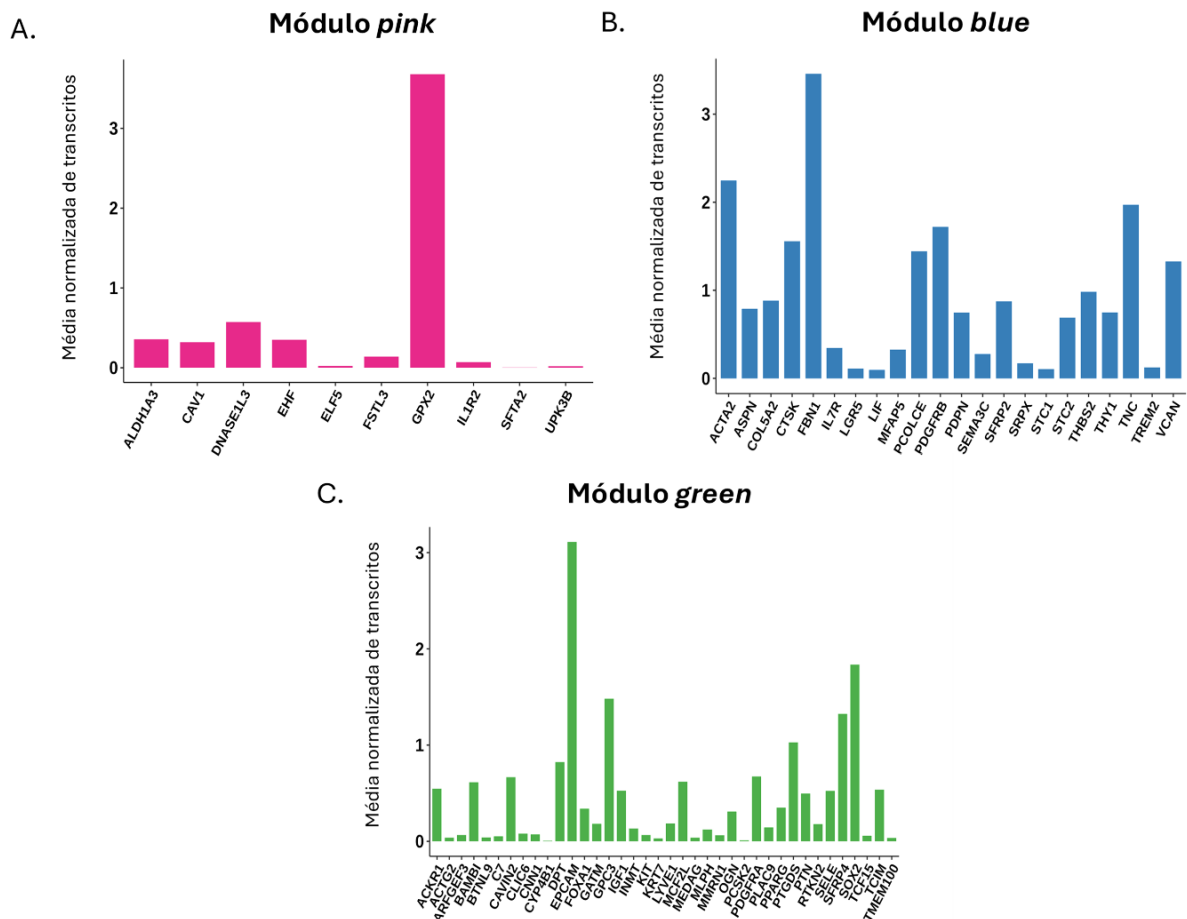
Cluster	Descrição
1	Estroma tumoral
2	Estroma tumoral
3	Estroma tumoral localizado no <i>front</i> de invasão superficial
4	Ilhas tumorais do <i>core</i> do tumor
5	Ilhas tumorais menores ou cordões do <i>core</i> tumoral
6	Ilhas tumorais maiores do <i>core</i> tumoral
7	Estroma do <i>core</i> tumoral
8	Margem profunda, com possível envolvimento de tecido muscular
9	Epitélio de revestimento displásico
10	Grupamentos pequenos ou células tumorais isoladas no <i>core</i> do tumor

Note: COE = carcinoma oral de células escamosas

Fonte: Autor

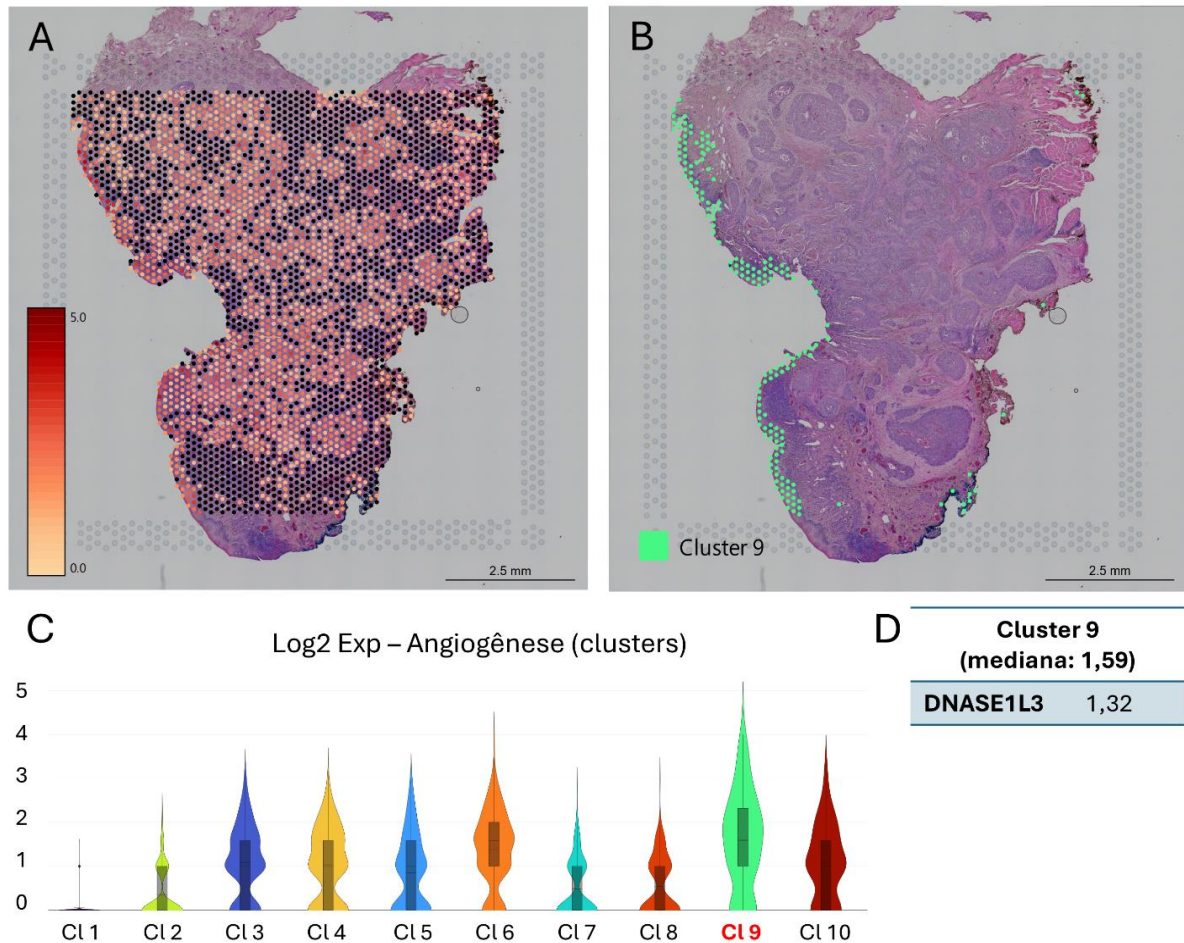
O caso analisado apresentou um perfil de expressão gênica funcionalmente diverso e distribuído de forma espacialmente heterogênea. Considerando-se os módulos de coexpressão, observou-se expressão de transcritos do módulo *pink*, com genes relacionados à sinalização estrutural e ao estresse oxidativo. Genes relacionados ao estroma e imunorregulatórios do módulo *blue* estavam menos expressos. Os genes epiteliais e de pluripotência (módulo *green*) mostraram uma maior variabilidade de expressão na amostra. A Figura 25 representa perfis de expressão dos genes dos diferentes módulos. Considerando os grupos funcionais, destacaram-se regiões tumorais com ativação de vias associadas à invasão/metástase, remodelamento da MEC e resistência terapêutica, demonstrando a heterogeneidade dos compartimentos tumorais.

Figura 25 - Expressão gênica para os módulos funcionais identificados no caso de COE. Os gráficos em barra demonstram os níveis relativos de expressão dos genes pertencentes aos módulos *pink* (A), *blue* (B) e *green* (C). Os destaques de expressão gênica são do gene *GPX2* (módulo *pink*), *FBNI* (módulo *blue*) e *EPCAM* (módulo *green*).



revestimento do caso avaliado (Figura 26). Neste grupo, o destaque foi o gene *DNASE1L3* (log2FC: 1,32).

Figura 26 - Perfil de expressão de genes relacionados à angiogênese. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à angiogênese. B) Identificação da localização tecidual do *cluster* (CL) 9 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao epitélio de revestimento. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



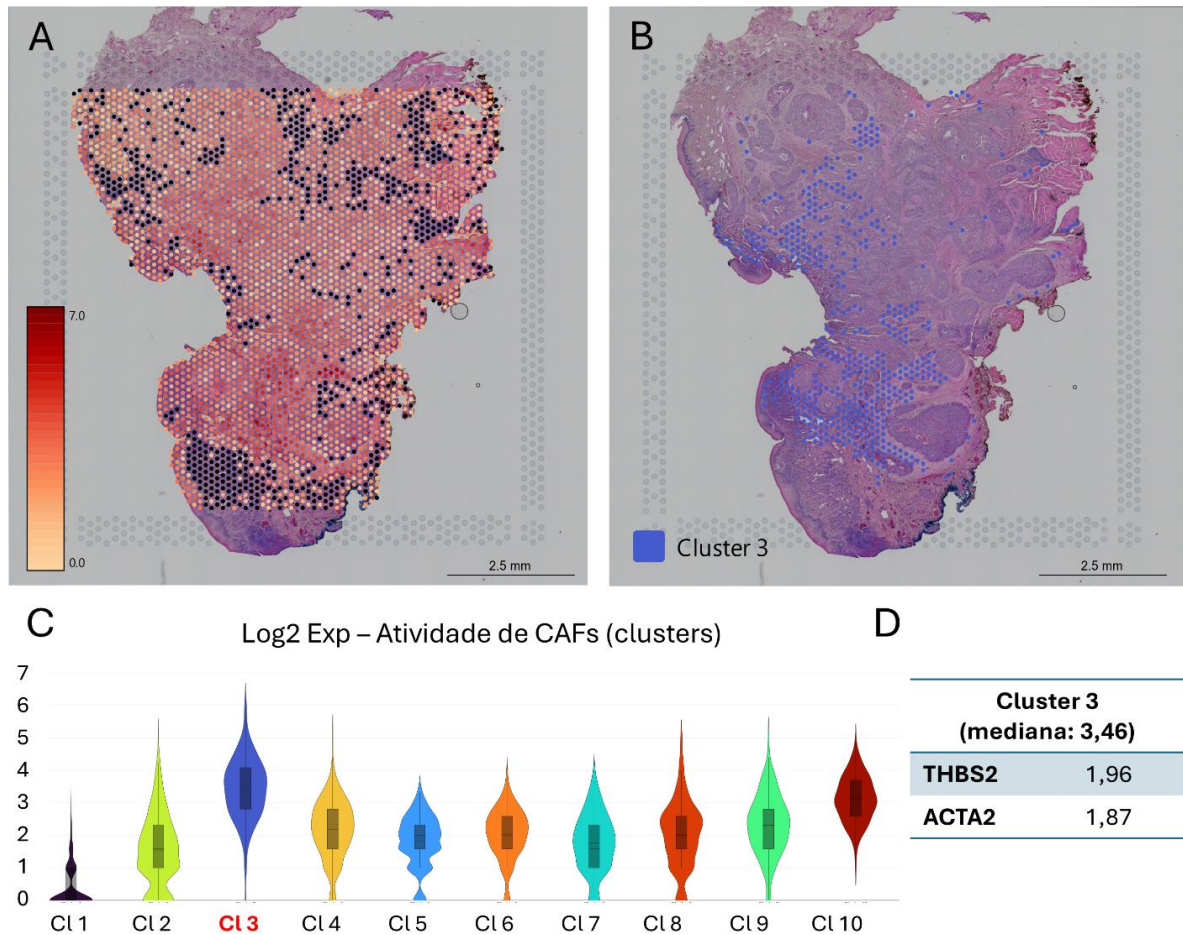
Fonte: Autor

6.3.1.2 Perfil funcional relacionado à atividade de CAFs

Quanto à distribuição dos genes relacionados à atividade de CAFs entre os *clusters*, foi observada alta expressão coletiva dos genes de forma espacialmente relacionada à região do estroma tumoral. Os genes com maior expressão neste grupo funcional foram *ELF5* (log2FC: 3,31 no *cluster* 9), *IL1R2* (log2FC: 2,98 no *cluster* 9), *THBS2* (log2FC: 1,96 no *cluster* 3) e *ACTA2* (log2FC: 1,87 no *cluster* 3). O *cluster* com maior expressão coletiva dos genes avaliados foi o *cluster* 3 (mediana: 3,46), com os genes *THBS2* (log2FC: 1,96) e *ACTA2* (log2FC: 1,87)

se destacando com maior expressão no grupo. Especialmente, o *cluster* 3 representa área estromal localizada no *front* de invasão superficial (Figura 27).

Figura 27 - Perfil de expressão gênica relacionado à atividade de CAFs. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à atividade de CAFs e estroma. B) Identificação da localização tecidual do *cluster* (CL) 3 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao estroma tumoral localizado no *front* de invasão superficial. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



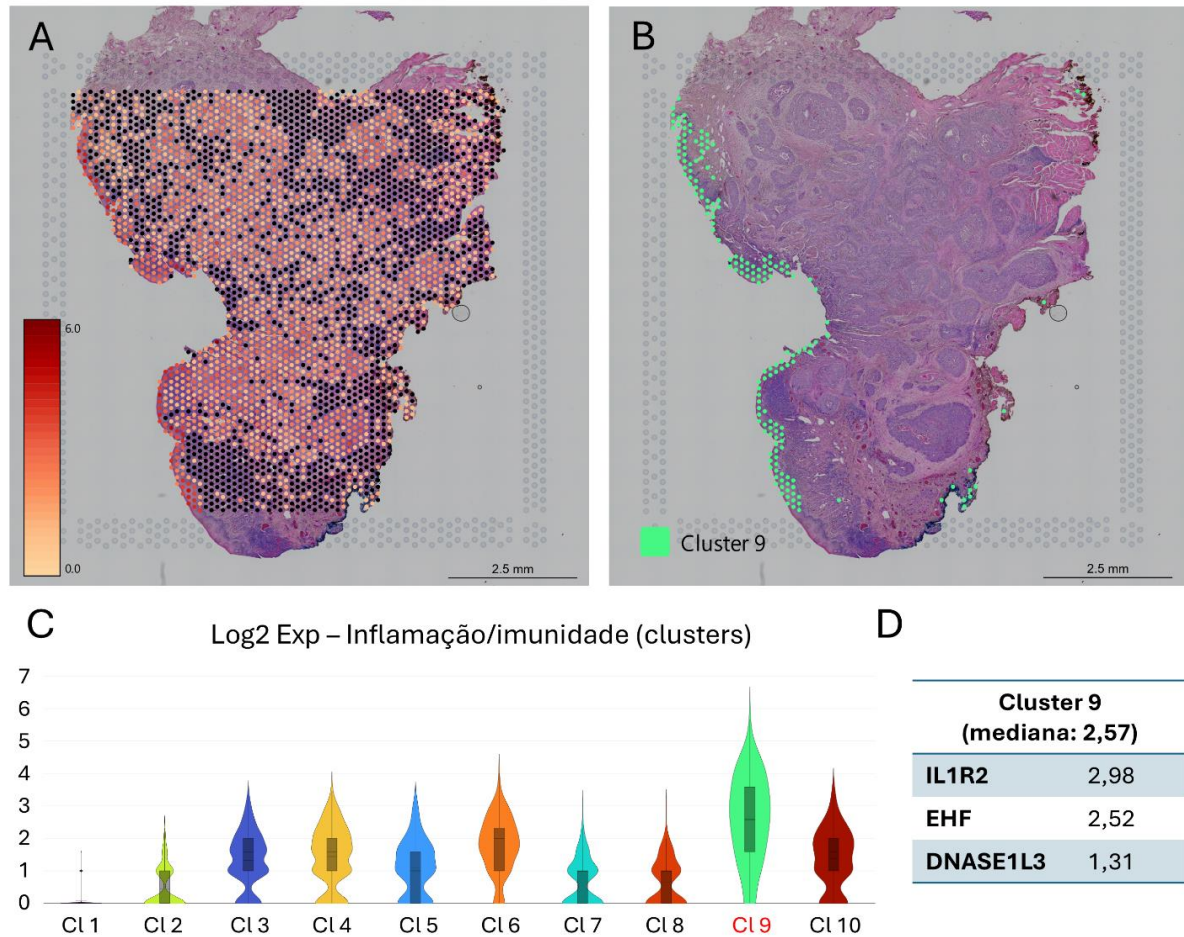
Fonte: Autor

6.3.1.3 Perfil funcional relacionado à inflamação/imunidade

A distribuição dos genes relacionados a este grupo funcional demonstrou um padrão variado entre os *clusters*, sugerindo a ativação localizada de vias inflamatórias e imunes. Dentre os genes de maior expressão, estão o *ACE2* (log2FC: 4,31 no *cluster* 1), *IL1R2* (log2FC: 2,98 no *cluster* 9) e *EHF* (log2FC: 2,52 no *cluster* 9). O *cluster* de maior expressão coletiva dos genes em questão foi o *cluster* 9 (mediana: 2,57), especialmente relacionado ao epitélio de

revestimento (Figura 28). Os genes de maior expressão nesse *cluster* foram *IL1R2* (log2FC: 2,98), *EHF* (log2FC: 2,52) e *DNASE1L3* (log2FC: 1,31).

Figura 28 - Perfil de expressão gênica relacionado à inflamação imunidade. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à inflamação e sinalização imune. B) Identificação da localização tecidual do *cluster* (CL) 9 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao epitélio de revestimento displásico na margem do tumor. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



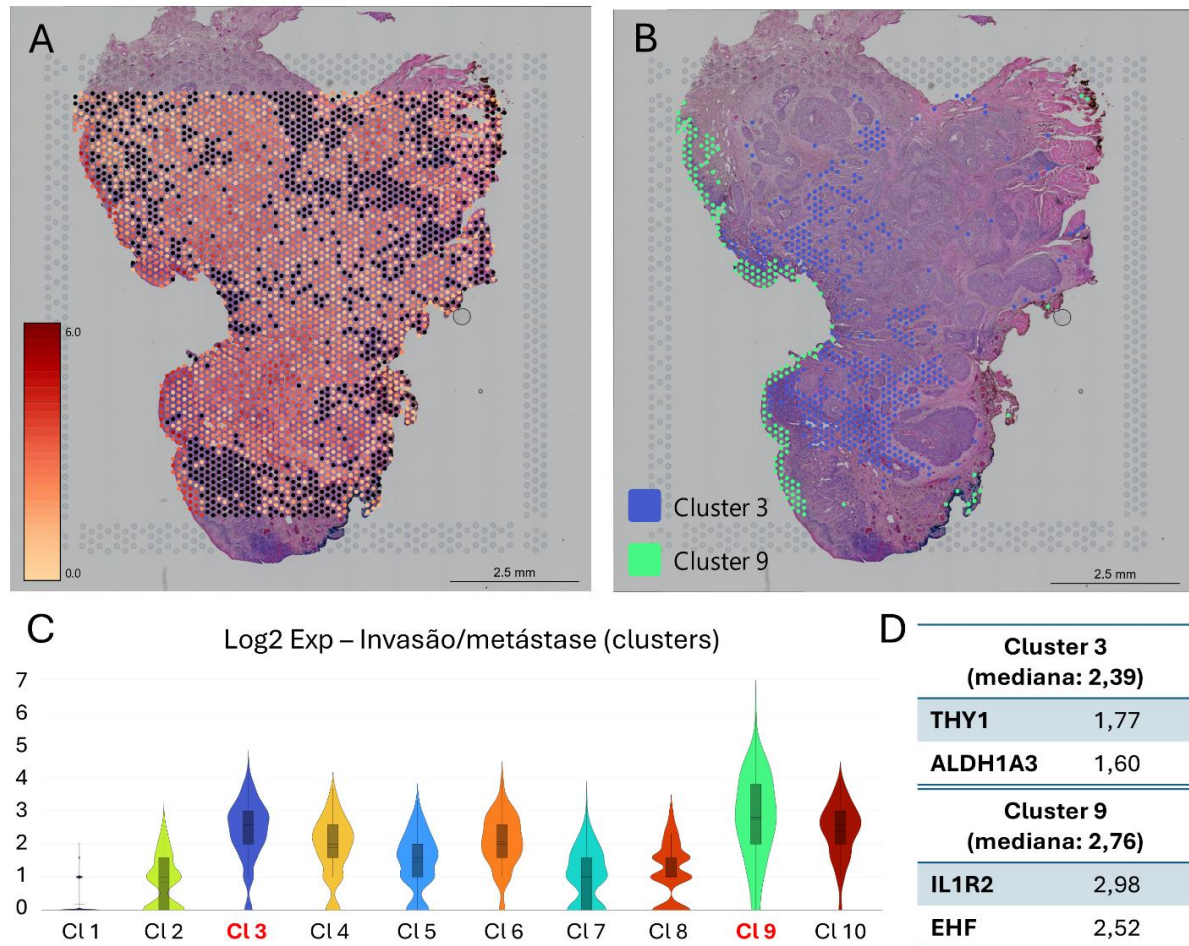
Fonte: Autor

6.3.1.4 Perfil funcional relacionado à invasão/metástase

Quanto à invasão e metástase, observou-se um padrão espacialmente dispersa e heterogênea de expressão dos genes. Os genes de maior expressão estão distribuídos entre os *clusters* de maior expressão. No *cluster* 3 (mediana: 2,39), foi observada maior expressão de *THY1* (log2FC: 1,77) e *ALDH1A3* (log2FC: 1,60). Já no *cluster* 9 (mediana: 2,76), destacam-se os genes *IL1R2* (log2FC: 2,98) e *EHF* (log2FC: 2,52). Ambos os *clusters* estão

potencialmente relacionados à atividade de invasão e metástase tumoral, correspondendo a regiões de estroma localizado no *front* de invasão tumoral (Figura 29).

Figura 29 - Perfil de expressão gênica relacionado à invasão/metástase. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à invasão e metástase. B) Identificação da localização tecidual dos *clusters* (CL) 3 e 9 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao estroma tumoral do front de invasão superficial e ao epitélio de revestimento displásico na margem do tumor, respectivamente. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



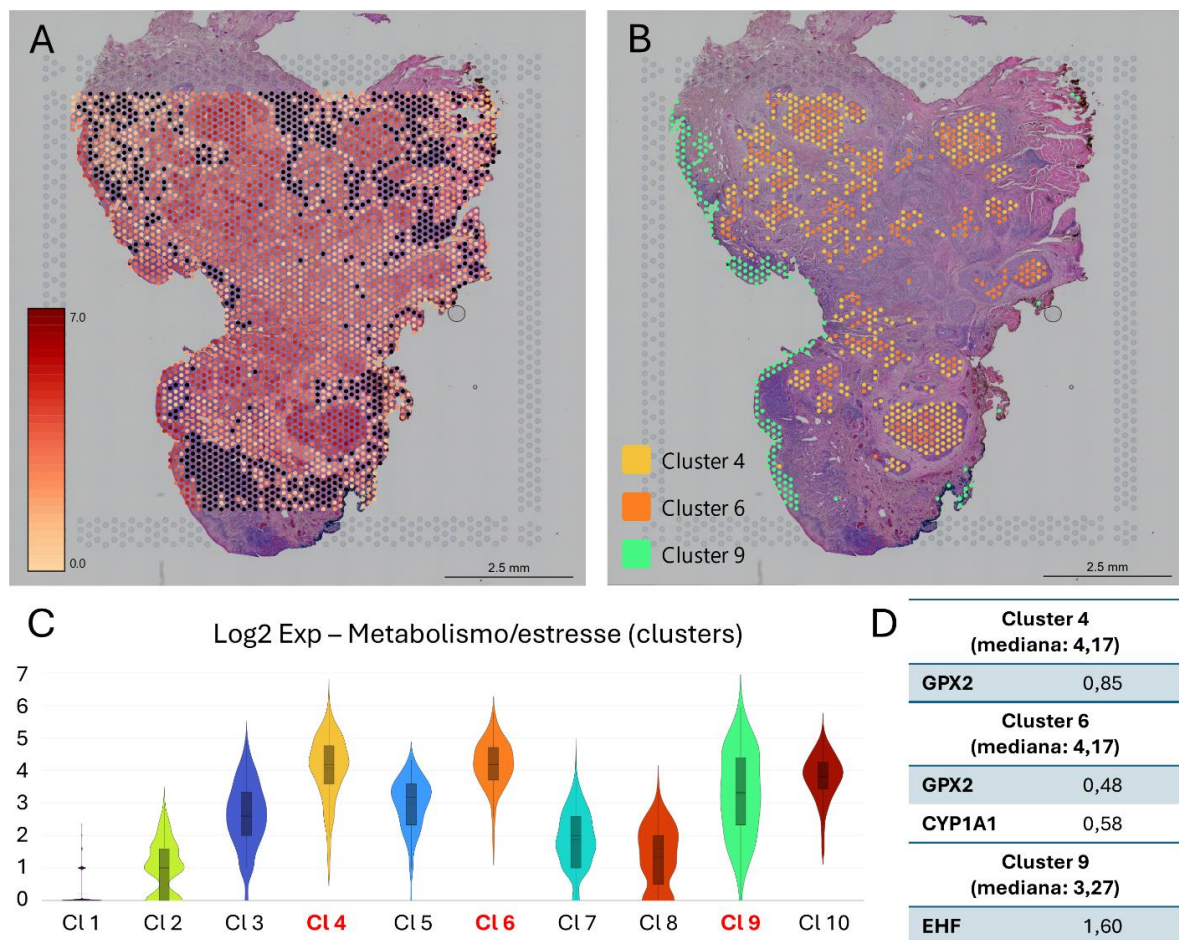
Fonte: Autor

6.3.1.5 Perfil funcional relacionado ao metabolismo/estresse

No grupo funcional de metabolismo/estresse, os genes com maior expressão foram *CYP11A1* (log2FC: 2,74 no *cluster* 2) e *EHF* (log2FC: 2,52 no *cluster* 9). Houve maior expressão gênica nas regiões dos *clusters* 4 (mediana: 4,17) e 6 (mediana: 4,17), correspondentes às ilhas tumorais do *core* do tumor, e o *cluster* 9 (mediana: 3,27), previamente descrito como o epitélio de revestimento displásico na margem tumoral. A combinação desses três *clusters* foi considerada funcionalmente coerente, com destaque para a proximidade espacial dos *clusters* 4

e 6 no core tumoral, sustentando a ideia de uma região de atividade metabólica e de estresse funcional ao longo de diferentes compartimentos do tumor (Figura 30). Nesses *clusters*, os genes de destaque foram *EHF* no *cluster* 9 (log2FC: 1,60), *GPX2* nos *clusters* 4 (log2FC: 0,85) e 6 (log2FC: 0,48), e *CYP11A1* no *cluster* 6 (log2FC: 0,58).

Figura 30 - Perfil de expressão gênica relacionado ao metabolismo/estresse. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados ao metabolismo e estresse celular. B) Identificação da localização tecidual dos *clusters* (CL) 4, 6 e 9 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo às ilhas tumorais do core do tumor, ilhas tumorais maiores e mais diferenciadas, e epitélio de revestimento displásico na margem do tumor, respectivamente. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



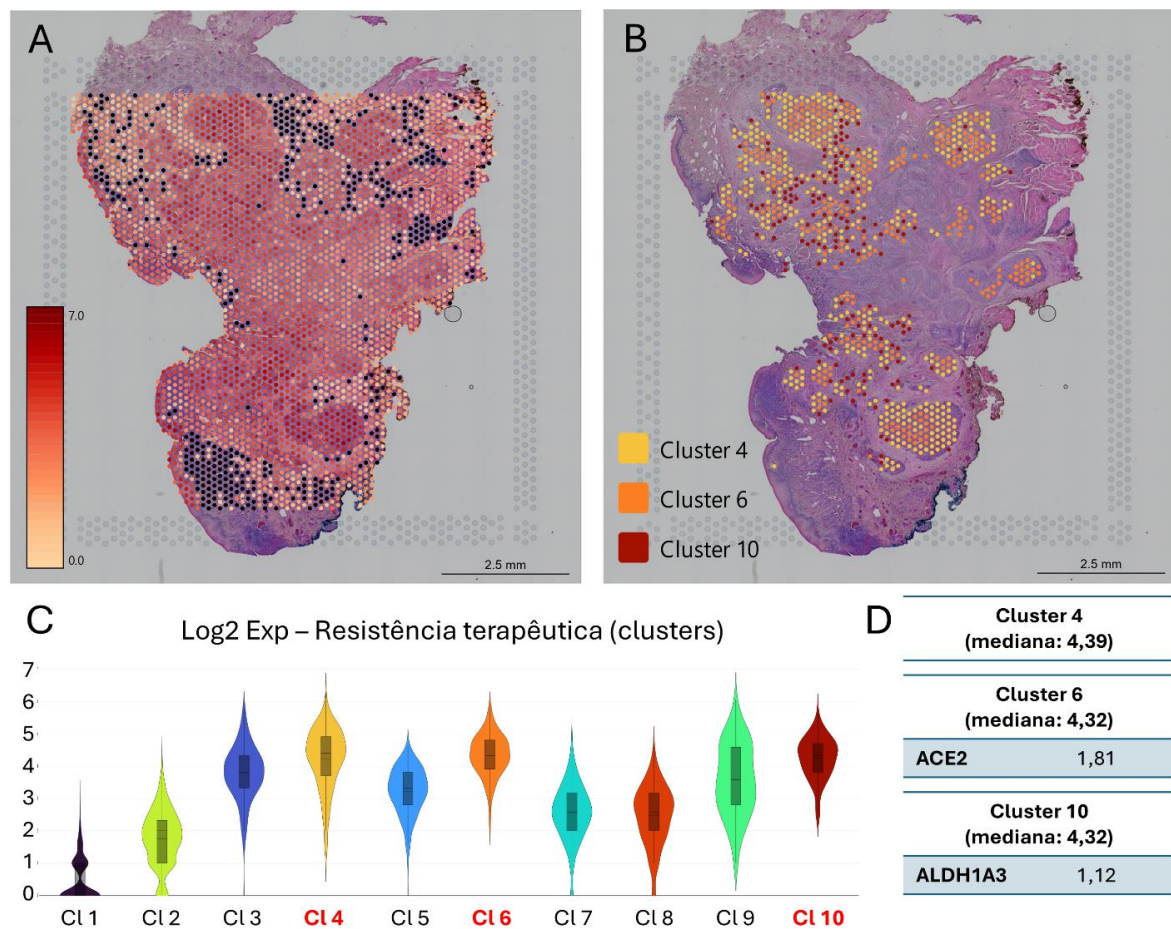
Fonte: Autor

6.3.1.6 Perfil funcional relacionado à resistência terapêutica

A distribuição dos genes relacionados à resistência terapêutica foi avaliada entre os dez *clusters* identificados na análise espacial. Observou-se uma expressão dispersa dos genes do grupo, com destaque para as regiões correspondentes às ilhas tumorais, associadas aos *clusters* 4 (mediana: 4,39), 6 (mediana: 4,32) e 10 (mediana: 4,32). Os três *clusters* encontram-se

especialmente associados no tumor (Figura 31). Para esse grupo funcional, os genes de destaque foram *ACE2* (log2FC: 4,31 no *cluster* 8), *CYP11A1* (log2FC: 2,74 no *cluster* 2) e *EHF* (log2FC: 2,52 no *cluster* 9). Dentre os *clusters* de destaque, os genes com maior expressão foram o *ACE2* (log2FC: 1,81 no *cluster* 6) e *ALDH1A3* (log2FC: 1,12 no *cluster* 10).

Figura 31 - Perfil de expressão gênica relacionado à resistência terapêutica. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à quimiorresistência. B) Identificação da localização tecidual dos *clusters* (CL) 10, 4 e 6 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo às células tumorais isoladas, ilhas tumorais do core do tumor e ilhas tumorais maiores e mais diferenciadas, respectivamente. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



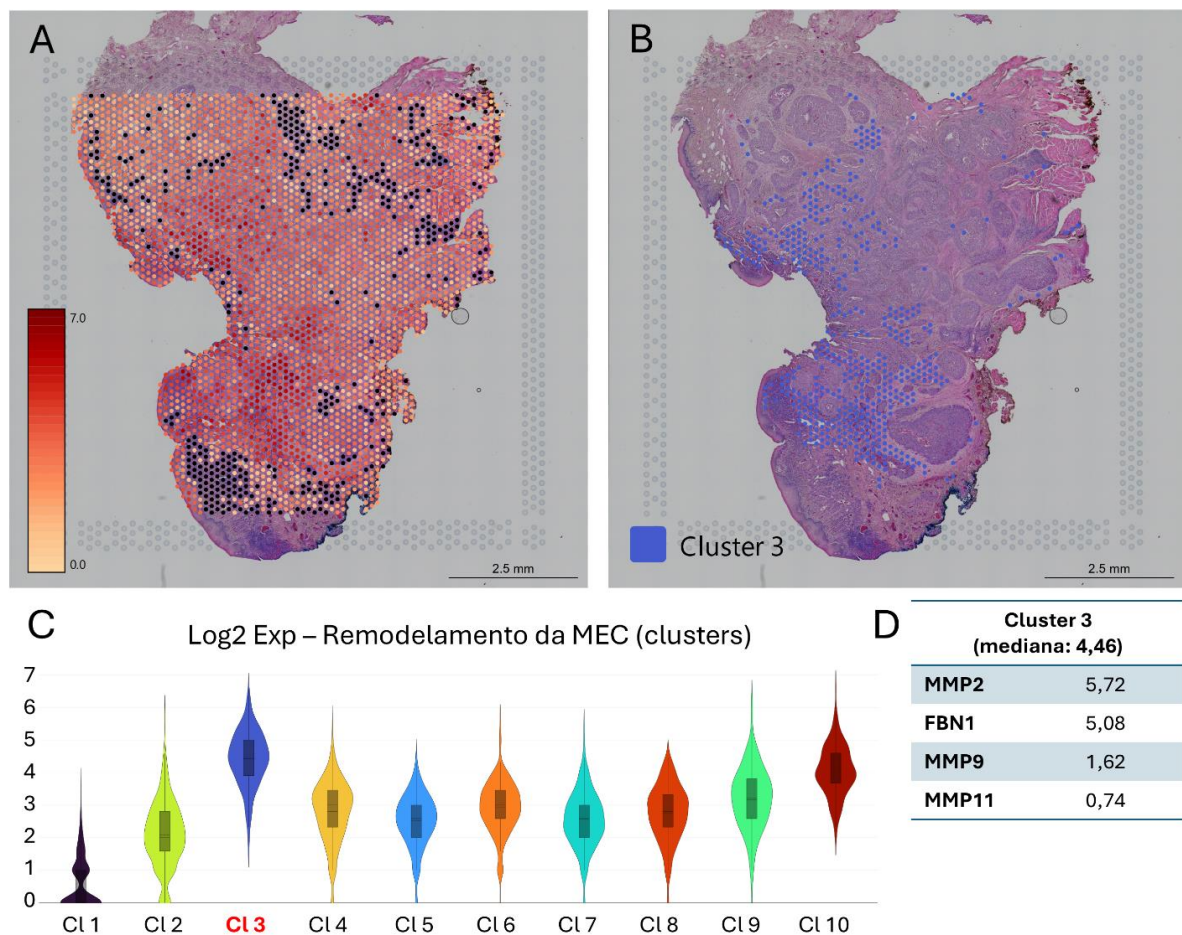
Fonte: Autor

6.3.1.7 Perfil funcional relacionado ao remodelamento da MEC

A expressão gênica espacial relacionada ao processo de remodelamento da MEC foi de expressão generalizada no tecido dentre os *clusters*. Nesse grupo, os genes com maior expressão foram *ELF5* (log2FC: 3,31 no *cluster* 9), *EHF* (log2FC: 2,52 no *cluster* 9) e *MMP2* (log2FC: 2,03 no *cluster* 3). O *cluster* com maior expressão foi o *cluster* 3 (mediana: 4,46), associado ao

estroma do *front* de invasão tumoral (Figura 32). Dentre os genes que se destacam nesse *cluster*, estão o *MMP2* (log2FC: 5,72) e o *FBN1* (log2FC: 5,08). Os genes *MMP9* (log2FC: 1,62) e *MMP11* (log2FC: 0,74) também apresentaram expressão elevada no *cluster* 3 em relação aos demais.

Figura 32 - Perfil de expressão gênica relacionado ao remodelamento da matriz extracelular (MEC). A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados ao remodelamento da MEC. B) Identificação da localização tecidual do *cluster* (CL) 3 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao estroma tumoral do front de invasão superficial. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



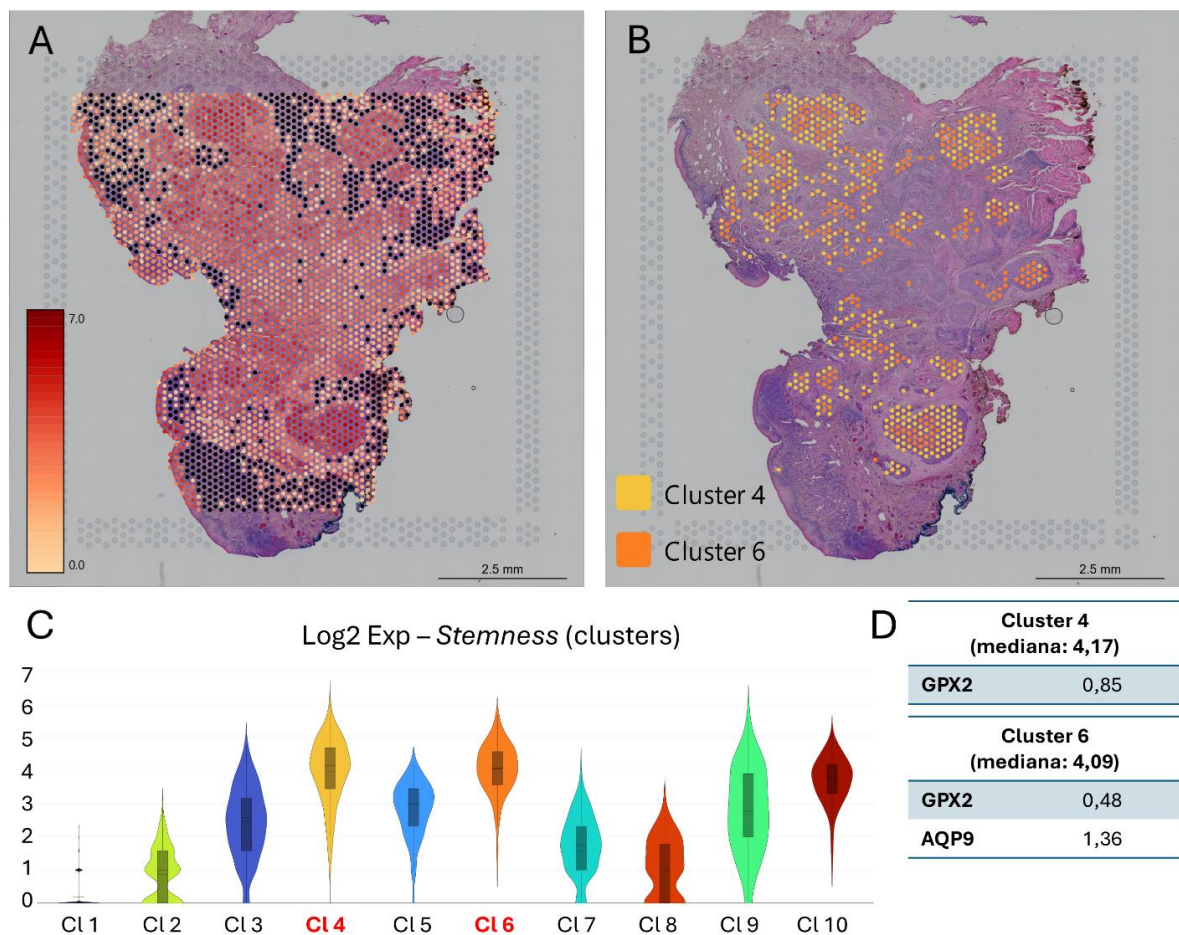
Fonte: Autor

6.3.1.8 Perfil funcional relacionado a *stemness* (perfil de células-tronco)

Quanto ao perfil de *stemness*, a análise espacial da expressão gênica destacou os genes *LGR5* (log2FC: 2,17 no *cluster* 1), *AQP9* (log2FC: 1,99 no *cluster* 1) e *ALDH1A3* (log2FC: 1,6 no *cluster* 3). Especialmente, os *clusters* com maior expressão dos genes associados ao grupo foram os *clusters* 4 (mediana: 4,17) e 6 (mediana: 4,09), correspondentes à região de ilhas

tumorais, possivelmente marcadas pela presença de nichos de células-tronco tumorais (Figura 33). Os genes de destaque nesses *clusters* são o *GPX2* (log2FC: 0,85 no *cluster* 4, log2FC: 0,48 no *cluster* 6) e *AQP9* (log2FC: 1,36 no *cluster* 6).

Figura 33 - Perfil de expressão gênica relacionado à *stemness*. A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à *stemness*. B) Identificação da localização tecidual dos *clusters* (CL) 4 e 6 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo às ilhas tumorais do core do tumor com diferenciação intermediária e mais diferenciadas, respectivamente. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log2FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



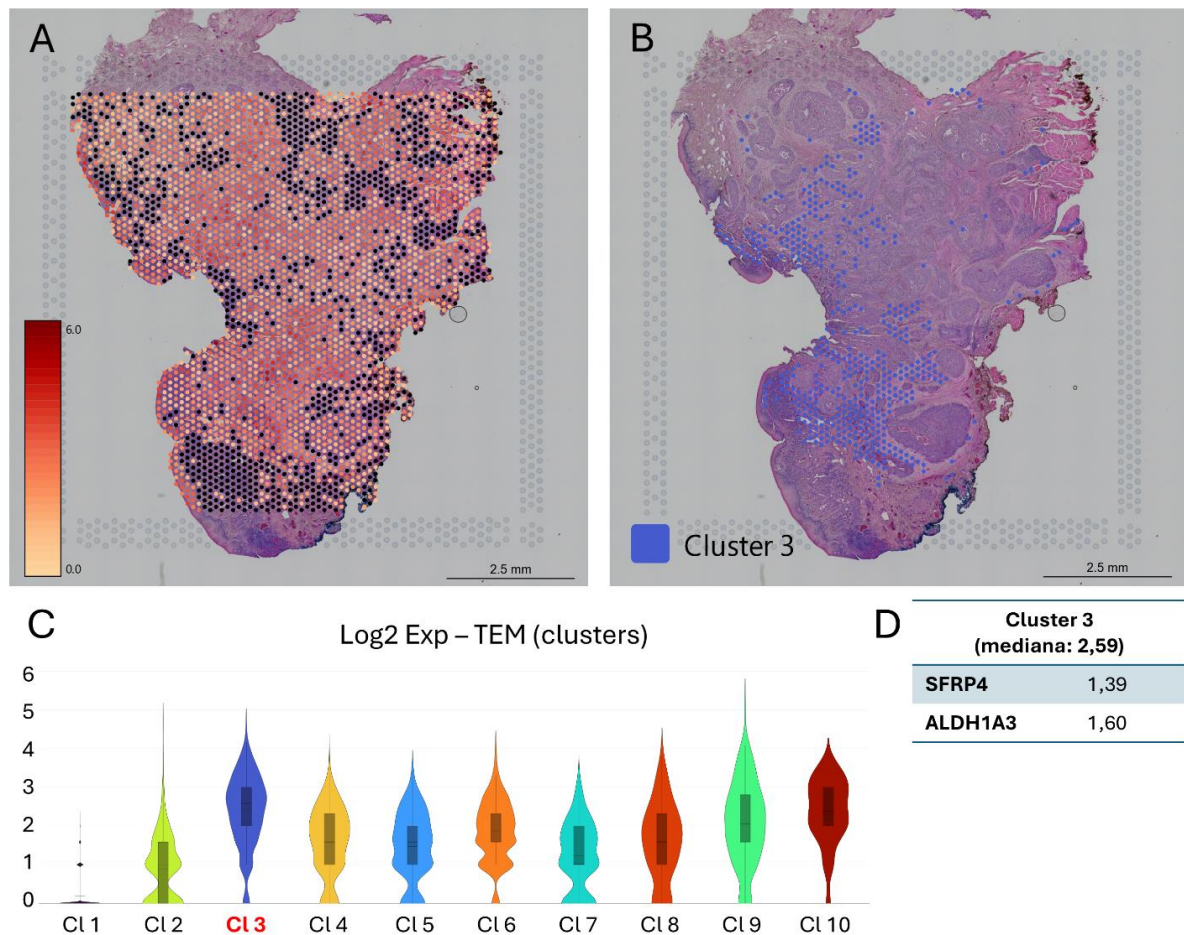
Fonte: Autor

6.3.1.9 Perfil funcional relacionado à TEM

Quanto aos genes relacionados à TEM, sua distribuição espacial foi heterogênea, refletindo a presença de regiões de plasticidade fenotípica no tumor. Os genes com maior expressão foram o *ACE2* (log2FC: 4,31 no *cluster* 8) e *ELF5* (log2FC: 3,31 no *cluster* 9). Considerando todos os genes avaliados nesse grupo, o *cluster* com maior expressão foi o *cluster* 3 (mediana: 2,59), com destaque para os genes *SFRP4* (log2FC: 1,39) e *ALDH1A3* (log2FC:

1,60). A expressão de TEM no *cluster* 3 soma-se à sua já estabelecida relevância para outros processos funcionais — como atividade de CAFs, invasão/metástase e remodelamento de MEC — reforçando a natureza convergente deste nicho estromal na interface tumor-estroma (Figura 34).

Figura 34 - Perfil de expressão gênica relacionado à transição epitélio-mesenquimal (TEM). A) Mapa de expressão gênica demonstrando a distribuição espacial dos genes associados à TEM. B) Identificação da localização tecidual do *cluster* (CL) 3 (de maior expressão do grupo funcional), correspondendo ao estroma tumoral do front de invasão superficial. C) *Violin plots* evidenciando a distribuição diferencial da expressão gênica do grupo funcional entre os *clusters*. D) Log₂FC para os genes com maior expressão nos *clusters* de destaque.



Fonte: Autor

6.3.2 Perfil transcriptômico comparativo entre linhagens, esferoides e caso de COE

A análise comparativa dos três modelos — linhagens celulares, esferoides tumorais e o caso — revelou tanto convergências quanto singularidades nos padrões de expressão gênica. Em termos modulares, os módulos *pink*, *blue* e *green* apresentaram assinaturas funcionais parcialmente sobrepostas, com o módulo *green* destacando-se por sua amplitude de variação

entre os modelos. Genes como *GPX2*, *GPC3*, *SOX2* e *DPT* estavam consistentemente expressos nas amostras, sugerindo sua relevância funcional pleiotrópica; enquanto *CAVI*, *IL7R*, *CNN1* e *EPCAM* apresentaram menor expressão refletindo a heterogeneidade de diferenciação de células tumorais e evasão imunológica

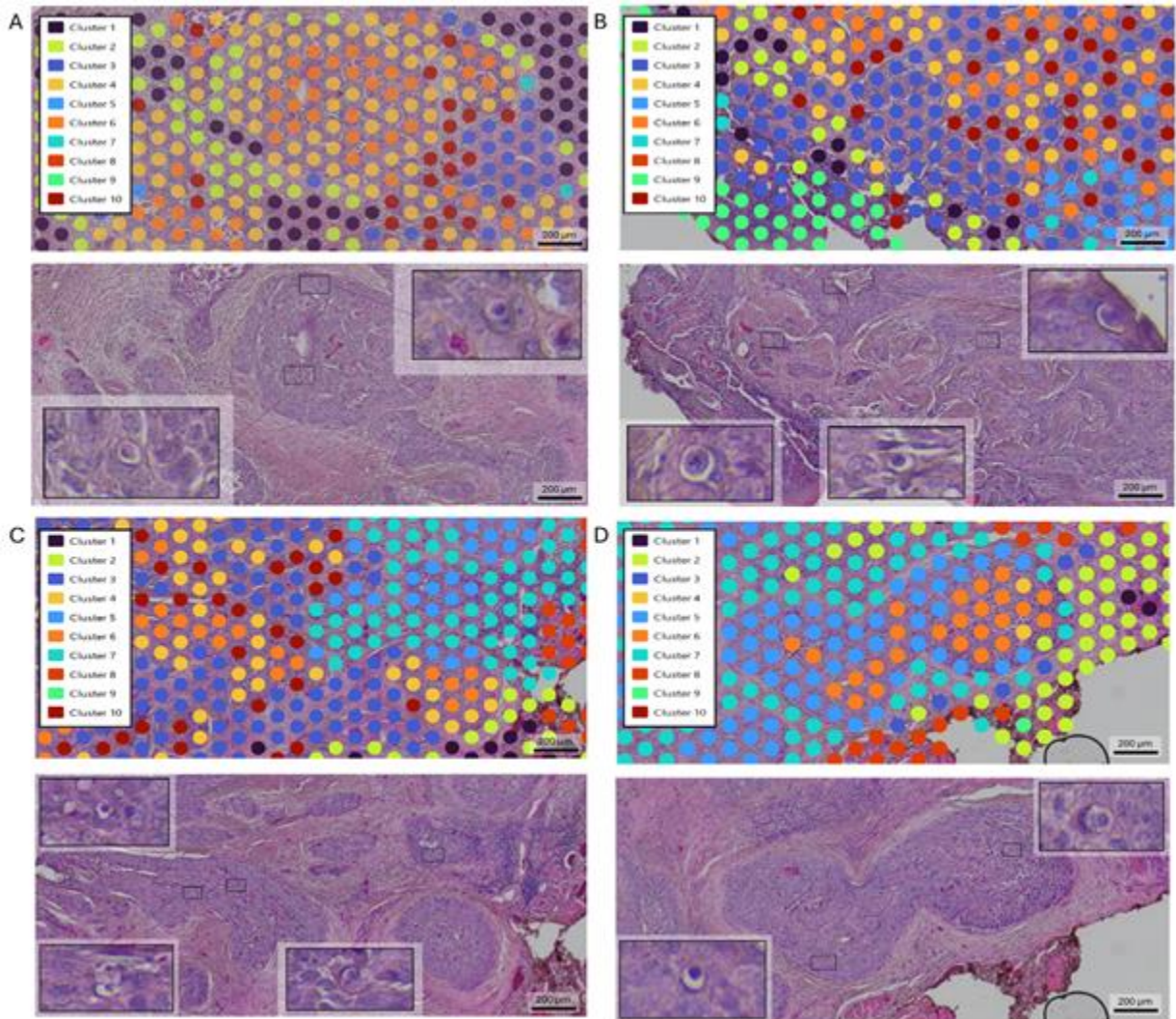
Em nível dos grupos funcionais estabelecidos no estudo, os esferoides com CAFs demonstraram uma maior semelhança com o tumor propriamente dito (caso de COE) especialmente nos grupos de atividade de CAF, remodelamento da MEC e resistência terapêutica, ressaltando seu valor como modelo intermediário. Já nas linhagens celulares, o padrão de expressão foi menos variável, com pouca expressão de genes relacionados a interações entre o tumor e o microambiente.

Uma maior variabilidade e heterogeneidade funcional e espacial foi observada no caso de COE, com nichos celulares especializados com diferentes assinaturas funcionais, como modelagem do estroma (*cluster 3*), células-tronco tumorais (*clusters 4 e 6*) e resistência tumoral (*clusters 10 e 4*).

6.3.3 Avaliação das estruturas CIC no COE

Para avaliar a presença de estruturas CIC no caso de COE analisado, foi realizada um rastreamento morfológico manual de todo o corte histológico. A identificação das estruturas CIC baseou-se na sua morfologia clássica descrita na literatura (Siquara da Rocha *et al.*, 2022; Wang, Xinlong *et al.*, 2019), caracterizada por um aspecto semelhante a um "olho de pássaro" ou "anel de sinete": uma célula com núcleo arredondado, localizada dentro de outra célula maior, cujo núcleo possui formato semilunar e encontra-se deslocado para a periferia. As estruturas CIC foram observadas predominantemente em regiões de ilhas tumorais, embora também tenham sido encontradas, em menor frequência, em regiões do estroma tumoral (Figura 35).

Figura 35 - Localização de estruturas *cell-in-cell* (CIC) no caso de carcinoma oral de células escamosas (COE). Análise exploratória e qualitativa identificando estruturas CIC em diferentes regiões do tumor (A-D). Em cada painel, são apresentados os *clusters* espaciais correspondentes e o corte histológico com destaque para as estruturas CIC identificadas no detalhe.



Fonte: Autor

Ao relacionar a distribuição espacial das estruturas CIC com os *clusters* previamente mapeados, observou-se uma colocalização predominante com os *clusters* 4, 5 e 6, que correspondem às ilhas tumorais do *core* do tumor. Uma frequência menor de estruturas CIC foi identificada nos *clusters* 3 (estroma tumoral do *front* de invasão superficial) e 7 (estroma do *core* tumoral), sugerindo uma possível preferência dessas estruturas por nichos tumorais específicos. Nos *clusters* 4, 5 e 6, a análise dos grupos funcionais (item 6.3.1) revelou maior atividade de metabolismo/estresse, resistência terapêutica e *stemness*. Os transcritos identificados nos respectivos *clusters* de maior frequência de CIC podem ser conferidos na tabela 8.

Tabela 8 - Valores de expressão (log2FC) dos transcritos dos *clusters* com CIC.

Gene	Cluster de destaque	Log2FC
<i>PTN</i>	<i>Cluster 5</i>	0,13
<i>GPX2</i>	<i>Cluster 4</i>	0,85
<i>ELF5</i>	<i>Cluster 6</i>	0,16
<i>AQP9</i>	<i>Cluster 6</i>	1,36
<i>CYP11A1</i>	<i>Cluster 5</i>	1,12
<i>ACE2</i>	<i>Cluster 6</i>	1,81

CIC = célula-em-célula (*cell-in-cell*); Log2FC = Variação logarítmica da expressão gênica (*log2 fold change*).

Fonte: Autor

7 DISCUSSÃO

O COE é caracterizado por um microambiente heterogêneo que influencia a sua progressão e resistência terapêutica, sendo composto por diversos componentes celulares, dentre os quais os CAFs se destacam por desempenhar um papel crítico, especialmente nas interações com as células tumorais (Arebro *et al.*, 2023; Bienkowska; Hanley; Thomas, 2021). Sabe-se que os CAFs participam do remodelamento da MEC, da adesão celular, da promoção da TEM e de outros processos essenciais para a invasão e metástase, através da produção de citocinas, quimiocinas e fatores pró-tumorais que estimulam a angiogênese, invasão, plasticidade tumoral e resistência às terapias (Ahuja; Sureka; Zaheer, 2024; Hu *et al.*, 2023). No entanto, a diversidade fenotípica e funcional dos CAFs representa um desafio para uma melhor compreensão da biologia tumoral e, conseqüentemente, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e/ou identificação de marcadores preditivos e/ou prognóstico (Arebro *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2023).

A presença de estruturas CIC no COE acrescenta uma camada adicional de complexidade, indicando interações celulares dinâmicas que podem contribuir para a sobrevivência das células tumorais e mecanismos de invasão e resistência (Okuyama *et al.*, 2023). Desta forma, tanto os CAFs quanto as estruturas CIC emergem como componentes importantes do microambiente tumoral, respondendo a estresses como hipóxia e privação nutricional (Dourado *et al.*, 2019; Shrivastava *et al.*, 2023; Siddiqui *et al.*, 2019; Siquara da Rocha *et al.*, 2023; Wang, Ruizhi *et al.*, 2023; Wang, Xu *et al.*, 2021). O papel das estruturas CIC no câncer permanece pouco explorado, com terminologia pouco definida e implicações incertas no comportamento, prognóstico e tratamento (Siquara da Rocha *et al.*, 2022). Além disso, ainda não se sabe sobre a influência de CAFs na formação de estruturas CIC, particularmente no contexto do COE (Siquara da Rocha *et al.*, 2023; Wang, Xinlong *et al.*, 2019). Diante dessas lacunas, este trabalho teve como objetivo investigar a influência dos CAFs na expressão dos transcritos tumorais relacionados à adesão celular, remodelação tecidual, plasticidade tumoral e formação de estruturas CIC no COE.

Neste trabalho, realizamos o estudo do perfil transcriptômico do COE, combinando análises *in silico*, modelos tridimensionais *in vitro* e validação em tecido humano. Identificamos três módulos principais de coexpressão gênica (*pink*, *blue* e *green*), cujos genes foram organizados em grupos funcionais relacionados a processos críticos no câncer, como invasão/metástase, remodelamento da MEC e TEM. As análises comparativas - dados *in silico* de linhagens celulares, esferoides e estudo de caso - demonstraram perfis distintos de expressão

gênica, ratificando a importância do microambiente na heterogeneidade funcional deste tumor. Em relação à análise das estruturas CIC, estas estavam relacionadas a diferentes perfis funcionais do tumor, com destaque para resistência terapêutica e *stemness*, corroborando para o envolvimento das mesmas na plasticidade celular e pior prognóstico, conforme já demonstrado na literatura (Tonnessen-Murray *et al.*, 2019).

Embora um número crescente de marcadores moleculares tenha sido identificado em COE, a maioria ainda carece de validação clínica robusta e, portanto, não são usados na prática clínica (Blatt *et al.*, 2017; Khan, Kahkashan *et al.*, 2024; Navale *et al.*, 2024; Pekarek *et al.*, 2023). Neste estudo, buscamos localizar transcritos tumorais relevantes no COE. Inicialmente, foram selecionados 247 genes com alta variabilidade de expressão compatíveis com o painel inventariado Multi-Tissue/Cancer (Xenium). Esses genes foram organizados em três módulos principais de coexpressão: *pink*, *blue* e *green*. A partir da caracterização funcional desses módulos, os genes foram agrupados em nove categorias funcionais principais: angiogênese, atividade de CAFs, inflamação/imunidade, invasão/metástase, metabolismo/estresse, remodelamento da MEC, resistência terapêutica, *stemness* e TEM.

A caracterização funcional dos módulos revelou que o módulo *pink* estava associado aos processos de inflamação, remodelamento tecidual, resistência terapêutica e TEM. No módulo *blue*, foram encontrados genes vinculados ao remodelamento da MEC, interação entre tumor e estroma, ativação de vias inflamatórias e de pluripotência, compondo um eixo funcional relacionado à invasão. Por sua vez, o módulo *green* exibiu um painel de genes que participam do metabolismo tumoral, estresse, plasticidade celular, *stemness* e à resistência terapêutica. Dos genes identificados, vários já foram validados em outros tipos de câncer, mas ainda são pouco explorados no contexto do COE. Entre eles, destacaram-se *ASPN* e *MFAP5*, associados à invasão tumoral e remodelamento da MEC (Huang, Chengqun *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2020); *IL7R*, relacionado à imunossupressão (Schreiber *et al.*, 2019); e *GPX2* e *CYP3A4*, implicados na resistência terapêutica e no metabolismo tumoral (Jehl *et al.*, 2023; Patel, Jignesh; Mitra, 2001). Esses achados reforçam a importância de análises de *medium* e *high-throughput* na identificação de marcadores moleculares que podem ser estudados como potenciais alvos terapêuticos e de prognóstico em COE.

Na avaliação *in silico* do perfil transcriptômico de linhagens disponíveis em bancos de dados foi observada uma menor expressão de genes estruturais, ou seja, que codificam proteínas com funções específicas e diretas na estrutura e funcionamento das células (ex: transporte, proteínas estruturais etc.), imunológicos e de diferenciação celular. Observou-se uma maior expressão de *SOX2*, associado à plasticidade, invasão e manutenção de *stemness* (Dey *et al.*,

2022); *MFAP5* e *TMC5*, relacionados ao remodelamento da MEC (Duan *et al.*, 2023; Zhang, Hui *et al.*, 2022); e *ALDH1A3*, implicado no metabolismo celular e resistência (Crocker *et al.*, 2017; Lavudi *et al.*, 2024). Além disso, a baixa expressão de genes como *CNN1*, *IL7R*, *CAVI*, *CTSK* e *EHF* corrobora para a perda de mecanismos relacionados a diferenciação celular, evasão imune e plasticidade (Barata; Durum; Seddon, 2019; Campos *et al.*, 2019; Gao, Lei *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022; Zhang, Zheng *et al.*, 2022).

Apesar de serem amplamente utilizadas e fornecerem *insights* relevantes sobre características de células tumorais, as linhagens celulares apresentam limitações para a compreensão da biologia do COE. Sabe-se que as interações das células do tumor com o microambiente é relevante para modulação de expressão gênica e que esse microambiente possui diversos componentes: fibroblastos, células imunes (Flores Molina *et al.*, 2020), MEC (Doyle; Nazari; Yamada, 2022; Runa *et al.*, 2017) e elementos físicos como tensão de oxigênio e vasos sanguíneos (Baghban *et al.*, 2020; Runa *et al.*, 2017). Estes aspectos demonstram que os modelos bidimensionais tradicionais de células aderidas em superfície plástica representam pouco a complexidade tumoral. Estudos recentes reforçam essa limitação, destacando que bancos de dados online de linhagens, embora valiosos, não capturam a complexidade do câncer (Dumont *et al.*, 2016; Mirabelli; Coppola; Salvatore, 2019; Thomas *et al.*, 2025; Zhu, Qionghua *et al.*, 2023).

Nesse contexto, modelos que reproduzem a arquitetura e as interações celulares do tumor são desejáveis para o estudo do câncer, trazendo uma melhor representação da complexidade funcional (Unnikrishnan; Thomas; Kumar, 2021). Neste trabalho, o modelo de esferoides tumorais foi utilizado para compreender e comparar a influência de NHOFs e CAFs na expressão dos transcritos. Os esferoides com CAFs tiveram expressão de genes da TEM, como *STC2* (Chen, Bing *et al.*, 2016; Lin, Chen *et al.*, 2019) e associados à ativação de vias de estresse (Qie *et al.*, 2024), enquanto houve aumento de *BASPI*, relacionada a uma maior comunicação e plasticidade celular (Jaikumarr Ram *et al.*, 2020; Lin, Ching-Chan *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2023), com perda das características epiteliais (Wang, Xin *et al.*, 2021), facilitando processos de invasão e remodelamento da MEC.

Diferenças no padrão de expressão entre esferoides com NHOF e com CAF foram observadas. Em destaque, a diferença de expressão de *CAVI* e *UPK3B*, relacionados a adesão celular (Kanamori-Katayama *et al.*, 2011; Ketteler; Klein, 2018; Simón *et al.*, 2020). Esses mesmos genes foram menos expressos nos esferoides com CAFs em relação aos NHOFs, corroborando o papel destas células no aumento da motilidade celular (Chan, Nyein Nyein *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2021). Observamos ainda, nos esferoides com CAFs, um enriquecimento

da expressão de genes relacionados a população de células-tronco tumorais (*stemness*), tais como *OCT4* e *NANOG*, que, por exemplo, estão relacionados à resistência terapêutica (Mohiuddin; Wei; Kang, 2020; Son *et al.*, 2022). Em conjunto, os resultados deste estudo corroboram para a compreensão do papel dos CAFs na ativação de genes e vias críticas para a progressão tumoral e resistência terapêutica.

Os mesmos padrões de expressão foram complementados pela análise espacial do caso de COE. Os genes listados nos processos funcionais estudados estavam distribuídos em um total de dez *clusters* que correspondiam a áreas tumorais distintas. Nesse contexto, o *cluster 3* — correspondente ao estroma do *front* de invasão — apresentou uma assinatura clássica de ativação de CAFs associada com processos de remodelamento de MEC, invasão/metástase e TEM, com destaque para os transcritos *ACTA2* (Belhabib *et al.*, 2021), *ALDH1A3* (Fernando *et al.*, 2024), *ELF5* (Luk; Reehorst; Mariadason, 2018), *MMP2* e *MMP9* (Hoffmann *et al.*, 2020; Lee, Choong-Jae *et al.*, 2024). Essa convergência funcional no mesmo *cluster* revela a existência de um nicho de remodelamento tecidual e plasticidade celular. Em COE, como em outros tumores, os CAFs participam do remodelamento da MEC (Erdogan; Webb, 2017) e da TEM (Yang, Hao *et al.*, 2024), favorecendo a proliferação e a disseminação celular e culminando no aumento da invasão e da metástase. A participação dos CAFs particularmente no *front* de invasão reforça seu papel na progressão tumoral (Asif *et al.*, 2021).

Além do *cluster 3*, o *cluster 9* também estava enriquecido de marcadores relacionados à invasão, inflamação, angiogênese e estresse metabólico, tais como *DNASE1L3* (Chen, Jianlin *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021) e *EHF* (Gao, Lei *et al.*, 2021; Lv, Yanyan *et al.*, 2016). Ademais, os dados de expressão dos *clusters 4* e *6*, localizados no *core* tumoral, demonstraram a ativação elevada de marcadores de metabolismo e estresse oxidativo, resistência terapêutica e *stemness*, como *CYP11A1* (Badal; Delgoda, 2014; Mitsui *et al.*, 2016), *LGR5* (Ahmed, Eman Mohamed *et al.*, 2023; Patel, Yashvi; Prajapati, 2024) e *GPX2* (Esworthy, 2024; Jehl *et al.*, 2023). A identificação de padrões de expressão específicos entre os *clusters* reforça a heterogeneidade do COE, com regiões funcionalmente distintas que suportam a progressão tumoral (Arora *et al.*, 2023; Li, Jia *et al.*, 2024; Runa *et al.*, 2017). Fica evidente, portanto, a robustez de ferramentas de transcriptômica espacial para melhor compreensão da complexidade tumoral.

Este trabalho também teve como objetivo estudar as estruturas CIC no COE, no contexto dos compartimentos funcionais e espaciais do tumor. As estruturas CIC são formadas a partir de interações celulares que podem tanto favorecer quanto limitar a progressão do câncer (Okuyama *et al.*, 2023; Siddiqui *et al.*, 2019). A ocorrência da entose e do canibalismo é determinada por fatores como adesão à matriz (Durgan; Florey, 2018; Garanina *et al.*, 2017),

hipóxia e necessidade nutricional (Siddiqui *et al.*, 2019), sendo associados à evasão imune, reprogramação metabólica, resistência terapêutica e alterações na arquitetura tumoral (Armistead *et al.*, 2020; Dziuba *et al.*, 2023; Gaptulbarova *et al.*, 2024; Song *et al.*, 2023).

No entanto, a literatura tem destacado limitações do conhecimento sobre o mecanismo de formação de CIC e, inclusive, de marcadores bem-definidos para caracterizar essas estruturas (Borensztejn *et al.*, 2021; Chen, Qiao; Wang; He, 2022; Siquara da Rocha *et al.*, 2022). A maioria dos estudos disponíveis limitaram-se à caracterização morfológica das CICs em tecidos tumorais (Almangush *et al.*, 2020; Fais; Overholtzer, 2018). Poucos reproduziram as estruturas CIC *in vitro* (Cano *et al.*, 2012; Lugini *et al.*, 2006). A fim de contribuir para o avanço do conhecimento nesta área, nossa equipe avaliou, num trabalho prévio (Siquara da Rocha *et al.*, 2023) (Apêndice), a formação de estruturas CIC em esferoides tumorais de COE, com e sem cocultivo com CAFs, encontrando uma frequência significativamente maior dessas estruturas na presença dos mesmos, especialmente na zona proliferativa. Esses achados sugerem uma possível ligação entre as estruturas CIC e a atividade metabólica das células presentes nessa região, indicando seu potencial papel na promoção da invasão e agressividade tumoral.

Nesse trabalho, as estruturas CIC foram mapeadas no caso de COE, avaliando sua possível associação com propriedades funcionais do tumor. As estruturas foram localizadas no *core* tumoral, predominantemente nos *clusters* 4, 5 e 6, cujos transcritos refletem uma maior atividade de metabolismo/estresse, resistência terapêutica e *stemness*, especialmente *GPX2* (Emmink *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2024; Li, Fuzhou; Dai; Niu, 2020) e *CYP11A1* (Badal; Delgoda, 2014; Mitsui *et al.*, 2016). Esta área também apresenta uma maior densidade de células tumorais, o que sugere a ocorrência de um canibalismo homotípico, possivelmente associado a estratégias de sobrevivência em microambientes adversos (Fais; Overholtzer, 2018; Siddiqui *et al.*, 2019).

Estudos futuros poderão incorporar imunomarcações específicas e novas tecnologias de imagem podem aprofundar a investigação dessas associações, inclusive diferenciando as estruturas entre canibalismo e entose. A observação das estruturas CIC e sua possível associação com vias de remodelamento, adesão e plasticidade celular amplia o campo de investigação, que poderá contribuir para a identificação de biomarcadores.

De forma simplificada, a análise integrada utilizada neste estudo demonstrou a complexidade funcional e a heterogeneidade espacial do COE e o papel dos CAFs na modulação do perfil transcriptômico tumoral, especialmente relacionado a remodelamento tecidual, da plasticidade fenotípica e metabolismo. O estudo também identificou a associação entre as estruturas CIC e regiões funcionais do tumor, mais especificamente relacionadas ao

metabolismo tumoral, resposta ao estresse, *stemness* e resistência terapêutica. A estratégia de abordagem de análise do transcriptoma através de grupos funcionais permitiu a identificação de genes importantes em cada grupo, incluindo especificidades e convergências dos *clusters* identificados. As análises *medium* e *high-throughput* ainda são pouco explorados no contexto do COE, sendo que representam uma estratégia mais robusta para identificação de marcadores moleculares que possam melhorar o prognóstico do paciente e desenvolvimento de terapias-alvo (Almangush; Leivo; Mäkitie, 2021; Blatt *et al.*, 2017; Hartner, 2018; Miller *et al.*, 2019), além de possibilitar uma análise espacial estruturada de processos biológicos ainda pouco conhecidos, como é o caso da CIC.

Cabe, entretanto, considerar que este estudo apresenta limitações. A aplicação dos métodos de transcriptômica espacial em TMA de esferoides, apesar de pioneira, trouxe desafios técnicos, como a perda de esferoides, com reflexos na limitação de análises espaciais e comparativas entre zonas proliferativas, quiescentes e centrais dos esferoides. Em relação ao tecido de COE, o mesmo representa apenas o aspecto de tumores bem diferenciados. A realização de transcriptoma espacial é uma ferramenta poderosa, mas é preciso integrar análise morfológica espacial, volume de dados e rendimento, além de torná-lo economicamente viável para prática médica.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou os transcritos tumorais mais variados associados a processos biológicos relevantes — atividade de CAF, invasão, metástase, remodelamento da MEC, TEM — assim como a formação de estruturas CIC, integrando análises *in silico*, modelos tridimensionais de esferoides com CAFs e transcriptoma espacial de tecido tumoral humano.

Os esferoides cultivados com CAFs apresentaram maior expressão de transcritos relacionados a eventos pró-tumorais, em especial, o remodelamento da MEC, o processo de TEM e a plasticidade celular. A maior expressão destes genes neste grupo demonstra o potencial biológico dos CAFs em eventos celulares relacionados a progressão tumoral. Já a análise espacial do tecido de COE revelou a formação de nichos tumorais especializados, com destaque para os processos de ativação de CAFs associada com processos de remodelamento da MEC, invasão, metástase, TEM, inflamação pró-tumoral, estresse metabólico, *stemness* e resistência terapêutica, possibilitando uma melhor compreensão da dinâmica tumoral. As estruturas CIC localizavam-se, preferencialmente, em regiões com maior expressão de transcritos relacionados ao metabolismo celular, plasticidade e resistência terapêutica.

Em conjunto, os resultados deste trabalho ratificam a importância de estudos *medium* e *high-throughput* em modelos celulares mais complexos e tecidos tumorais para o avanço do entendimento da biologia do COE que oferece fundamentos para identificação de marcadores moleculares, especialmente prognóstico e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABADEH, Aryan; ALI, Aiman A.; BRADLEY, Grace; MAGALHAES, Marco A. Increase in detection of oral cancer and precursor lesions by dentists. **The Journal of the American Dental Association**, [s. l.], v. 150, n. 6, p. 531–539, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.ADAJ.2019.01.026>.
- ABUWATFA, Waad H.; PITT, William G.; HUSSEINI, Ghaleb A. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 7, 14 jan. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y>.
- AHMED, Eman Mohamed *et al.* The Expression of Stem Cell Marker LGR5 and Its Coexpression with B-Catenin in Sporadic Colorectal Carcinoma and Adenoma: A Comparative Immunohistochemical Study. **Medicina**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 1233, 30 jun. 2023. <https://doi.org/10.3390/medicina59071233>.
- AHMED, Monieb A.M.; NAGELKERKE, Anika. Current developments in modelling the tumour microenvironment in vitro: Incorporation of biochemical and physical gradients. **Organs-on-a-Chip**, [s. l.], v. 3, p. 100012, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.OOC.2021.100012>.
- AHUJA, Sana; SUREKA, Niti; ZAHEER, Sufian. Unraveling the intricacies of cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review on metabolic reprogramming and tumor microenvironment crosstalk. **APMIS**, [s. l.], v. 132, n. 12, p. 906–927, 14 jun. 2024. <https://doi.org/10.1111/apm.13447>.
- ALMANGUSH, Alhadi; HEIKKINEN, Ilkka; MÄKITIE, Antti A; COLETTA, Ricardo D; LÄÄRÄ, Esa; LEIVO, Ilmo; SALO, Tuula. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 856–866, 27 jul. 2017. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.244>.
- ALMANGUSH, Alhadi; LEIVO, Ilmo; MÄKITIE, Antti A. Biomarkers for Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Status and Challenges. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, p. 616629, 8 mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.616629>.
- ALMANGUSH, Alhadi; MÄKITIE, Antti A.; HAGSTRÖM, Jaana; HAGLUND, Caj; KOWALSKI, Luiz Paulo; NIEMINEN, Pentti; COLETTA, Ricardo D.; SALO, Tuula; LEIVO, Ilmo. Cell-in-cell phenomenon associates with aggressive characteristics and cancer-related mortality in early oral tongue cancer. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–7, set. 2020. <https://doi.org/10.1186/S12885-020-07342-X/FIGURES/3>.
- ANDERSEN, Monica; WINTER, Lucile. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 91, n. suppl 1, 2019. DOI 10.1590/0001-3765201720170238. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28876358/>.
- AREBRO, Julia; LEE, Che-Min; BENNEWITH, Kevin L.; GARNIS, Cathie. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity in Malignancy with Focus on Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1300, 21 jan. 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25021300>.

AREBRO, Julia; TOWLE, Rebecca; LEE, Che-Min; BENNEWITH, Kevin L.; GARNIS, Cathie. Extracellular vesicles promote activation of pro-inflammatory cancer-associated fibroblasts in oral cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 11, 7 set. 2023. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1240159>.

ARMISTEAD, Joy; HATZOLD, Julia; VAN ROYE, Anna; FAHLE, Evelin; HAMMERSCHMIDT, Matthias. Entosis and apical cell extrusion constitute a tumor-suppressive mechanism downstream of Matriptase. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 219, n. 2, p. e201905190, 3 fev. 2020. <https://doi.org/10.1083/jcb.201905190>.

ARORA, Rohit et al. Spatial transcriptomics reveals distinct and conserved tumor core and edge architectures that predict survival and targeted therapy response. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 5029, 18 ago. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40271-4>.

ASIF, Paris Jabeen; LONGOBARDI, Ciro; HAHNE, Michael; MEDEMA, Jan Paul. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 18, p. 4720, 21 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13184720>.

ASTHANA, Amish; NDYABAWA, Kenneth; MENDEZ, Dayrin; DOUGLASS, Megan; HAIDEKKER, Mark A.; KISAALITA, William S. Calcium Oscillation Frequency Is a Potential Functional Complex Physiological Relevance Indicator for a Neuroblastoma-Based 3D Culture Model. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 4314–4323, 20 maio 2020. <https://doi.org/10.1021/ACSBMATERIALS.9B01988>.

BA, Pengfei; ZHANG, Xiaojuan; YU, Miao; LI, Linxia; DUAN, Xiaoyu; WANG, Mingying; LV, Shuyan; FU, Guo; YANG, Pishan; YANG, Chengzhe; SUN, Qinfeng. Cancer associated fibroblasts are distinguishable from peri-tumor fibroblasts by biological characteristics in TSCC. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 2484–2490, set. 2019. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10556/HTML>.

BADAL, S.; DELGODA, R. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 743–753, jul. 2014. <https://doi.org/10.1002/jat.2968>.

BAGHBAN, Roghayyeh; ROSHANGAR, Leila; JAHANBAN-ESFAHLAN, Rana; SEIDI, Khaled; EBRAHIMI-KALAN, Abbas; JAYMAND, Mehdi; KOLAHIAN, Saeed; JAVAHERI, Tahereh; ZARE, Peyman. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–19, 7 abr. 2020. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-0530-4>.

BAJPAI, Prachi; BANERJEE, Nilam Sanjib; MOORE, Dianne W.; KIM, Hyung-Gyoon; AFAQ, Farrukh; CONTRERAS, Carlo M.; HESLIN, Martin J.; REDDY, Vishnu B.; PETER, Shajan; VARAMBALLY, Sooryanarayana; AL DIFFALHA, Sameer; MANNE, Upender. Developing 3D Organoid Raft Cultures from Patient-Derived Xenografts as Rapid Models to Screen Efficacy of Experimental Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 22, p. 14392, 19 nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/IJMS232214392>.

BARATA, João T.; DURUM, Scott K.; SEDDON, Benedict. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1584–1593, dez. 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41590-019-0479-x>.

BARTOSH, Thomas J.; ULLAH, Mujib; ZEITOUNI, Suzanne; BEAVER, Joshua; PROCKOP, Darwin J. Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 42, p. E6447–E6456, 3 out. 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612290113>.

BELHABIB, Ismahane; ZAGHDOUDI, Sonia; LAC, Claire; BOUSQUET, Corinne; JEAN, Christine. Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 14, p. 3466, 11 jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13143466>.

BELLO, Ibrahim O.; VERED, Marilena; DAYAN, Dan; DOBRIYAN, Alex; YAHALOM, Ran; ALANEN, Kalle; NIEMINEN, Pentti; KANTOLA, Saara; LÄÄRÄ, Esa; SALO, Tuula. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 33–38, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.10.013>.

BERNDT, Alexander; BÜTTNER, Robert; GÜHNE, Stefanie; GLEINIG, Anna; RICHTER, Petra; CHEN, Yuan; FRANZ, Marcus; LIEBMANN, Claus. Effects of activated fibroblasts on phenotype modulation, EGFR signalling and cell cycle regulation in OSCC cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 322, n. 2, p. 402–414, 1 abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.024>.

BHAT, Firdous Ahmad *et al.* Proteomic Alterations Associated with Oral Cancer Patients with Tobacco Using Habits. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 255–268, 1 abr. 2021. <https://doi.org/10.1089/OMI.2021.0001>.

BIAŁKOWSKA, Kamila; KOMOROWSKI, Piotr; BRYCZEWSKA, Maria; MIŁOWSKA, Katarzyna. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 6225, 28 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176225>.

BIENKOWSKA, Kamila J.; HANLEY, Christopher J.; THOMAS, Gareth J. Cancer-Associated Fibroblasts in Oral Cancer: A Current Perspective on Function and Potential for Therapeutic Targeting. **Frontiers in Oral Health**, [s. l.], v. 2, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.686337>.

BLATT, Sebastian; KRÜGER, Maximilian; ZIEBART, Thomas; SAGHEB, Keyvan; SCHIEGNITZ, Eik; GOETZE, Elisabeth; AL-NAWAS, Bilal; PABST, Andreas Max. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 722–730, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.033>.

BONNER, Scott E.; WILLMS, Eduard. Intercellular communication through extracellular vesicles in cancer and evolutionary biology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 165, p. 80–87, out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.006>.

BORENSZTEJN, Karol; TYRNA, Paweł; GAWEŁ, Agata M.; DZIUBA, Ireneusz; WOJCIK, Cezary; BIALY, Lukasz P.; MLYNARCZUK-BIALY, Izabela. Classification of Cell-in-Cell

Structures: Different Phenomena with Similar Appearance. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2569, 28 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10102569>.

BOZKURT, Emir; DÜSSMANN, Heiko; SALVUCCI, Manuela; CAVANAGH, Brenton L.; VAN SCHAEYBROECK, Sandra; LONGLEY, Daniel B.; MARTIN, Seamus J.; PREHN, Jochen H.M. TRAIL signaling promotes entosis in colorectal cancer. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 220, n. 11, 21 set. 2021. <https://doi.org/10.1083/jcb.202010030>.

CALAR, Kristin; PLESSELOVA, Simona; BHATTACHARYA, Somshuvra; JORGENSEN, Megan; DE LA PUENTE, Pilar. Human Plasma-Derived 3D Cultures Model Breast Cancer Treatment Responses and Predict Clinically Effective Drug Treatment Concentrations. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1722, 29 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071722>.

CALEFFI, Juliana Trindade; AAL, Mirian Carolini Esgoti; GALLINDO, Helena de Oliveira Manacorda; CAXALI, Gabriel Henrique; CRULHAS, Bruno Pereira; RIBEIRO, Amanda Oliveira; SOUZA, Glauco R.; DELELLA, Flávia Karina. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life Sciences**, [s. l.], v. 286, p. 120028, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.120028>.

CAMPOS, America; BURGOS-RAVANAL, Renato; GONZÁLEZ, María; HUILCAMAN, Ricardo; LOBOS GONZÁLEZ, Lorena; QUEST, Andrew. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 314, 29 jul. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9080314>.

CANO, Carla E.; SANDÍ, María José; HAMIDI, Tewfik; CALVO, Ezequiel L.; TURRINI, Olivier; BARTHOLIN, Laurent; LONCLE, Céline; SECQ, Véronique; GARCIA, Stéphane; LOMBERK, Gwen; KROEMER, Guido; URRUTIA, Raul; IOVANNA, Juan L. Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes to metastasis in pancreatic cancer. **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 964–979, set. 2012. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201255>.

CHAN, Nyein Nyein; YAMAZAKI, Manabu; MARUYAMA, Satoshi; ABÉ, Tatsuya; HAGA, Kenta; KAWAHARADA, Masami; IZUMI, Kenji; KOBAYASHI, Tadaharu; TANUMA, Jun-ichi. Cholesterol Is a Regulator of CAV1 Localization and Cell Migration in Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 6035, 23 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24076035>.

CHAN, Yi-Hao; LUM, Fok-Moon; NG, Lisa. Limitations of Current in Vivo Mouse Models for the Study of Chikungunya Virus Pathogenesis. **Medical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 64–77, 7 ago. 2015. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI3030064>.

CHANG, Ching-Wen; CHEN, Yu-Syuan; CHOU, Shiu-Huey; HAN, Chia-Li; CHEN, Yu-Ju; YANG, Cheng-Chieh; HUANG, Chih-Yang; LO, Jeng-Fan. Distinct Subpopulations of Head and Neck Cancer Cells with Different Levels of Intracellular Reactive Oxygen Species Exhibit Diverse Stemness, Proliferation, and Chemosensitivity. **Cancer Research**, [s. l.], v. 74, n. 21, p. 6291–6305, 30 out. 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0626>.

CHEN, Bing; ZENG, Xiao; HE, Yu; WANG, Xixi; LIANG, Ziwei; LIU, Jingjing; ZHANG, Peng; ZHU, Hongxia; XU, Ningzhi; LIANG, Shufang. STC2 promotes the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells through AKT-ERK signaling pathways.

Oncotarget, [s. l.], v. 7, n. 44, p. 71400–71416, 1 nov. 2016.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12147>.

CHEN, Jianlin; DING, Junping; HUANG, Wenjie; SUN, Lin; CHEN, Jinping; LIU, Yangyang; ZHAN, Qianmei; GAO, Gan; HE, Xiaoling; QIU, Guowen; LONG, Peiying; WEI, Lishu; LU, Zhenni; SUN, Yifan. DNASE1L3 as a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker for Lung Adenocarcinoma Based on Data Mining. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 12, p. 699242, 15 nov. 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.699242>.

CHEN, Qiao; WANG, Xiaoning; HE, Meifang. Cell-in-Cell: From Cell Biology to Translational Medicine. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, p. 7608521, 14 set. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7608521>.

CILENTO, Michael A.; SWEENEY, Christopher J.; BUTLER, Lisa M. Spatial transcriptomics in cancer research and potential clinical impact: a narrative review. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 150, n. 6, p. 296, 8 jun. 2024. <https://doi.org/10.1007/s00432-024-05816-0>.

CIRILLO, N.; HASSONA, Y.; CELENTANO, A.; LIM, K. P.; MANCHELLA, S.; PARKINSON, E. K.; PRIME, S. S. Cancer-associated fibroblasts regulate keratinocyte cell-cell adhesion via TGF- β -dependent pathways in genotype-specific oral cancer. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 76–85, jan. 2017. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw113>.

COLAPRICO, Antonio; SILVA, Tiago C.; OLSEN, Catharina; GAROFANO, Luciano; CAVA, Claudia; GAROLINI, Davide; SABEDOT, Thais S.; MALTA, Tathiane M.; PAGNOTTA, Stefano M.; CASTIGLIONI, Isabella; CECCARELLI, Michele; BONTEMPI, Gianluca; NOUSHMEHR, Houtan. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. e71–e71, 5 maio 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>.

CONKLIN, Matthew W.; KEELY, Patricia J. Why the stroma matters in breast cancer. **Cell Adhesion & Migration**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 249–260, maio 2012. <https://doi.org/10.4161/CAM.20567>.

CORDANI, Marco; DANDO, Ilaria; AMBROSINI, Giulia; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, Pedro. Signaling, cancer cell plasticity, and intratumor heterogeneity. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 255, s12964-024-01643–5, 3 maio 2024. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01643-5>.

CORREA DE SAMPAIO, Pedro; AUSLAENDER, David; KRUBASIK, Davia; FAILLA, Antonio Virgilio; SKEPPER, Jeremy N.; MURPHY, Gillian; ENGLISH, William R. A Heterogeneous In Vitro Three Dimensional Model of Tumour-Stroma Interactions Regulating Sprouting Angiogenesis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. e30753, 20 fev. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030753>.

CROKER, Alysha; RODRIGUEZ-TORRES, Mauricio; XIA, Ying; PARDHAN, Siddika; LEONG, Hon; LEWIS, John; ALLAN, Alison. Differential Functional Roles of ALDH1A1 and ALDH1A3 in Mediating Metastatic Behavior and Therapy Resistance of Human Breast Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 2039, 22 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18102039>.

- CUNHA, Amanda Ramos Da et al. The Global, Regional, and National Burden of Adult Lip, Oral, and Pharyngeal Cancer in 204 Countries and Territories: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncology*, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1401, 1 out. 2023. DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.2960.
- DATTA, Amrita; KIM, Hogyoun; MCGEE, Lauren; JOHNSON, Adedoyin E.; TALWAR, Sudha; MARUGAN, Juan; SOUTHALL, Noel; HU, Xin; LAL, Madhu; MONDAL, Debasis; FERRER, Marc; ABDEL-MAGEED, Asim B. High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8161, 25 maio 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26411-7>.
- DE ARAÚJO, Taís Bacelar Sacramento; NOGUEIRA, Raphael Luís Rocha; SIQUARA DA ROCHA, Leonardo de Oliveira; BASTOS, Iasmin Nogueira; DIAS, Rosane Borges; SOUZA, Bruno Solano De Freitas; LAMBERT, Daniel William; COLETTA, Ricardo D.; SILVA, Viviane Aline Oliveira; GURGEL ROCHA, Clarissa A. Enhancing scaffold-free spheroid models: 3D cell bioprinting method for metastatic HSC3–Oral squamous carcinoma cell line. *SLAS Discovery*, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 100158, jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.100158>.
- DE SOURE, António M.; FERNANDES-PLATZGUMMER, Ana; DA SILVA, Cláudia L.; CABRAL, Joaquim M.S. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells. *Journal of Biotechnology*, [s. l.], v. 236, p. 88–109, out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.007>.
- DELEANU, Roxana; CEAFFALAN, Laura Cristina; DRICU, Anica. Transcriptomic Crosstalk between Gliomas and Telencephalic Neural Stem and Progenitor Cells for Defining Heterogeneity and Targeted Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 22, n. 24, p. 13211, 8 dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413211>.
- DEY, Ankita; KUNDU, Moumita; DAS, Subhayan; JENA, Bikash Chandra; MANDAL, Mahitosh. Understanding the function and regulation of Sox2 for its therapeutic potential in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, [s. l.], v. 1877, n. 2, p. 188692, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188692>.
- DING, Liang; REN, Jing; ZHANG, Dongya; LI, Yi; HUANG, Xiaofeng; HU, Qingang; WANG, Hui; SONG, Yuxian; NI, Yanhong; HOU, Yayi. A novel stromal lncRNA signature reprograms fibroblasts to promote the growth of oral squamous cell carcinoma via lncRNA-CAF/interleukin-33. *Carcinogenesis*, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 397–406, 13 jan. 2018. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy006>.
- DINI, S.; BINDER, B. J.; FISCHER, S. C.; MATTHEYER, C.; SCHMITZ, A.; STELZER, E. H. K.; BEAN, N. G.; GREEN, J. E. F. Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *Journal of The Royal Society Interface*, [s. l.], v. 13, n. 123, p. 20160649, out. 2016. <https://doi.org/10.1098/RSIF.2016.0649>.
- DOCTOR, Alina; SEIFERT, Verena; ULLRICH, Martin; HAUSER, Sandra; PIETZSCH, Jens. Three-Dimensional Cell Culture Systems in Radiopharmaceutical Cancer Research. *Cancers*, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2765, 25 set. 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12102765>.
- DONG, Xiaodan; DONG, Chunling; LI, Bo. Effects of macrophages in OSCC progression.

Frontiers in Immunology, [s. l.], v. 15, p. 1517886, 14 jan. 2025.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1517886>.

DOURADO, Mauricio Rocha; KORVALA, Johanna; ÅSTRÖM, Pirjo; DE OLIVEIRA, Carine Ervolino; CERVIGNE, Nilva K.; MOFATTO, Luciana Souto; BASTOS, Debora Campanella; MESSETTI, Ana Camila Pereira; GRANER, Edgard; LEME, Adriana Franco Paes; COLETTA, Ricardo D.; SALO, Tuula. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 8, n. 1, 13 fev. 2019. DOI 10.1080/20013078.2019.1578525. Disponível em:
<https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1578525>.

DOYLE, Andrew D; NAZARI, Shayan S; YAMADA, Kenneth M. Cell–extracellular matrix dynamics. **Physical Biology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 021002, 1 mar. 2022.
<https://doi.org/10.1088/1478-3975/ac4390>.

DUAN, Yi; ZHANG, Xiaozhen; YING, Honggang; XU, Jian; YANG, Hanshen; SUN, Kang; HE, Lihong; LI, Muchun; JI, Yongtao; LIANG, Tingbo; BAI, Xueli. Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunochemotherapy via remodeling the matrix. **Oncogene**, [s. l.], v. 42, n. 25, p. 2061–2073, 16 jun. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02711-9>.

DUMONT, Jennifer; EUWART, Don; MEI, Baisong; ESTES, Scott; KSHIRSAGAR, Rashmi. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1110–1122, 1 nov. 2016. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>.

DURGAN, J.; FLOREY, O. Cancer cell cannibalism: Multiple triggers emerge for entosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1865, n. 6, p. 831–841, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.004>.

DZIUBA, Ireneusz; GAWEL, Agata M.; TYRNA, Paweł; RYBCZYNSKA, Jolanta; BIALY, Lukasz P.; MLYNARCZUK-BIALY, Izabela. Fate of Entosis: From the Beginning to the End in Untreated Advanced Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 15, p. 12142, 29 jul. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241512142>.

EL HARANE, Sanae; ZIDI, Bochra; EL HARANE, Nadia; KRAUSE, Karl-Heinz; MATTHES, Thomas; PREYNAT-SEAUVE, Olivier. Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1001, 24 mar. 2023.
<https://doi.org/10.3390/cells12071001>.

EMMINK, Benjamin L.; LAOUKILI, Jamila; KIPP, Anna P.; KOSTER, Jan; GOVAERT, Klaas M.; FATRAI, Szabolcs; VERHEEM, Andre; STELLER, Ernst J.A.; BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; JIMENEZ, Connie R.; BOREL RINKES, Inne H.M.; KRANENBURG, Onno. GPx2 Suppression of H2O2 Stress Links the Formation of Differentiated Tumor Mass to Metastatic Capacity in Colorectal Cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 74, n. 22, p. 6717–6730, 15 nov. 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1645>.

ENRIQUEZ, Josue; MIMS, Brianyell Mc Daniel; TRASTI, Scott; FURR, Kathryn L.; GRISHAM, Matthew B. Genomic, microbial and environmental standardization in animal

experimentation limiting immunological discovery. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–19, set. 2020. <https://doi.org/10.1186/S12865-020-00380-X/FIGURES/6>.

ERDOGAN, Begum; WEBB, Donna J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 229–236, 8 fev. 2017. <https://doi.org/10.1042/BST20160387>.

ESWORTHY, R. Steven. Evaluation of the Use of Cell Lines in Studies of Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase 2 (GPX2) Involvement in Colorectal Cancer. **Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 207, 10 set. 2024. <https://doi.org/10.3390/diseases12090207>.

FAIS, Stefano; OVERHOLTZER, Michael. Cell-in-cell phenomena, cannibalism, and autophagy: is there a relationship? **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 95, s41419-017-0111–7, 24 jan. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0111-7>.

FENG, Qiang; LIU, Zhida; YU, Xuexin; HUANG, Tongyi; CHEN, Jiahui; WANG, Jian; WILHELM, Jonathan; LI, Suxin; SONG, Jiwon; LI, Wei; SUN, Zhichen; SUMER, Baran D.; LI, Bo; FU, Yang-Xin; GAO, Jinming. Lactate increases stemness of CD8 + T cells to augment anti-tumor immunity. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, 6 set. 2022. DOI 10.1038/S41467-022-32521-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36068198/>.

FERNANDO, Wasundara; CRUICKSHANK, Brianne M.; ARUN, Raj Pranap; MACLEAN, Maya R.; CAHILL, Hannah F.; MORALES-QUINTANILLA, Fiorella; DEAN, Cheryl A.; WASSON, Marie-Claire D.; DAHN, Margaret L.; COYLE, Krysta M.; WALKER, Olivia L.; POWER COOMBS, Melanie R.; MARCATO, Paola. ALDH1A3 is the switch that determines the balance of ALDH+ and CD24–CD44+ cancer stem cells, EMT-MET, and glucose metabolism in breast cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 43, n. 43, p. 3151–3169, 21 out. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41388-024-03156-4>.

FILIPIAK-DULIBAN, Aleksandra; BRODACZEWSKA, Klaudia; MAJEWSKA, Aleksandra; KIEDA, Claudine. Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 349–364, maio 2022. <https://doi.org/10.1007/S11626-022-00685-8>.

FLORES MOLINA, Manuel; FABRE, Thomas; CLERET-BUHOT, Aurélie; SOUCY, Geneviève; MEUNIER, Liliane; ABDELNABI, Mohamed N.; BELFORTE, Nicolas; TURCOTTE, Simon; SHOUKRY, Naglaa H. Visualization, Quantification, and Mapping of Immune Cell Populations in the Tumor Microenvironment. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2020, n. 157, 25 mar. 2020. DOI 10.3791/60740. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32281982/>.

FLOREY, O.; KIM, S.; OVERHOLTZER, M. Entosis: Cell-in-Cell Formation that Kills Through Entotic Cell Death. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 861–866, 5 nov. 2015. <https://doi.org/10.2174/1566524015666151026100042>.

FU, Pin; CHEN, Fu-Chun; PAN, Qi; ZHAO, Xianda; ZHAO, Chen; CHO, William; CHEN, Hong-Lei. The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 10, p. 819–835, fev. 2017. <https://doi.org/10.2147/OTT.S123912>.

FULLÁR, Alexandra; KOVALSZKY, Ilona; BITSCHKE, Mario; ROMANI, Angela; SCHARTINGER, Volker Hans; SPRINZL, Georg Mathias; RIECHELMANN, Herbert; DUDÁS, József. Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 318, n. 13–16, p. 1517, 1 ago. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.023>.

GAO, Lei; YANG, Tian; ZHANG, Shuo; LIANG, Yiqian; SHI, Puyu; REN, Hui; HOU, Peng; CHEN, Mingwei. EHF enhances malignancy by modulating AKT and MAPK/ERK signaling in non-small cell lung cancer cells. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 102, 15 abr. 2021. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8053>.

GAO, Pan; LI, Chunjie; CHANG, Zheng; WANG, Xiaoyi; XUAN, Ming. Carcinoma associated fibroblasts derived from oral squamous cell carcinoma promote lymphangiogenesis via c-Met/PI3K/AKT in vitro. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 331–337, jan. 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7301>.

GAPTULBAROVA, Ksenia Andreevna; TSYDENOVA, Irina Alexandrovna; DOLGASHEVA, Daria Sergeevna; KRAVTSOVA, Ekaterina Andreevna; IBRAGIMOVA, Marina Konstantinovna; VTORUSHIN, Sergey Vladimirovich; LITVIAKOV, Nikolai Vasilievich. Mechanisms and significance of entosis for tumour growth and progression. **Cell Death Discovery**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 109, 1 mar. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01877-9>.

GARANINA, Anastasiia S.; KISURINA-EVGENIEVA, Olga P.; EROKHINA, Maria V.; SMIRNOVA, Elena A.; FACTOR, Valentina M.; ONISHCHENKO, Galina E. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12555, 2 out. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12867-6>.

GHAFOURI-FARD, Soudeh; NOIE ALAMDARI, Ali; NOEE ALAMDARI, Yashar; ABAK, Atefe; HUSSEN, Bashdar Mahmud; TAHERI, Mohammad; JAMALI, Elena. Role of PI3K/AKT pathway in squamous cell carcinoma with an especial focus on head and neck cancers. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 254, 13 ago. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02676-x>.

GONZÁLEZ-RUIZ, Isabel; RAMOS-GARCÍA, Pablo; RUIZ-ÁVILA, Isabel; GONZÁLEZ-MOLES, Miguel Ángel. Early Diagnosis of Oral Cancer: A Complex Polyhedral Problem with a Difficult Solution. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 13, p. 3270, 21 jun. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15133270>.

GOTTWALD, Dorian; PUTZ, Florian; HOHMANN, Nora; BÜTTNER-HEROLD, Maike; HECHT, Markus; FIETKAU, Rainer; DISTEL, Luitpold. Role of tumor cell senescence in non-professional phagocytosis and cell-in-cell structure formation. **BMC Molecular and Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 79, 7 nov. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00326-6>.

GUIMARAES, Vanessa Sousa Nazare; VIDAL, Manuela Torres Andion; DE FARO VALVERDE, Ludmila; DE OLIVEIRA, Marbele Guimarães; DE OLIVEIRA SIQUARA DA ROCHA, Leonardo; COELHO, Paulo Lucas Cerqueira; SOARES, Fernando Augusto; DE FREITAS SOUZA, Bruno Solano; BEZERRA, Daniel Pereira; COLETTA, Ricardo D.; PEREIRA, Thiago Almeida; DOS SANTOS, Jean Nunes; GURGEL ROCHA, Clarissa

- Araújo. Hedgehog pathway activation in oral squamous cell carcinoma: cancer-associated fibroblasts exhibit nuclear GLI-1 localization. **Journal of Molecular Histology**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 675–684, 30 set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10735-020-09913-5>.
- GUO, Deliang; MA, Dong; LIU, Pengpeng; LAN, Jianwei; LIU, Zhisu; LIU, Quanyan. DNASE1L3 arrests tumor angiogenesis by impairing the senescence-associated secretory phenotype in response to stress. **Aging**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 9874–9899, 15 abr. 2021. <https://doi.org/10.18632/aging.202740>.
- HAGA, Kenta; YAMAZAKI, Manabu; MARUYAMA, Satoshi; KAWAHARADA, Masami; SUZUKI, Ayako; HOSHIKAWA, Emi; CHAN, Nyein Nyein; FUNAYAMA, Akinori; MIKAMI, Toshihiko; KOBAYASHI, Tadaharu; IZUMI, Kenji; TANUMA, Jun-Ichi. Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- β /SOX9 axis in cancer progression. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 101236, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101236>.
- HALLER, J.; ABEDI, N.; HAFEDI, A.; SHEHAB, O.; WIETECH, M.S. Spatial Transcriptomics Unravel the Tissue Complexity of Oral Pathogenesis. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 103, n. 13, p. 1331–1339, dez. 2024. <https://doi.org/10.1177/00220345241271934>.
- HAM, Stephanie L; JOSHI, Ramila; THAKURI, Pradip S; TAVANA, Hossein. Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 241, n. 9, p. 939–954, maio 2016. <https://doi.org/10.1177/1535370216643772>.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- HANDRAL, Harish K.; WYROBNIK, Tom Adam; LAM, Alan Tin-Lun. Emerging Trends in Biodegradable Microcarriers for Therapeutic Applications. **Polymers**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1487, 16 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/polym15061487>.
- HARTNER, Lee. Chemotherapy for Oral Cancer. **Dental Clinics of North America**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 87–97, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.006>.
- HOFFMANN, Caroline *et al.* MMP2 as an independent prognostic stratifier in oral cavity cancers. **OncImmunology**, [s. l.], v. 9, n. 1, jan. 2020. DOI 10.1080/2162402X.2020.1754094. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1754094>.
- HSIEH, Chia-Hsun; CHEN, Yi-Dao; HUANG, Shiang-Fu; WANG, Hung-Ming; WU, Min-Hsien. The Effect of Primary Cancer Cell Culture Models on the Results of Drug Chemosensitivity Assays: The Application of Perfusion Microbioreactor System as Cell Culture Vessel. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/470283>.
- HU, Chen; ZHANG, Yifan; WU, Chunping; HUANG, Qiang. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: opportunities and challenges. **Cell Death Discovery**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 124, 13 abr. 2023.

<https://doi.org/10.1038/s41420-023-01428-8>.

HUANG, Chengqun; SHARMA, Ankush; THAKUR, Reetu; RAI, Deepika; KATIKA, Madhusudhanarao; GERMANO, Juliana de Freitas; SONG, Yang; SINGH, Sakshi; SIN, Jon; SENGSTOCK, David; ANDRES, Allen M; MURALI, Ramachandran; MENTZER, Robert M; GOTTLIEB, Roberta A; PIPLANI, Honit. Asporin, an extracellular matrix protein, is a beneficial regulator of cardiac remodeling. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, [s. l.], v. 110, p. 40–59, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.04.005>.

HUANG, Hongyan; CHEN, Ang; WANG, Ting; WANG, Manna; NING, Xiangkai; HE, Meifang; HU, Yazhuo; YUAN, Long; LI, Shichong; WANG, Qiwei; LIU, Hong; CHEN, Zhaolie; REN, Jun; SUN, Qiang. Detecting cell-in-cell structures in human tumor samples by E-cadherin/CD68/CD45 triple staining. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 24, p. 20278–20287, 21 ago. 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4275>.

HUANG, Yisheng; HUANG, Zhijie; TANG, Zhengming; CHEN, Yuanxin; HUANG, Mingshu; LIU, Hongyu; HUANG, Weibo; YE, Qingsong; JIA, Bo. Research Progress, Challenges, and Breakthroughs of Organoids as Disease Models. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 16 nov. 2021. DOI 10.3389/FCELL.2021.740574. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34869324/>.

IDOSKA, Sanela; POPOVIC-MONEVSKA, Danica; PEPIC, Senada; KIRKOV, Antonio; PANČEVSKI, Goran; BOŽOVIC, Suzana; ILIJEV, Aleksandar; TRAMBULOVA, Jana; STAMATOVSKI, Aleksandar; KONESKI, Filip. Association of carcinoma-associated fibroblasts with clinico-pathological parameters of oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. **Acta stomatologica Naissi**, [s. l.], v. 39, n. 87, p. 2555–2568, 2023. <https://doi.org/10.5937/asn23875551>.

IKEDA-MOTONAKANO, Reiko; HIRABAYASHI-NISHIMUTA, Fumika; YADA, Naomi; YAMASAKI, Ryota; NAGAI-YOSHIOKA, Yoshie; USUI, Michihiko; NAKAZAWA, Kohji; YOSHIGA, Daigo; YOSHIOKA, Izumi; ARIYOSHI, Wataru. Fabrication of a Three-Dimensional Spheroid Culture System for Oral Squamous Cell Carcinomas Using a Microfabricated Device. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 21, p. 5162, 26 out. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15215162>.

INFANGER, David W.; LYNCH, Maureen E.; FISCHBACH, Claudia. Engineered Culture Models for Studies of Tumor-Microenvironment Interactions. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 29–53, 11 jul. 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150028>.

INOUE, Harumi; TSUCHIYA, Hozumi; MIYAZAKI, Yuji; KIKUCHI, Kentaro; IDE, Fumio; SAKASHITA, Hideaki; KUSAMA, Kaoru. Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 11345–11352, nov. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2450-7>.

IWASA, Yoh-ichiro; NAKAJIMA, Tomoyuki; HORI, Kentaro; YOKOTA, Yoh; KITO, Ryosuke; UEHARA, Takeshi; TAKUMI, Yutaka. A Spatial Transcriptome Reveals Changes in Tumor and Tumor Microenvironment in Oral Cancer with Acquired Resistance to

Immunotherapy. **Biomolecules**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1685, 22 nov. 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13121685>.

JAIKUMARR RAM, Ashwin; GIRIJA AS, Smiline; JAYASEELAN, Vijayashree Priyadharsini; ARUMUGAM, Paramasivam. Overexpression of BASP1 Indicates a Poor Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 3435–3439, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.11.3435>.

JAIN, M. An overview on “cellular cannibalism” with special reference to oral squamous cell carcinoma. **Experimental Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 242–245, 22 dez. 2015. [https://doi.org/10.31768/2312-8852.2015.37\(4\):242-245](https://doi.org/10.31768/2312-8852.2015.37(4):242-245).

JAIN, Megha; SAAWARN, Swati; GUPTA, Anish; ASHOK, Sahana; MHASKE, Shubhangi; KHAN, Samark; JAIN, Manish. Assessment of Tumor Cell Cannibalism as a Predictor of Oral Squamous Cell Carcinoma - A Histopathologic Correlation. **The Gulf journal of oncology**, [s. l.], v. 1, n. 23, p. 52–56, 2017.

JASIEWICZ, Francis; QURBAN, Zeeshan; HUGHES, Christopher. Treatment-induced mucositis in oncology. **British Journal of Hospital Medicine**, [s. l.], v. 83, n. 9, p. 1–8, 2 set. 2022. <https://doi.org/10.12968/hmed.2022.0324>.

JEHL, Aude; CONRAD, Omblin; BURG, Mickaël; FOPPOLO, Sophie; VAUCHELLES, Romain; RONZANI, Carole; ETIENNE-SELLOUM, Nelly; CHENARD, Marie-Pierre; DANIC, Aurélien; DOURLHES, Thomas; THIBAUT, Claire; SCHULTZ, Philippe; DONTENWILL, Monique; MARTIN, Sophie. Blocking EREG/GPX4 Sensitizes Head and Neck Cancer to Cetuximab through Ferroptosis Induction. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 733, 24 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/CELLS12050733>.

JIN, Xiaoye; LOU, Xiayuan; QI, Haoxiang; ZHENG, Chao; LI, Bo; SIWU, Xuerong; LV, Qiaoli; ZHAO, An; RUAN, Jian; JIANG, Ming. NRF2 signaling plays an essential role in cancer progression through the NRF2-GPX2-NOTCH3 axis in head and neck squamous cell carcinoma. [s. l.], 29 mar. 2024. DOI 10.21203/rs.3.rs-4132275/v1. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-4132275/v1>. Acesso em: 19 maio 2025.

KANAMORI-KATAYAMA, Mutsumi; KAIHO, Ai; ISHIZU, Yuri; OKAMURA-OHO, Yuko; HINO, Okio; ABE, Masaaki; KISHIMOTO, Takumi; SEKIHARA, Hisahiko; NAKAMURA, Yukio; SUZUKI, Harukazu; FORREST, Alistair R. R.; HAYASHIZAKI, Yoshihide. LRRN4 and UPK3B Are Markers of Primary Mesothelial Cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. e25391, 3 out. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025391>.

KANEMARU, Ai; YAMAMOTO, Koji; KAWAGUCHI, Makiko; FUKUSHIMA, Tsuyoshi; LIN, Chen-Yong; JOHNSON, Michael D.; CAMERER, Eric; KATAOKA, Hiroaki. Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 130–141, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1002/ijc.30426>.

KANG, Soo Hyun; OH, Su Young; LEE, Kah-Young; LEE, Heon-Jin; KIM, Mee-Seon; KWON, Tae-Geon; KIM, Jin-Wook; LEE, Sung-Tak; CHOI, So-Young; HONG, Su-Hyung.

Differential effect of cancer-associated fibroblast-derived extracellular vesicles on cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma *via* miR-876-3p. **Theranostics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 460–479, 2024. <https://doi.org/10.7150/THNO.87329>.

KAYA, S.; WIESMANN, Nadine; GOLDSCHMITT, J.; KRÜGER, M.; AL-NAWAS, B.; HEIDER, J. Differences in the expression of caveolin-1 isoforms in cancer-associated and normal fibroblasts of patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 5823–5831, 27 mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03887-8>.

KAYAMORI, Kou; KATSUBE, Ken-Ichi; SAKAMOTO, Kei; OHYAMA, Yoshio; HIRAI, Hideaki; YUKIMORI, Akane; OHATA, Yae; AKASHI, Takumi; SAITOH, Masao; HARADA, Kiyoshi; HARADA, Hiroyuki; YAMAGUCHI, Akira. NOTCH3 Is Induced in Cancer-Associated Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **PLoS One**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e0154112, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154112>.

KECK, Michaela K. *et al.* Integrative Analysis of Head and Neck Cancer Identifies Two Biologically Distinct HPV and Three Non-HPV Subtypes. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 870–881, 15 fev. 2015. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2481>.

KEERTHIKA, R.; DEVI, Anju; KAMBOJ, Mala; NARWAL, Anjali; SHARMA, Gitika. Histomorphological Evidence of Complex Cannibalism-An Uncharted Territory in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery: Official Publication of the Association of Otolaryngologists of India**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 2304–2310, jun. 2024. <https://doi.org/10.1007/s12070-023-04473-y>.

KETTELER, Julia; KLEIN, Diana. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 143, n. 9, p. 2092–2104, nov. 2018. <https://doi.org/10.1002/ijc.31369>.

KHALID, Aeman; SIDDIQUI, Safia; FAIZI, Nafis; HASSAN, Jowairiah; NEHAL, Naila; SIDDIQUI, Atiuddin. Role of Stromal Myofibroblasts in the Progression of Oral Lesions from Dysplasia to Invasive Carcinoma. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, [s. l.], v. 40, n. 04, p. 536–541, out. 2019. https://doi.org/10.4103/ijmpo.ijmpo_121_18.

KHAN, Anowar H.; ZHOU, Sophia P.; MOE, Margaret; QUESADA, Braulio A. Ortega; BAJGIRAN, Khashayar R.; LASSITER, Haley R.; DORMAN, James A.; MARTIN, Elizabeth C.; POJMAN, John A.; MELVIN, Adam T. Generation of 3D Spheroids Using a Thiol-Acrylate Hydrogel Scaffold to Study Endocrine Response in ER+Breast Cancer. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 3977–3985, set. 2022. https://doi.org/10.1021/ACSBOMATERIALS.2C00491/ASSET/IMAGES/LARGE/AB2C00491_0005.JPEG.

KHAN, Kahkashan; AFIFA; MUHAMMAD IMRAN; NIMRAH FAROOQ. Potential Role of Extracellular Matrix and its Components in Cancer Development and Progression. **Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences**, [s. l.], v. 61, n. 3, 23 set. 2024. DOI 10.53560/PPASB(61-3)1024. Disponível em: <https://ppaspk.org/index.php/PPAS-B/article/view/1218>. Acesso em: 14 mar. 2025.

KIANFAR, Mostafa; BALCERAK, Anna; CHMIELARCZYK, Mateusz; TARNOWSKI, Leszek; GRZYBOWSKA, Ewa A. Cell Death by Entosis: Triggers, Molecular Mechanisms and Clinical Significance. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 4985, 30 abr. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23094985>.

KIM, Hyosik; LEE, Sang-Min; AHN, Kang-Min. The epidemiological and histopathological factors for delayed local recurrence in oral squamous cell carcinoma. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 38, 12 nov. 2024. <https://doi.org/10.1186/s40902-024-00443-8>.

KIM, Jue Young; MOON, Sook; KIM, Dokyeong. Oral Squamous Cell Carcinoma-Derived ANGPTL3 Induces Cancer Associated Fibroblastic Phenotypes in Surrounding Fibroblasts. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 4315–4322, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.12.4315>.

KO, Ying-Chieh; LAI, Ting-Yu; HSU, Shu-Ching; WANG, Fu-Hui; SU, Sheng-Yao; CHEN, Yu-Lian; TSAI, Min-Lung; WU, Chung-Chun; HSIAO, Jenn-Ren; CHANG, Jang-Yang; WU, Yi-Mi; ROBINSON, Dan R.; LIN, Chung-Yen; LIN, Su-Fang. Index of Cancer-Associated Fibroblasts Is Superior to the Epithelial–Mesenchymal Transition Score in Prognosis Prediction. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1718, 28 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12071718>.

KOUDAN, Elizaveta V. *et al.* Magnetic Patterning of Tissue Spheroids Using Polymer Microcapsules Containing Iron Oxide Nanoparticles. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 5206–5214, 8 nov. 2021. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.1c00805>.

KROEMER, Guido; PERFETTINI, Jean-Luc. Entosis, a key player in cancer cell competition. **Cell Research**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1280–1281, 24 out. 2014. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.133>.

KUMARI, Rakhi; RAMAN, Nikita; KUMAR, Amit; TAMANNA, Humaira Jabeen; ANJALI; GANGADHARAPPA, Praveen. Assessment of Oral Health-Related Quality of Life in Surgically Treated Oral Cancer Patients after Prosthetic Rehabilitation. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 16, n. Suppl 4, p. S4085–S4087, dez. 2024. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_1508_24.

KUSUKAWA, Jingo. Surgical treatment for early oral cancer. **Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 568–576, 2011. <https://doi.org/10.5794/jjoms.57.568>.

LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 559, dez. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>.

LAU, Rachel; YU, Lu; ROUMELIOTIS, Theodoros I.; STEWART, Adam; PICKARD, Lisa; CHOUDHARY, Jyoti S.; BANERJI, Udai. Secretome of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Influences Drug Sensitivity in Cancer Cells. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 2160–2168, 7 jun. 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00112>.

LAVUDI, Kousalya; NUGURI, Shreya Madhav; PANDEY, Prashant; KOKKANTI, Rekha Rani; WANG, Qi-En. ALDH and cancer stem cells: Pathways, challenges, and future directions in targeted therapy. **Life Sciences**, [s. l.], v. 356, p. 123033, nov. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.123033>.

LEE, Choong-Jae; JANG, Tae-Young; JEON, So-El; YUN, Hyeon-Ji; CHO, Yeong-Hoon; LIM, Da-Ye; NAM, Jeong-Seok. The dysadherin/MMP9 axis modifies the extracellular matrix to accelerate colorectal cancer progression. **Nature Communications**, [s. l.], v. 15, p. 10422, 30 nov. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54920-9>.

LEE, Jin Woo; LEE, Hwa-Yong. Targeting Cancer Stem Cell Markers or Pathways: A Potential Therapeutic Strategy for Oral Cancer Treatment. **International Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 386–399, 30 nov. 2021. <https://doi.org/10.15283/IJSC21084>.

LI, Fuzhou; DAI, Lan; NIU, Jixiang. GPX2 silencing relieves epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 235, n. 11, p. 7780–7790, nov. 2020. <https://doi.org/10.1002/jcp.29391>.

LI, Huan; ZHANG, Ji; CHEN, Shu-Wei; LIU, Lu-Lu; LI, Lei; GAO, Fan; ZHUANG, Shi-Min; WANG, Li-Ping; LI, Yan; SONG, Ming. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, p. 198, 21 jun. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0551-8>.

LI, Jia; LI, Shengjiao; SHU, Mingyang; HU, Weiwei. Unravelling the heterogeneity of oral squamous cell carcinoma by integrative analysis of single-cell and bulk transcriptome data. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. e18108, fev. 2024. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18108>.

LI, Xia; FANG, Qigen; DU, Wei; ZHANG, Xu; DAI, Liyuan; QIAO, Yongming. Induction chemotherapy combined with immunotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 622, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08373-8>.

LI, Yao-yin; TAO, Yi-wei; GAO, Shuo; LI, Pei; ZHENG, Jian-mao; ZHANG, Si-en; LIANG, Jianfeng; ZHANG, Yuejiao. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 36, p. 209–220, out. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.09.006>.

LIAO, Juan-Kun; ZHOU, Bin; ZHUANG, Xiu-Mei; ZHUANG, Pei-Lin; ZHANG, Da-Ming; CHEN, Wei-Liang. Cancer-associated fibroblasts confer cisplatin resistance of tongue cancer via autophagy activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 97, p. 1341–1348, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.024>.

LIN, Chen; SUN, Lina; HUANG, Shenglei; WENG, Xiangqun; WU, Zhixian. STC2 Is a Potential Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer and Promotes Migration and Invasion by Inducing Epithelial–Mesenchymal Transition. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2019, p. 1–9, 15 jul. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8042489>.

LIN, Ching Shwun; XIN, Zhong Cheng; DAI, Jican; LUE, Tom F. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. **Histology and Histopathology**, [s. l.], v. 28, n. 28, p. 1109–1116, set. 2013. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1109>.

LIN, Ching-Chan; HUANG, Yu-Kai; CHO, Chia-Fong; LIN, Yu-Sen; LO, Chia-Chien; KUO, Ting-Ting; TSENG, Guan-Chin; CHENG, Wei-Chung; CHANG, Wei-Chao; HSIAO, Tzu-Hung; LAI, Liang-Chuan; SHIH, Jin-Yuan; LIU, Yu-Huei; CHAO, K.S. Clifford; HSU, Jennifer L.; LEE, Pei-Chih; SUN, Xian; HUNG, Mien-Chie; SHER, Yuh-Pyng. Targeting positive feedback between BASP1 and EGFR as a therapeutic strategy for lung cancer progression. **Theranostics**, [s. l.], v. 10, n. 24, p. 10925–10939, 2020. <https://doi.org/10.7150/thno.49425>.

LIN, Jingwen; LIU, Chuanxia; GE, Lin; GAO, Qinghong; HE, Xin; LIU, Ying; LI, Shengfu; ZHOU, Min; CHEN, Qianming; ZHOU, Hongmei. Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 597–602, 1 jun. 2011. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0158-5>.

LIN, Nan-Nan; WANG, Ping; ZHAO, Dan; ZHANG, Fu-Jun; YANG, Kai; CHEN, Rui. Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 21–30, 27 maio 2016. <https://doi.org/10.1111/jop.12452>.

LIU, Chang; LI, Mingzhu; LIU, Xiaojie; SHI, Ting; WANG, Yun; SUI, Chaoyang; ZHANG, Wenan; WANG, Bowen. Evaluating the efficacy and safety of different neoadjuvant immunotherapy combinations in locally advanced HNSCC: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 15, p. 1467306, 29 ago. 2024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1467306>.

LIU, Chunxiao; FU, Lingfeng; WANG, Yuxin; YANG, Weijun. Influence of the gut microbiota on immune cell interactions and cancer treatment. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 939, 15 out. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05709-3>.

LIU, Pan; WANG, Yue; LI, Xiang; LIU, Zhenan; SUN, Yunqing; LIU, Hanzhe; SHAO, Zhe; JIANG, Erhui; ZHOU, Xiaocheng; SHANG, Zhengjun. Enhanced lipid biosynthesis in oral squamous cell carcinoma cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression: Role of IL8/AKT/p-ACLY axis. **Cancer Science**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 1433–1445, maio 2024. <https://doi.org/10.1111/cas.16111>.

LIU, Xue; LI, Jiao; YANG, Xuesong; LI, Xiaojie; KONG, Jing; QI, Dongyuan; ZHANG, Fuyin; SUN, Bo; LIU, Yuehua; LIU, Tingjiao. Carcinoma-associated fibroblast-derived lysyl oxidase-rich extracellular vesicles mediate collagen crosslinking and promote epithelial-mesenchymal transition via p-FAK/p-paxillin/YAP signaling. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 32, 2 ago. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41368-023-00236-1>.

LIU, Zheqi; ZHANG, Zhen; ZHANG, Yu; ZHOU, Wenkai; ZHANG, Xu; PENG, Canbang; JI, Tong; ZOU, Xin; ZHANG, Zhiyuan; REN, Zhenhu. Spatial transcriptomics reveals that metabolic characteristics define the tumor immunosuppression microenvironment via iCAF

transformation in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 16, n. 1, 30 jan. 2024. DOI <https://doi.org/10.1038/s41368-023-00267-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41368-023-00267-8>. Acesso em: 17 nov. 2024.

LUGINI, Luana; MATARRESE, Paola; TINARI, Antonella; LOZUPONE, Francesco; FEDERICI, Cristina; IESSI, Elisabetta; GENTILE, Massimo; LUCIANI, Francesca; PARMIANI, Giorgio; RIVOLTINI, Licia; MALORNI, Walter; FAIS, Stefano. Cannibalism of Live Lymphocytes by Human Metastatic but Not Primary Melanoma Cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 3629–3638, 1 abr. 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3204>.

LUK, Ian Y.; REEHORST, Camilla M.; MARIADASON, John M. ELF3, ELF5, EHF and SPDEF Transcription Factors in Tissue Homeostasis and Cancer. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 2191, 30 ago. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23092191>.

LV, Tianzhu; LIU, Hongjing; MAO, Ling; SONG, Yanrong; LIAO, Lili; ZHONG, Kun; SHUAI, Binbin; LUO, Yingkun; GUO, Tingting; HUANG, Wentao; ZHANG, Shenyongjie. Cancer-associated fibroblast-derived extracellular vesicles promote lymph node metastases in oral cavity squamous cell carcinoma by encapsulating ITGB1 and BMI1. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 113, 22 jan. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12885-024-11855-0>.

LV, Yanyan; SUI, Fang; MA, Jingjing; REN, Xiaojuan; YANG, Qi; ZHANG, Yanfang; GUAN, Haixia; SHI, Bingyin; HOU, Peng; JI, Meiju. Increased expression of EHF contributes to thyroid tumorigenesis through transcriptionally regulating *HER2* and *HER3*. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 36, p. 57978–57990, 6 set. 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11154>.

MA, Xiangrui; ZHAO, Dan; LIU, Shan; ZUO, Jinhua; WANG, Wenlong; WANG, Fang; LI, Yourui; DING, Zhangfan; WANG, Jing; WANG, Xiaoyi. FERMT2 upregulation in CAFs enhances EMT of OSCC and M2 macrophage polarization. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 991–1003, abr. 2024. <https://doi.org/10.1111/odi.14610>.

MAO, Xiaoqi; XU, Jin; WANG, Wei; LIANG, Chen; HUA, Jie; LIU, Jiang; ZHANG, Bo; MENG, Qingcai; YU, Xianjun; SHI, Si. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 131, 11 out. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01428-1>.

MARQUES, Inês Alexandra; FERNANDES, Carolina; TAVARES, Nuno Tiago; PIRES, Ana Salomé; ABRANTES, Ana Margarida; BOTELHO, Maria Filomena. Magnetic-Based Human Tissue 3D Cell Culture: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 12681, 21 out. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232012681>.

MARQUES, Joana Rita Oliveira Faria; GONZÁLEZ-ALVA, Patricia; YU-TONG LIN, Ruby; FERREIRA FERNANDES, Beatriz; CHAURASIA, Akhilanand; DUBEY, Nileshkumar. Advances in tissue engineering of cancer microenvironment-from three-dimensional culture to three-dimensional printing. **SLAS Technology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 152–164, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.slant.2023.03.005>.

MATSCHEGEWSKI, Claudia; KOWALSKI, Anja; MÜLLER, Knut; TELLER, Henrik;

GRABOW, Niels; GROSSMANN, Swen; SCHMITZ, Klaus-Peter; SIEWERT, Stefan. Biocompatibility of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Current Directions in Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 573–576, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1515/cdbme-2019-0144>.

MAYER, Shimrit; MILO, Tomer; ISAACSON, Achinoam; HALPERIN, Coral; MIYARA, Shoval; STEIN, Yaniv; LIOR, Chen; PEVSNER-FISCHER, Meirav; TZAHOR, Eldad; MAYO, Avi; ALON, Uri; SCHERZ-SHOVAL, Ruth. The tumor microenvironment shows a hierarchy of cell-cell interactions dominated by fibroblasts. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 5810, 19 set. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41518-w>.

MEHTA, Geeta; HSIAO, Amy Y.; INGRAM, Marylou; LUKER, Gary D.; TAKAYAMA, Shuichi. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 192–204, dez. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>.

MEHTA, Viraj; VILIKKATHALA SUDHAKARAN, Sukanya; NELLORE, Vijaykumar; MADDURI, Srinivas; RATH, Subha Narayan. 3D stem-like spheroids-on-a-chip for personalized combinatorial drug testing in oral cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 344, 18 jun. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02625-y>.

MENG, Wenxia; XIA, Qingjie; WU, Lanyan; CHEN, Sixiu; HE, Xin; ZHANG, Lin; GAO, Qinghong; ZHOU, Hongmei. Downregulation of TGF-beta receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 88, 28 fev. 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-88>.

MIAO, Cheng; LIU, Liu; CAO, Yubin; JIANG, Zhishen; DING, Zhangfan; CHEN, Yafei; LI, Honglin; MA, Zhongkai; MA, Pingchuan; ZHANG, Gaowei; LI, Longjiang; LI, Chunjie. OSCC-derived EVs educate fibroblasts and remodel collagen landscape. **Matrix Biology**, [s. l.], v. 134, p. 132–143, 1 dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2024.10.004>.

MILLER, Kimberly D.; NOGUEIRA, Leticia; MARIOTTO, Angela B.; ROWLAND, Julia H.; YABROFF, K. Robin; ALFANO, Catherine M.; JEMAL, Ahmedin; KRAMER, Joan L.; SIEGEL, Rebecca L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 363–385, 11 jun. 2019. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21565>.

MIRABELLI, Peppino; COPPOLA, Luigi; SALVATORE, Marco. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1098, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>.

MITSUI, Yozo; CHANG, Inik; KATO, Taku; HASHIMOTO, Yutaka; YAMAMURA, Soichiro; FUKUHARA, Shinichiro; WONG, Darryn K.; SHIINA, Marisa; IMAI-SUMIDA, Mitsuho; MAJID, Shahana; SAINI, Sharanjot; SHIINA, Hiroaki; NAKAJIMA, Koichi; DENG, Guoren; DAHIYA, Rajvir; TANAKA, Yuichiro. Functional role and tobacco smoking effects on methylation of *CYP1A1* gene in prostate cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 31, p. 49107–49121, 2 ago. 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9470>.

MIYAMOTO, Sho; NISHIKIORI, Nami; SATO, Tatsuya; WATANABE, Megumi; UMETSU, Araya; TSUGENO, Yuri; HIKAGE, Fumihito; SASAYA, Takashi; KATO,

Hirota; OGI, Kazuhiro; FURUHASHI, Masato; OHGURO, Hiroshi; MIYAZAKI, Akihiro. Three-Dimensional Spheroid Configurations and Cellular Metabolic Properties of Oral Squamous Carcinomas Are Possible Pharmacological and Pathological Indicators. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2793, jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15102793>.

MOHAMAD, Issa; GLAUN, Mica D.E.; PRABHASH, Kumar; BUSHERI, Ahmed; LAI, Stephen Y.; NORONHA, Vanita; HOSNI, Ali. Current Treatment Strategies and Risk Stratification for Oral Carcinoma. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, [s. l.], n. 43, p. e389810, maio 2023. https://doi.org/10.1200/EDBK_389810.

MOHIUDDIN, Ismail S.; WEI, Sung-Jen; KANG, Min H. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1866, n. 4, p. 165432, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>.

MOUSAVI, S. Sajede; RAZI, Sara. Cell-in-cell structures are involved in the competition between cells in breast cancer. [s. l.], dez. 2021. DOI 10.48550/arxiv.2112.13271. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2112.13271v1>.

NAVALE, Archana M.; DESHPANDE, Atharva; MISTRY, Bini; CHAUHAN, Premal; BHAGAT, Charansharan. Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 114–126, jan. 2024. <https://doi.org/10.2174/1568009623666230511113916>.

NELSON, Celeste M.; BISSELL, Mina J. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 287–309, 1 nov. 2006. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.22.010305.104315>.

NORONHA, Vanita; DHANAWAT, Aditya; PATIL, Vijay Maruti; MENON, Nandini; SINGH, Ajay Kumar; CHATURVEDI, Pankaj; PAI, Prathamesh; CHAUKAR, Devendra; LASKAR, Sarbani Ghosh; PRABHASH, Kumar. Long-term outcomes of neo-adjuvant chemotherapy on borderline resectable oral cavity cancers: Real-world data of 3266 patients and implications for clinical practice. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 148, p. 106633, jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2023.106633>.

OKUYAMA, Kohei; FUKUSHIMA, Hiromasa; NARUSE, Tomofumi; YANAMOTO, Souichi. Cell-in-cell structure in cancer: evading strategies from anti-cancer therapies. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 13, p. 1248097, 18 set. 2023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1248097>.

ONO, Kisho; SATO, Kohei; NAKAMURA, Tomoya; YOSHIDA, Yume; MURATA, Shogo; YOSHIDA, Kunihiro; KANEMOTO, Hideka; UMEMORI, Koki; KAWAI, Hotaka; OBATA, Kyoichi; RYUMON, Shoji; HASEGAWA, Kazuaki; KUNISADA, Yuki; OKUI, Tatsuo; IBARAGI, Soichiro; NAGATSUKA, Hitoshi; SASAKI, Akira. Reproduction of the Antitumor Effect of Cisplatin and Cetuximab Using a Three-dimensional Spheroid Model in Oral Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 1320–1333, 2022. <https://doi.org/10.7150/ijms.74109>.

OSTAPOWICZ, Julia; OSTROWSKA, Kamila; GOLUSIŃSKI, Wojciech; KULCENTY,

Katarzyna; SUCHORSKA, Wiktoria M. Improving therapeutic strategies for Head and Neck Cancer: Insights from 3D hypoxic cell culture models in treatment response evaluation. **Advances in Medical Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 368–376, set. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2024.07.007>.

OVERHOLTZER, Michael; MAILLEUX, Arnaud A.; MOUNEIMNE, Ghassan; NORMAND, Guillaume; SCHNITT, Stuart J.; KING, Randall W.; CIBAS, Edmund S.; BRUGGE, Joan S. A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. **Cell**, [s. l.], v. 131, n. 5, p. 966–979, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>.

PAN, Xue; XU, Xun; WANG, Lixuan; ZHANG, Siyuan; CHEN, Yingyao; YANG, Rongchun; CHEN, Xijuan; CHENG, Bin; XIA, Juan; REN, Xianyue. BASP1 is a prognostic biomarker associated with immunotherapeutic response in head and neck squamous cell carcinoma. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 13, jan. 2023. Doi 10.3389/FONC.2023.1021262/FULL. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9911441/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9911441/) [/pmc/articles/PMC9911441/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9911441/?report=abstract) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9911441/>.

PANDEY, Mamta; SINGH, Sudhakar; YADAV, Monica; SINGH, Dheer; ONTERU, Suneel Kumar. Transcriptome analysis of buffalo granulosa cells in three dimensional culture systems. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 287–301, 18 mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/MRD.23465>.

PARK, Seo Hye; PARK, Jeongbin; KIM, Jiwon; CHOI, Hongyoon; KIM, In Gul; CHUNG, Eun-Jae; NA, Kwon Joong. Analysis of Unmapped RNA-seq Data from Cancer Spatial Transcriptome to Decipher Cancer Microbiome. [s. l.], 11 jun. 2024. Doi 10.1101/2024.06.09.598160. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.06.09.598160>. Acesso em: 19 maio 2025. PARKINSON, Eric Kenneth; JAMES, Emma L.; PRIME, Stephen S. Senescence-Derived Extracellular Molecules as Modulators of Oral Cancer Development: A Mini-Review. **Gerontology**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 417–424, 2016. <https://doi.org/10.1159/000440954>.

PATEL, Jignesh; MITRA, Ashim K. Strategies to overcome simultaneous P-glycoprotein mediated efflux and CYP3A4 mediated metabolism of drugs. **Pharmacogenomics**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 401–415, nov. 2001. <https://doi.org/10.1517/14622416.2.4.401>.

PATEL, Yashvi; PRAJAPATI, Akhilesh. Unveiling LGR5: Prostate cancer's hidden stem cell and treatment target. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 438–446, dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2024.10.001>.

PATNI, Anjali P.; HARISHANKAR, M. K.; JOSEPH, Joel P.; SREESHMA, Bhuvanadas; JAYARAJ, Rama; DEVI, Ariketh. Comprehending the crosstalk between Notch, Wnt and Hedgehog signaling pathways in oral squamous cell carcinoma - clinical implications. **Cellular Oncology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 473–494, jun. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00591-3>.

PEKAREK, Leonel; GARRIDO-GIL, Maria; SÁNCHEZ-CENDRA, Alicia; CASSINELLO, Javier; PEKAREK, Tatiana; FRAILE-MARTINEZ, Oscar; GARCÍA-MONTERO, Cielo; LOPEZ-GONZALEZ, Laura; RIOS-PARRA, Antonio; ÁLVAREZ-MON, Melchor; ACERO,

Julio; DIAZ-PEDRERO, Raul; ORTEGA, Miguel. Emerging histological and serological biomarkers in oral squamous cell carcinoma: Applications in diagnosis, prognosis evaluation and personalized therapeutics (Review). **Oncology Reports**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 213, 20 out. 2023. <https://doi.org/10.3892/or.2023.8650>.

PIWOCKA, Oliwia; PIOTROWSKI, Igor; SUCHORSKA, Wiktoria M.; KULCENTY, Katarzyna. Dynamic interactions in the tumor niche: how the cross-talk between CAFs and the tumor microenvironment impacts resistance to therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 11, p. 1343523, 22 fev. 2024. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1343523>.

PRINCIPE, Simona; MEJIA-GUERRERO, Salvador; IGNATCHENKO, Vladimir; SINHA, Ankit; IGNATCHENKO, Alexandr; SHI, Willa; PEREIRA, Keira; SU, Susie; HUANG, Shao Hui; O'SULLIVAN, Brian; XU, Wei; GOLDSTEIN, David P.; WEINREB, Ilan; AILLES, Laurie; LIU, Fei-Fei; KISLINGER, Thomas. Proteomic Analysis of Cancer-Associated Fibroblasts Reveals a Paracrine Role for MFAP5 in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 2045–2059, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00925>.

QIE, Shuo; XIONG, Haijuan; LIU, Yaqi; YAN, Chenhui; WANG, Yalei; TIAN, Lifeng; WANG, Chenguang; SANG, Nianli. Stanniocalcin 2 governs cancer cell adaptation to nutrient insufficiency through alleviation of oxidative stress. [s. l.], 27 fev. 2024. DOI 10.21203/rs.3.rs-3904465/v1. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3904465/v1>. Acesso em: 19 maio 2025.

QIU, Jingjian; JIANG, Erhui; SHANG, Zhengjun. Prognostic value of tumor-stroma ratio in oral carcinoma: Role of cancer-associated fibroblasts. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 1967–1978, jul. 2023. <https://doi.org/10.1111/odi.14203>.

RISOM, Tyler; GLASS, David R.; AVERBUKH, Inna; LIU, Candace C.; BARANSKI, Alex; KAGEL, Adam; MCCAFFREY, Erin F.; GREENWALD, Noah F.; RIVERO-GUTIÉRREZ, Belén; STRAND, Siri H.; VARMA, Sushama; KONG, Alex; KEREN, Leeat; SRIVASTAVA, Sucheta; ZHU, Chunfang; KHAIR, Zumana; VEIS, Deborah J.; DESCHRYVER, Katherine; VENNAM, Sujay; MALEY, Carlo; HWANG, E. Shelley; MARKS, Jeffrey R.; BENDALL, Sean C.; COLDITZ, Graham A.; WEST, Robert B.; ANGELO, Michael. Transition to invasive breast cancer is associated with progressive changes in the structure and composition of tumor stroma. **Cell**, [s. l.], v. 185, n. 2, p. 299–310.e18, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.12.023>.

RUAN, Banzhan; NIU, Zubiao; JIANG, Xiaoyi; LI, Zhuo; TAI, Yanhong; HUANG, Hongyan; SUN, Qiang. High Frequency of Cell-in-Cell Formation in Heterogeneous Human Breast Cancer Tissue in a Patient With Poor Prognosis: A Case Report and Literature Review. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, p. 1444, 19 dez. 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01444>.

RUAN, Banzhan; WANG, Chenxi; CHEN, Ang; LIANG, Jianqing; NIU, Zubiao; ZHENG, You; FAN, Jie; GAO, Lihua; HUANG, Hongyan; WANG, Xiaoning; SUN, Qiang. Expression profiling identified IL-8 as a regulator of homotypic cell-in-cell formation. **BMB Reports**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 412–417, 31 ago. 2018. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.8.089>.

RUNA, F.; HAMALIAN, S.; MEADE, K.; SHISGAL, P.; GRAY, P. C.; KELBER, J. A. Tumor Microenvironment Heterogeneity: Challenges and Opportunities. **Current Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 218–229, dez. 2017. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0073-7>.

SALINAS-VERA, Yarely M.; VALDÉS, Jesús; PÉREZ-NAVARRO, Yussel; MANDUJANO-LAZARO, Gilberto; MARCHAT, Laurence A.; RAMOS-PAYÁN, Rosalio; NUÑEZ-OLVERA, Stephanie I.; PÉREZ-PLASCENCIA, Carlos; LÓPEZ-CAMARILLO, César. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, p. 2198, maio 2022. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.826113/BIBTEX>.

SALUJA, Tajindra Singh; KUMAR, Vijay; AGRAWAL, Monika; TRIPATHI, Abhilasha; MEHER, Rajesh Kumar; SRIVASTAVA, Kamini; GUPTA, Anurag; SINGH, Anjana; CHATURVEDI, Arun; SINGH, Satyendra Kumar. Mitochondrial Stress–Mediated Targeting of Quiescent Cancer Stem Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Management and Research**, [s. l.], v. 12, p. 4519, 15 jun. 2020. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S252292>.

SAQUEL, Cristian; GRACIA, Celine; VIARIS DE LESEGNO, Christine; VERWEIJ, Frederik; URENA-MARTIN, Carlos; RAPOSO, Graça; LAMAZE, Christophe. Caveolin-1 and mechanical stress control the release of a pro-metastatic subpopulation of small extracellular vesicles. [s. l.], 8 set. 2024. DOI 10.1101/2024.09.05.611225. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.09.05.611225>. Acesso em: 14 mar. 2025.

SARODE, Gargi S.; SARODE, Sachin C.; KARMARKAR, Swarada. Complex cannibalism: An unusual finding in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. e4–e6, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.08.013>.

SARODE, Sachin C.; SARODE, Gargi S. Cellular cannibalism in central and peripheral giant cell granuloma of the oral cavity can predict biological behavior of the lesion. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 459–463, 20 set. 2013. <https://doi.org/10.1111/jop.12119>.

SARODE, Sachin C.; SARODE, Gargi S. Neutrophil-tumor cell cannibalism in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 454–458, 23 jan. 2014. <https://doi.org/10.1111/jop.12157>.

SCHENKER, Hannah; BÜTTNER-HEROLD, Maike; FIETKAU, Rainer; DISTEL, Luitpold V. Cell-in-cell structures are more potent predictors of outcome than senescence or apoptosis in head and neck squamous cell carcinomas. **Radiation Oncology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, jan. 2017. <https://doi.org/10.1186/S13014-016-0746-Z/FIGURES/4>.

SCHMITD, Ligia B.; PEREZ-PACHECO, Cindy; BELLILE, Emily L.; WU, Weisheng; CASPER, Keith; MIERZWA, Michelle; ROZEK, Laura S.; WOLF, Gregory T.; TAYLOR, Jeremy M.G.; D’SILVA, Nisha J. Spatial and Transcriptomic Analysis of Perineural Invasion in Oral Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 28, n. 16, p. 3557–3572, 15 ago. 2022. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4543>.

SCHREIBER, Maria; WEIGELT, Marc; KARASINSKY, Anne; ANASTASSIADIS, Konstantinos; SCHALLENBERG, Sonja; PETZOLD, Cathleen; BONIFACIO, Ezio; KRETSCHMER, Karsten; HOMMEL, Angela. Inducible IL-7 Hyperexpression Influences Lymphocyte Homeostasis and Function and Increases Allograft Rejection. **Frontiers in**

Immunology, [s. l.], v. 10, p. 742, 10 abr. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00742>. SCHULZE, Arik Bernard; SCHMIDT, Lars Henning; HEITKÖTTER, Birthe; HUSS, Sebastian; MOHR, Michael; MARRA, Alessandro; HILLEJAN, Ludger; GÖRLICH, Dennis; BARTH, Peter J.; REHKÄMPER, Jan; EVERS, Georg. Prognostic impact of CD34 and SMA in cancer-associated fibroblasts in stage I–III NSCLC. **Thoracic Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 120–129, 24 nov. 2019. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13248>.

SEKIGUCHI, Shohei; YOROZU, Akira; OKAZAKI, Fumika; NIINUMA, Takeshi; TAKASAWA, Akira; YAMAMOTO, Eiichiro; KITAJIMA, Hiroshi; KUBO, Toshiyuki; HATANAKA, Yui; NISHIYAMA, Koyo; OGI, Kazuhiro; DEHARI, Hironari; KONDO, Atsushi; KUROSE, Makoto; OBATA, Kazufumi; KAKIUCHI, Akito; KAI, Masahiro; HIROHASHI, Yoshihiko; TORIGOE, Toshihiko; KOJIMA, Takashi; OSANAI, Makoto; TAKANO, Kenichi; MIYAZAKI, Akihiro; SUZUKI, Hiromu. ACLP Activates Cancer-Associated Fibroblasts and Inhibits CD8+ T-Cell Infiltration in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 17, p. 4303, 28 ago. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15174303>.

SHARMA, Deepti; KOSHY, George; GROVER, Sonal; KOSHY, Shinu. Cellular cannibalism: An insight. **CHRISMED Journal of Health and Research**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 14, 2015. <https://doi.org/10.4103/2348-3334.149339>.

SHARON, Yoray; ALON, Lina; GLANZ, Sarah; SERVAIS, Charlotte; EREZ, Neta. Isolation of Normal and Cancer-associated Fibroblasts from Fresh Tissues by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 71, p. 4425, 14 jan. 2013. <https://doi.org/10.3791/4425>.

SHETH, Maulee; SHARMA, Manju; LEHN, Maria; REZA, HasanAl; TAKEBE, Takanori; TAKIAR, Vinita; WISE-DRAPER, Trisha; ESFANDIARI, Leyla. Three-dimensional matrix stiffness modulates mechanosensitive and phenotypic alterations in oral squamous cell carcinoma spheroids. **APL Bioengineering**, [s. l.], v. 8, n. 3, 31 jul. 2024. DOI 10.1063/5.0210134. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39092008/>. Acesso em: 19 nov. 2024.

SHI, Xuemeng; WEN, Zeyu; WANG, Yajun; LIU, Yan-Jun; SHI, Kun; JIU, Yaming. Feedback-Driven Mechanisms Between Phosphorylated Caveolin-1 and Contractile Actin Assemblies Instruct Persistent Cell Migration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 665919, 12 abr. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665919>.

SHRI, Meena; AGRAWAL, Himanshu; RANI, Payal; SINGH, Dheer; ONTERU, Suneel Kumar. Hanging Drop, A Best Three-Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–14, 26 abr. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01355-6>.

SHRIVASTAVA, Nitisha; CHAVEZ, Claudia Gutierrez; LI, Daniel; MEHTA, Vikas; THOMAS, Carlos; FULCHER, Cory D.; KAWACHI, Nicole; BOTTALICO, Danielle M.; PRYSTOWSKY, Michael B.; BASU, Indranil; GUHA, Chandan; OW, Thomas J. CDK4/6 Inhibition Induces Senescence and Enhances Radiation Response by Disabling DNA Damage Repair in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 2005, 28 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15072005>.

SIDDIQUI, Safia; SINGH, Anil; FAIZI, Nafis; KHALID, Aeman. Cell cannibalism in oral

cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 631–637, 2019. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_504_17.

SILVA, João P. N.; PINTO, Bárbara; MONTEIRO, Luís; SILVA, Patrícia M. A.; BOUSBAA, Hassan. Combination Therapy as a Promising Way to Fight Oral Cancer. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1653, 4 jun. 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061653>.

SIMÓN, L.; CAMPOS, A.; LEYTON, L.; QUEST, A. F. G. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 435–453, jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09890-x>.

SIQUARA DA ROCHA, Leonardo de Oliveira; SOUZA, Bruno Solano de Freitas; COLETTA, Ricardo Della; LAMBERT, Daniel W.; GURGEL ROCHA, Clarissa A. Mapping Cell-in-Cell Structures in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 2418, 8 out. 2023. <https://doi.org/10.3390/CELLS12192418>.

SIQUARA DA ROCHA, Leonardo de Oliveira; SOUZA, Bruno Solano de Freitas; LAMBERT, Daniel W.; GURGEL ROCHA, Clarissa de Araújo. Cell-in-Cell Events in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, n. June, p. 1–11, 30 jun. 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.931092>.

SON, Sung Wook; CHO, Eunho; CHO, Hanbyoul; WOO, Seon Rang; LEE, Hyo-Jung; OH, Se Jin; KIM, Suyeon; KIM, Jae-Hoon; CHUNG, Eun Joo; CHUNG, Joon-Yong; KIM, Min Gyu; SONG, Kwon-Ho; KIM, Tae Woo. NANOG confers resistance to complement-dependent cytotoxicity in immune-edited tumor cells through up-regulating CD59. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 8652, 23 maio 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12692-6>.

SONG, Jianlu; XU, Ruiyuan; ZHANG, Hui; XUE, Xuemin; RUZE, Rexiati; CHEN, Yuan; YIN, Xinpeng; WANG, Chengcheng; ZHAO, Yupei. Cell-in-Cell–Mediated Entosis Reveals a Progressive Mechanism in Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 165, n. 6, p. 1505-1521.e20, dez. 2023. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.08.035>.

SRIKANTHAN, Prathiksha; MALAKONDAIAH, Suresh; RYNTATHIANG, Iadalin; DHARMALINGAM JOTHINATHAN, Mukesh Kumar. Genetic and molecular insights in oral squamous cell carcinoma therapy - Advancing the horizon. **Oral Oncology Reports**, [s. l.], v. 11, p. 100582, set. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.oor.2024.100582>.

SUAREZ-MARTINEZ, Elisa; SUAZO-SANCHEZ, Irene; CELIS-ROMERO, Manuel; CARNERO, Amancio. 3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 39, dez. 2022. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00775-w>.

SUN, Li-Ping; XU, Kai; CUI, Jing; YUAN, Dao-Ying; ZOU, Bo; LI, Jun; LIU, Jian-Lin; LI, Ke-Yi; MENG, Zhen; ZHANG, Bin. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, [s. l.], 30 jul. 2019. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7255>.

SUN, Qiang; HUANG, Hongyan; OVERHOLTZER, Michael. Cell-in-cell structures are

involved in the competition between cells in human tumors. **Molecular & Cellular Oncology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. e1002707, 23 jan. 2015. <https://doi.org/10.1080/23723556.2014.1002707>.

SUN, Qiang; LUO, Tianzhi; REN, Yixin; FLOREY, Oliver; SHIRASAWA, Senji; SASAZUKI, Takehiko; ROBINSON, Douglas N; OVERHOLTZER, Michael. Competition between human cells by entosis. **Cell Research**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1299–1310, 24 out. 2014. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.138>.

SUN, Wujin; LUO, Zhimin; LEE, Junmin; KIM, Han-Jun; LEE, KangJu; TEBON, Peyton; FENG, Yudi; DOKMECI, Mehmet R.; SENGUPTA, Shiladitya; KHADEMHOSEINI, Ali. Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 8, n. 4, 3 jan. 2019. DOI 10.1002/ADHM.201801363. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30605261/>.

TADIKAMALLA, Neha. Implications of Chemotherapy, Radiation therapy, and Surgical treatment in Oral Cancer. **Journal of Student Research**, [s. l.], v. 13, n. 2, 31 maio 2024. DOI 10.47611/jsrhs.v13i2.6548. Disponível em: <https://www.jsr.org/hs/index.php/path/article/view/6548>. Acesso em: 14 mar. 2025.

TADOKORO, Yoshiaki; TAKEDA, Daisuke; MURAKAMI, Aki; YATAGAI, Nanae; SAITO, Izumi; ARIMOTO, Satomi; KAKEI, Yasumasa; AKASHI, Masaya; HASEGAWA, Takumi. Transcutaneous carbon dioxide application suppresses the expression of cancer-associated fibroblasts markers in oral squamous cell carcinoma xenograft mouse model. **PLoS One**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. e0290357, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290357>.

TAN, May Leng; PARKINSON, E. Kenneth; YAP, Lee Fah; PATERSON, Ian C. Autophagy is deregulated in cancer-associated fibroblasts from oral cancer and is stimulated during the induction of fibroblast senescence by TGF- β 1. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, 12 jan. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79789-8>.

TAN, Yunhan; WANG, Zhihan; XU, Mengtong; LI, Bowen; HUANG, Zhao; QIN, Siyuan; NICE, Edouard C.; TANG, Jing; HUANG, Canhua. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 44, 22 set. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41368-023-00249-w>.

THOMAS, Mahima Rachel; BADEKILA, Anjana Kaveri; PAI, Vishruta; S, Nijil; BHANDARY, Yashodhar; RAI, Ankit; KINI, Sudarshan. Navigating Tumor Microenvironment Barriers with Nanotherapeutic Strategies for Targeting Metastasis. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2403107, 2025. <https://doi.org/10.1002/adhm.202403107>.

TONNESSEN-MURRAY, Crystal A.; FREY, Wesley D.; RAO, Sonia G.; SHAHBANDI, Ashkan; UNGERLEIDER, Nathan A.; OLAYIWOLA, Joy O.; MURRAY, Lucas B.; VINSON, Benjamin T.; CHRISEY, Douglas B.; LORD, Christopher J.; JACKSON, James G. Chemotherapy-induced senescent cancer cells engulf other cells to enhance their survival. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 218, n. 11, p. 3827–3844, 17 set. 2019. <https://doi.org/10.1083/JCB.201904051>.

TONNESSEN-MURRAY, Crystal A.; JACKSON, James G. Engulfment and cannibalism drive persistence of chemotherapy-treated tumor cells: can they be targeted? **Molecular &**

Cellular Oncology, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1688601, 2020.
<https://doi.org/10.1080/23723556.2019.1688601>.

UGAI, Tomotaka; YAO, Qian; UGAI, Satoko; OGINO, Shuji. Advancing precision oncology: Insights into the tumor microenvironment and immunotherapy outcomes. **The Innovation**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 100656, jul. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100656>.

UNNIKRISHNAN, Kavitha; THOMAS, Lynda Velutheril; KUMAR, Ram Mohan Ram. Advancement of Scaffold-Based 3D Cellular Models in Cancer Tissue Engineering: An Update. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, p. 4468, out. 2021.
<https://doi.org/10.3389/FONC.2021.733652/BIBTEX>.

VAN NORMAN, Gail A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. **JACC: Basic to Translational Science**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 845–854, nov. 2019.
<https://doi.org/10.1016/J.JACBTS.2019.10.008>.

VERED, Marilena; SHNAIDERMAN-SHAPIRO, Anna; ZLOTOGORSKI-HURVITZ, Ayelet; SALO, Tuula; YAHALOM, Ran. Cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment of tongue carcinoma is a heterogeneous cell population. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 121, n. 8, p. 151446, nov. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151446>.

VIDAVSKY, Netta; KUNITAKE, Jennie AMR.; CHIOU, Aaron E.; NORTHRUP, Paul A.; PORRI, Teresa J.; LING, Lu; FISCHBACH, Claudia; ESTROFF, Lara A. Studying biomineralization pathways in a 3D culture model of breast cancer microcalcifications. **Biomaterials**, [s. l.], v. 179, p. 71–82, out. 2018.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.06.030>.

WANG, Liping; WANG, Dujuan; ZENG, Xiaojiao; ZHANG, Qian; WU, Huiqing; LIU, Jie; WANG, Yang; LIU, Guohong; PAN, Yunbao. Exploration of spatial heterogeneity of tumor microenvironment in nasopharyngeal carcinoma via transcriptional digital spatial profiling. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 2256–2269, 2023.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.74653>.

WANG, Ruizhi; ZHONG, Hao; WANG, Chenxi; HUANG, Xiaohui; HUANG, Anpei; DU, Nannan; WANG, Dong; SUN, Qiang; HE, Meifang. Tumor malignancy by genetic transfer between cells forming cell-in-cell structures. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 14, n. 3, 13 mar. 2023. DOI <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05707-1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-023-05707-1>. Acesso em: 21 nov. 2024.

WANG, Wei-Zhou; CAO, Xue; BIAN, Li; GAO, Yue; YU, Ming; LI, Yi-Ting; XU, Jian-Guo; WANG, Yang-Hao; YANG, He-Feng; YOU, Ding-Yun; HE, Yong-Wen. Analysis of mRNA-miRNA interaction network reveals the role of CAFs-derived exosomes in the immune regulation of oral squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 591, 26 jun. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11028-5>.

WANG, Xin; CAO, Yingyue; BOPAN, Bo; MENG, Qingwei; YU, Yan. High BASP1 Expression is Associated with Poor Prognosis and Promotes Tumor Progression in Human Lung Adenocarcinoma. **Cancer Investigation**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 409–422, 28 maio 2021.
<https://doi.org/10.1080/07357907.2021.1910290>.

WANG, Xinlong; LI, Yilong; LI, Jiating; LI, Le; ZHU, Hong; CHEN, Hua; KONG, Rui; WANG, Gang; WANG, Yongwei; HU, Jisheng; SUN, Bei. Cell-in-Cell Phenomenon and Its Relationship With Tumor Microenvironment and Tumor Progression: A Review. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, p. 311, dez. 2019. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00311/BIBTEX>.

WANG, Xu; WANG, Xin; XU, Midie; SHENG, Weiqi. Effects of CAF-Derived MicroRNA on Tumor Biology and Clinical Applications. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 13, p. 3160, 24 jun. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13133160>.

WANG, Yujia; JING, Yue; DING, Liang; ZHANG, Xiaoxin; SONG, Yuxian; CHEN, Sheng; ZHAO, Xingxing; HUANG, Xiaofeng; PU, Yumei; WANG, Zhiyong; NI, Yanhong; HU, Qingang. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 274, 24 jun. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1277-x>.

WEI, Ling-Ying; LEE, Jang-Jaer; YEH, Chiou-Yueh; YANG, Chia-Ju; KOK, Sang-Heng; KO, Jenq-Yuh; TSAI, Feng-Chiao; CHIA, Jean-San. Reciprocal activation of cancer-associated fibroblasts and oral squamous carcinoma cells through CXCL1. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 88, p. 115–123, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.11.002>.

WONDERGEM, Niels E. *et al.* Circulating T cell status and molecular imaging may predict clinical benefit of neoadjuvant PD-1 blockade in oral cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. e009278, jul. 2024. <https://doi.org/10.1136/jitc-2024-009278>.

WRIGHT, Kellen; LY, Thuc; KRIET, Matthew; CZIROK, Andras; THOMAS, Sufi Mary. Cancer-Associated Fibroblasts: Master Tumor Microenvironment Modifiers. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1899, 22 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15061899>.

WU, Ning; WANG, YouZhi; WANG, KeKe; ZHONG, BoQiang; LIAO, YiHao; LIANG, JiaMing; JIANG, Ning. Cathepsin K regulates the tumor growth and metastasis by IL-17/CTSK/EMT axis and mediates M2 macrophage polarization in castration-resistant prostate cancer. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 813, 22 set. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05215-8>.

XIA, Bing; QIU, Liqing; YUE, Jing; SI, Jingxing; ZHANG, Hongfang. The metabolic crosstalk of cancer-associated fibroblasts and tumor cells: Recent advances and future perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1879, n. 6, p. 189190, nov. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189190>.

XU, Jianguo; BIAN, Li; YOU, Dingyun; LI, Ziliang; WANG, Tingting; LI, Yiting; REN, Xiaobin; HE, Yongwen. PDGF-BB accelerates TSCC via fibroblast lactates limiting miR-26a-5p and boosting mitophagy. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 5, 2 jan. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03172-6>.

XU, Yuming; JIANG, Erhui; SHAO, Zhe; SHANG, Zhengjun. LncRNA FENDRR in Carcinoma-Associated Fibroblasts Regulates the Angiogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma Through the PI3K/AKT Pathway. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, p. 616576, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.616576>.

YANG, Hao; GOU, Xinyi; FENG, Caizhen; ZHANG, Yinli; GU, Huining; CHAI, Fan; WANG, Yi; YE, Yingjiang; HONG, Nan; HU, Guohua; SUN, Boshi; CHENG, Jin; GAO, Bo. MFAP5+ Cancer-associated fibroblasts promote EMT in gastric cancer via lactylation modification leading to CT-detected extramural venous invasion. [*s. l.*], 14 mar. 2024. DOI 10.21203/rs.3.rs-4075011/v1. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-4075011/v1>. Acesso em: 19 maio 2025.

YANG, Wenbin; ZHANG, Shunhao; LI, Tianle; ZHOU, Zirui; PAN, Jian. Single-cell analysis reveals that cancer-associated fibroblasts stimulate oral squamous cell carcinoma invasion via the TGF- β /Smad pathway. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [*s. l.*], v. 55, n. 2, p. 262–273, 25 set. 2022. <https://doi.org/10.3724/abbs.2022132>.

YANG, Xinyu; TU, Jiatao; ZANG, Xinyi; HUANG, Xuan; TAO, Ye. A bibliometric and visualization analysis of entosis research from 2007 to 2024. **Frontiers in Oncology**, [*s. l.*], v. 14, p. 1424100, 28 out. 2024. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1424100>.

YU, Y; XIAO, C-H; TAN, L-D; WANG, Q-S; LI, X-Q; FENG, Y-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. **British Journal of Cancer**, [*s. l.*], v. 110, n. 3, p. 724–732, 12 dez. 2013. <https://doi.org/10.1038/BJC.2013.768>.

ZHANG, Haohong; XIONG, Xinghao; CHENG, Mingyue; JI, Lei; NING, Kang. Deep learning enabled integration of tumor microenvironment microbial profiles and host gene expressions for interpretable survival subtyping in diverse types of cancers. **mSystems**, [*s. l.*], v. 9, n. 12, p. e01395-24, 17 dez. 2024. <https://doi.org/10.1128/msystems.01395-24>.

ZHANG, Hui; ZHANG, Xu; XU, Weiguo; WANG, Jian. TMC5 is Highly Expressed in Human Cancers and Correlates to Prognosis and Immune Cell Infiltration: A Comprehensive Bioinformatics Analysis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [*s. l.*], v. 8, p. 810864, 13 jan. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.810864>.

ZHANG, Jia-Yi; ZHU, Wei-Wen; WANG, Meng-Yao; ZHAI, Run-Dong; WANG, Qiong; SHEN, Wei-Li; LIU, Lai-Kui. Cancer-associated fibroblasts promote oral squamous cell carcinoma progression through LOX-mediated matrix stiffness. **Journal of Translational Medicine**, [*s. l.*], v. 19, n. 1, 20 dez. 2021. DOI 10.1186/S12967-021-03181-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34930321/>.

ZHANG, Qian; DING, Liang; LI, Jingyi; LIU, Kunyu; XIA, Chengwan; CHEN, Sheng; HUANG, Xiaofeng; PU, Yumei; SONG, Yuxian; HU, Qingang; WANG, Yuxin. Single-cell RNA sequencing of OSCC primary tumors and lymph nodes reveals distinct origin and phenotype of fibroblasts. **Cancer Letters**, [*s. l.*], v. 600, p. 217180, 28 set. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.217180>.

ZHANG, Qiuhua; LOU, Yijie; FANG, Hao; SUN, Shaopeng; JIN, Rijuan; JI, Yunxi; CHEN, Zhe. Cancer-associated fibroblasts under therapy-induced senescence in the tumor microenvironment (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, [*s. l.*], v. 27, n. 4, p. 150, 20 fev. 2024. <https://doi.org/10.3892/etm.2024.12438>.

ZHANG, Zheng; LI, Xiaoqing; REN, Shaokun; ZHANG, Wei. CNN1 Represses Bladder Cancer Progression and Metabolic Reprogramming by Modulating HIF-1 α Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, [*s. l.*], v. 12, p. 859707, 12 jul. 2022.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.859707>.

ZHAO, Lei; WESTERHOFF, Maria; HORNICK, Jason L.; KRAUSZ, Thomas; ANTIC, Tatjana; XIAO, Shu-Yuan; HART, John. Loss of microfibril-associated protein 5 (MFAP5) expression in colon cancer stroma. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 476, n. 3, p. 383–390, mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02649-y>.

ZHOU, Bin; ZHUANG, Xiu-mei; WANG, You-yuan; LIN, Zhao-yu; ZHANG, Da-ming; FAN, Song; LI, Jin-song; CHEN, Wei-liang. Tumor necrosis factor α induces myofibroblast differentiation in human tongue cancer and promotes invasiveness and angiogenesis via secretion of stromal cell-derived factor-1. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 1095–1102, dez. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.08.017>.

ZHU, Qionghua *et al.* Guipeng; HOU, Yong; LIU, Longqi; LIU, Shiping; FANG, Liang; CHEN, Wei; WU, Liang. Single cell multi-omics reveal intra-cell-line heterogeneity across human cancer cell lines. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 8170, 9 dez. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43991-9>.

ZHU, Xiayi; QIU, Jie; ZHANG, Ya; LIN, Chunni; WANG, Xiaohui; SHI, Xiwei; YANG, Siya; WU, Qiaoyan; CONG, Li. Neoadjuvant chemoimmunotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 212, p. 107598, fev. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2025.107598>.

APÊNDICE A - Materiais Suplementares

Tabela S1. Caracterização dos datasets do GEO de carcinoma oral de células escamosas (COE).

Type	Linhagem	Series	Code	Caract.
Tumoral	HSC-3	GSE146483	GSM4387010	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE146483	GSM4387014	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE7073	GSM169557	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE84725	GSM2248377	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE235020	GSM7493285	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE235020	GSM7493286	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE235020	GSM7493287	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE235020	GSM7493288	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE160395	GSM4872672	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE160395	GSM4872678	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE160395	GSM4872681	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE160395	GSM4872685	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE114928	GSM3155074	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE108851	GSM2915008	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE39729	GSM978240	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE197263	GSM5911754	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE38823	GSM950317	METASTÁTICA
Tumoral	HSC-3	GSE38823	GSM950318	METASTÁTICA
Normal	Keratinocyte (Kera (I))	GSE146483	GSM4387017	NORMAL
Normal	Keratinocyte (Kera (S))	GSE146483	GSM4387018	NORMAL
Normal	Keratinocyte (Kera (1))	GSE146483	GSM4387019	NORMAL
Normal	HOK	GSE54861	GSM1325302	NORMAL
Normal	HOK	GSE54861	GSM1325303	NORMAL

Tabela S2. Caracterização funcional e relevância biológica no câncer dos genes identificados nos módulos de coexpressão *pink*, *blue* e *green*.

Mód.	Gene (abv.)	Gene (nome completo)	Descrição	Referências
<i>Blue</i>	ACTA2	Actin Alpha 2, Smooth Muscle	Promove metástase e invasão celular	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38884825/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28782893/
<i>Blue</i>	AQP9	Aquaporin 9	Inibe proliferação e metástase em carcinoma	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31969493/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329843/
<i>Blue</i>	ASPN	Asporin	Promove invasão e metástase em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33393151/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34127813/
<i>Blue</i>	BASP1	Brain Abundant Membrane Attached Signal Protein 1	Supressor tumoral, inibe crescimento e metástase	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33426068/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31944520/
<i>Blue</i>	CFHR3	Complement Factor H-Related 3	Supressor tumoral, inibe proliferação e metástase em HCC	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35852862/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31524260/
<i>Blue</i>	COL5A2	Collagen Type V Alpha 2 Chain	Promove invasão e metástase em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37723519/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33607786/
<i>Blue</i>	CTSK	Cathepsin K	Promove metástase e pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29618339/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38856944/

<i>Blue</i>	FBN1	Fibrillin 1	Promove progressão tumoral em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35901491/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35234370/
<i>Blue</i>	IL7R	Interleukin 7 Receptor	Regula progressão tumoral e imunidade em câncer	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36142322/
<i>Blue</i>	LGR5	Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 5	Marcador de células-tronco, associado à progressão e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31966480/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25592865/
<i>Blue</i>	LIF	Leukemia Inhibitory Factor	Promove progressão tumoral e resistência terapêutica em cânceres sólidos	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35685476/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36441800/
<i>Blue</i>	MCEMP1	Mast Cell-Expressed Membrane Protein 1	Associado à infiltração imune e mau prognóstico em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35378772/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35905854/
<i>Blue</i>	MFAP5	Microfibril-Associated Glycoprotein 2	Promove invasão e metástase em COE via fibroblastos associados ao câncer	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37217152/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047565/
<i>Blue</i>	PCOLCE	Procollagen C-Proteinase Enhancer 1	Alta expressão associada a mau prognóstico em glioma	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35609253/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39403870/
<i>Blue</i>	PDGFRB	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta	Superexpressão associada a metástase e pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235327/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36697060/

<i>Blue</i>	PDPN	Podoplanin	Promove invasão, metástase e trombose em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496040/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32441651/
<i>Blue</i>	RETN	Resistin	Polimorfismos associados a risco e prognóstico em diversos cânceres	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39324380/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39747951/
<i>Blue</i>	SEMA3C	Semaphorin 3C	Promove progressão tumoral via vias de sinalização em cânceres sólidos	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38956074/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29348142/
<i>Blue</i>	SFRP2	Secreted Frizzled-Related Protein 2	Promove invasão e metástase em osteossarcoma	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27821163/
<i>Blue</i>	SRPX	Sushi Repeat Containing Protein, X-Linked	Regula invasão e metástase em câncer de ovário	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31638245/
<i>Blue</i>	STC1	Stanniocalcin 1	Superexpressão associada à progressão e invasão em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35042959/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39071498/
<i>Blue</i>	STC2	Stanniocalcin 2	Superexpressão associada a progressão e pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32445747/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26762409/
<i>Blue</i>	THBS2	Thrombospondin 2	Biomarcador salivar potencial para COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24708169/
<i>Blue</i>	THY1	Thy-1 Cell Surface Antigen	Inibição de THY1 reduz carga tumoral em modelo murino de COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36675138/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37427884/

<i>Blue</i>	TMEM52 B	Transmembrane Protein 52B	Regula E-caderina e EGFR, suprimindo invasão e metástase	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33641663/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40025509/
<i>Blue</i>	TNC	Tenascin C	Promove microambiente imune supressor e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32665262/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34290694/
<i>Blue</i>	TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2	Superexpressão associada a pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36230558/
<i>Blue</i>	VCAN	Versican	Superexpressão associada a invasão e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38957320/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36842141/
<i>Green</i>	ACKR1	Atypical Chemokine Receptor 1	Supressor tumoral; regula microambiente imune e metástase	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944146/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37006247/
<i>Green</i>	ACTG2	Actin Gamma 2, Smooth Muscle	Supressor tumoral; inibe proliferação e metástase	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28385530/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37213144/
<i>Green</i>	ADH1C	Alcohol Dehydrogenase 1C	Polimorfismos associados ao risco de COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21705789/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17071628/
<i>Green</i>	ALAS2	5'-Aminolevulinate Synthase 2	Alterações de expressão associadas a progressão tumoral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39217322/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38814500/

<i>Green</i>	AQP2	Aquaporin 2	Interação com MIAC inibe progressão tumoral em HNSCC	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32176498/
<i>Green</i>	AR	Androgen Receptor	Superexpressão associada à progressão e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31366519/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25040852/
<i>Green</i>	ARFGEF 3 ou BIG3	ADP Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 3	Inibe translocação nuclear de PHB2 em câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26052702/
<i>Green</i>	ASCL1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1	Essencial para progressão de câncer neuroendócrino de próstata	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39492677/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39264686/
<i>Green</i>	ASCL3	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 3	Superexpressão associada a câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28123722/
<i>Green</i>	BAMBI	BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor	BAMBI regula metástase via TGF- β /Wnt	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19328798/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39684424/
<i>Green</i>	BMX	Bone Marrow Tyrosine Kinase Gene in X Chromosome	BMX ativa STAT3, promovendo autossuficiência de células-tronco tumorais	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21481791/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28514765/
<i>Green</i>	BTNL9	Butyrophilin Like 9	BTNL9 suprime proliferação e metástase em câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33756341/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37798795/

<i>Green</i>	C7	Complement Component 7	Downregulado em COE; associado à progressão tumoral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37739913/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32887903/
<i>Green</i>	CAPN8	Calpain 8	Superexpressão associada à progressão tumoral em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36590308/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38697284/
<i>Green</i>	CAVIN2	Caveolae Associated Protein 2	Supressor tumoral; inibe proliferação em câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26086332/
<i>Green</i>	CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	Supressor tumoral; mutações associadas a risco aumentado de câncer colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326161/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35743652/
<i>Green</i>	CLIC6	Chloride Intracellular Channel 6	Superexpressão associada a subtipos específicos de câncer de mama e pulmão	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33133130/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39707377/
<i>Green</i>	CNN1	Calponin 1	Supressor tumoral; inibe progressão em câncer de bexiga e mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35903683/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37153789/
<i>Green</i>	CYP2B6	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 6	Polimorfismos associados ao risco de câncer de cabeça e pescoço	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35404482/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23824676/
<i>Green</i>	CYP2F1	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily F Member 1	Polimorfismos genéticos identificados em pacientes com câncer de pulmão	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17327131/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15897573/

<i>Green</i>	CYP4B1	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily B Member 1	Polimorfismos associados ao risco de câncer de pulmão	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37950293/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33592039/
<i>Green</i>	DMBT1	Deleted in Malignant Brain Tumors 1	Supressor tumoral; expressão reduzida em cânceres gastrointestinais	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10749143/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9888459/
<i>Green</i>	DPT	Dermatopontin	Supressão de adesão celular e aumento da invasividade em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21796630/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36774339/
<i>Green</i>	EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Superexpressão associada à progressão e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401964/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21785818/
<i>Green</i>	FGFBP2	Fibroblast Growth Factor Binding Protein 2	Superexpresso associado a progressão em carcinoma oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39558101/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39558101/
<i>Green</i>	FOXA1	Forkhead Box A1	Promove proliferação e metástase em carcinoma oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34101624/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31243370/
<i>Green</i>	FOXI1	Forkhead Box I1	Ativa genes promotores de malignidade em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33610681/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32812119/
<i>Green</i>	FOXJ1	Forkhead Box J1	Supressor tumoral em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24809300/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209947/

<i>Green</i>	GATM	Glycine Amidinotransferase	Superexpressão associada à progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811821 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39922150
<i>Green</i>	GPC3	Glypican 3	Superexpressão associada à progressão em carcinoma hepatocelular	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29935166 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39113871
<i>Green</i>	HEPACA M2	Hepatocyte Cell Adhesion Molecule 2	Superexpressão associada à progressão em câncer de pulmão de pequenas células	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39301750 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39492767
<i>Green</i>	HMGCS2	3-Hydroxy-3- Methylglutaryl-CoA Synthase 2	Superexpressão associada à progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27816970 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31779269
<i>Green</i>	IGF1	Insulin-like Growth Factor 1	Estimula proliferação, invasão e EMT em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32899449 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30689967
<i>Green</i>	INMT	Indolethylamine N- Methyltransferase	Superexpressão associada à progressão em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36818393 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34587977
<i>Green</i>	KIT	Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase	Polimorfismos associados ao risco de câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27186940 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25980437
<i>Green</i>	KRT20	Keratin 20	Marcador diagnóstico e prognóstico em carcinoma oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35896219 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37131897

<i>Green</i>	KRT7	Keratin 7	Expressão alterada em carcinoma oral associado ao HPV	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31994197 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34277876
<i>Green</i>	LPL	Lipoprotein Lipase	Regula metabolismo lipídico e progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34803493 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38958445
<i>Green</i>	LYVE1	Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1	Superexpressão associada à metástase linfática em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674563 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34791715
<i>Green</i>	MCF2L	MCF.2 Cell Line Derived Transforming Sequence-Like	Superexpressão associada à progressão em carcinoma oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32860508 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36700469
<i>Green</i>	MEDAG	Mesenteric Estrogen Dependent Adipogenesis	Envolvido em diferenciação e progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33462219 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35864962
<i>Green</i>	MLPH	Melanophilin	Superexpressão associada à progressão em carcinoma oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34829479 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37300684
<i>Green</i>	MMRN1	Multimerin 1	Superexpressão associada à progressão e pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36081907 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33949771
<i>Green</i>	OGN	Osteoglycin	Regula proliferação e progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35513835 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32922434

<i>Green</i>	OPRPN	Opiorphin Prepropeptide	Superexpressão associada à progressão tumoral em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35856431 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35856431
<i>Green</i>	PCP4	Purkinje Cell Protein 4	Regula proliferação e motilidade em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35008217 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32641824
<i>Green</i>	PCSK2	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 2	Associado à progressão tumoral em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32794589 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39034588
<i>Green</i>	PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha	Superexpressão associada à metástase linfática e pior prognóstico em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235327 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32411595
<i>Green</i>	PLAC9	Placenta-Specific 9	Inibe a proliferação de células tumorais em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34123785 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34123785
<i>Green</i>	PPARG	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma	Regula proliferação, apoptose e ferroptose em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34697317 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38786003
<i>Green</i>	PPP1R1B	Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 1B	Redução da expressão associada à progressão em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32768595 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36484412
<i>Green</i>	PTGDS	Prostaglandin D2 Synthase	Inibição da progressão tumoral em câncer oral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34743203 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34116656

<i>Green</i>	PTN	Pleiotrophin	Promove proliferação, angiogênese e metástase em COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37960806/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30427932/
<i>Green</i>	RTKN2	Rhotekin 2	Supressor tumoral em câncer colorretal e pulmonar	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38805063/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36952123/
<i>Green</i>	SCGB2A1	Secretoglobin Family 2A Member 1	Associado à quimiorresistência em câncer colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24585249/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23807163/
<i>Green</i>	SCGN	Secretagogin	Regula migração de macrófagos via NF- κ B em ccRCC	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39664565/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38831128/
<i>Green</i>	SELE	Selectin E	Superexpressão associada a pior prognóstico em câncer colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33845603/
<i>Green</i>	SFRP4	Secreted Frizzled-Related Protein 4	Inativação epigenética ativa via Wnt no COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811686/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34432915/
<i>Green</i>	SMIM24	Small Integral Membrane Protein 24	Mantém tumorigenicidade em carcinoma hepatocelular	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37610679/
<i>Green</i>	SNTN	Sentan	Biomarcador diagnóstico em tumor ovariano seroso	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26512784/
<i>Green</i>	SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2	Promove fenótipo de célula-tronco e invasividade no COE	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38096163/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39180200/

<i>Green</i>	SPDEF	SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor	Atua como supressor tumoral em câncer colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376423/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35951453/
<i>Green</i>	TAT	Tyrosine Aminotransferase	Supressor tumoral em carcinoma hepatocelular	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209601/
<i>Green</i>	TCF15	Transcription Factor 15	Regula expressão de ALKBH5 em leucemia mieloide aguda	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36899424/
<i>Green</i>	TCIM ou TC-1	Thyroid Cancer 1 (TC-1) / C8orf4	Ativa via Wnt/ β -catenina em câncer de pulmão e gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23880650/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16740781/
<i>Green</i>	TFF2	Trefoil Factor 2	Supressor tumoral em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27668303/
<i>Green</i>	TMC5	Transmembrane Channel-like 5	Superexpressão associada a pior prognóstico em câncer pancreático	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36459296/
<i>Green</i>	TMEM100	Transmembrane Protein 100	Supressor tumoral em câncer esofágico e colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38689624/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34422038/
<i>Green</i>	TSPAN19	Tetraspanin 19	Associado a prognóstico em carcinoma papilífero da tireoide	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35992081/
<i>Pink</i>	ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2	Modula resposta à quimioterapia em câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36335375/
<i>Pink</i>	ALDH1A3	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A3	Promove metástase e quimiorresistência em cânceres diversos	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672441/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37753740/

<i>Pink</i>	CAV1	Caveolin-1	Associado à progressão e resistência terapêutica em cânceres	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34762666/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524224/
<i>Pink</i>	CYP1A1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1	Promove proliferação em câncer de mama via supressão de AMPK	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23576571/
<i>Pink</i>	CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4	Contribui para resistência a drogas em cânceres diversos	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38984579/
<i>Pink</i>	DNASE1 L3	Deoxyribonuclease 1 Like 3	Supressor tumoral; modula imunidade antitumoral	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37581941/
<i>Pink</i>	EHF	ETS Homologous Factor	Supressor tumoral em câncer de mama; oncogênico em câncer gástrico	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38781975/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27787520/
<i>Pink</i>	ELF5	E74 Like ETS Transcription Factor 5	Inibe proliferação e invasão em câncer de mama	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34146197/
<i>Pink</i>	FSTL3	Follistatin Like 3	Promove metástase e evasão imunológica em câncer colorretal	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38302412/
<i>Pink</i>	GPX2	Glutathione Peroxidase 2	Promove EMT e metástase em câncer de pulmão	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37287867/
<i>Pink</i>	IL1R2	Interleukin 1 Receptor Type 2	Induz imunossupressão em câncer de mama e pâncreas	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38657120/ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38883575/
<i>Pink</i>	SFTA2	Surfactant Associated 2	Supressor tumoral em câncer de pulmão	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36092941/
<i>Pink</i>	UPK3B	Uroplakin 3B	Marcador diagnóstico em mesotelioma	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36292206/

APÊNDICE B - Artigos Do Autor

SIQUARA DA ROCHA, Leonardo de Oliveira; SOUZA, Bruno Solano de Freitas; COLETTA, Ricardo D.; LAMBERT, Daniel William; GURGEL ROCHA, Clarissa A. Mapping Cell-in-Cell Structures in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cells, Basel**, v. 12, n. 19, p. 2418, 2023. Doi: 10.3390/cells12192418.

ARAÚJO, Taís Bacelar Sacramento de; NOGUEIRA, Raphael Luís Rocha; SIQUARA DA ROCHA, Leonardo de Oliveira; BASTOS, Iasmin Nogueira; DIAS, Rosane Borges; SOUZA, Bruno Solano De Freitas; LAMBERT, Daniel William; COLETTA, Ricardo D.; SILVA, Viviane Aline Oliveira; GURGEL ROCHA, Clarissa A. Enhancing scaffold-free spheroid models: 3D cell bioprinting method for metastatic HSC3–Oral squamous carcinoma cell line. **SLAS Discovery**, v. 29, n. 4, p. 100158, 2024. Doi: 10.1016/j.slasd.2024.100158.