



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



María Isabel Amaya Arbeláez

Análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais e neoplásicas promovida por metabólitos de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



María Isabel Amaya Arbeláez

Análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais e neoplásicas promovida por metabólitos de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral – área de Prótese – da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, Área de Concentração – Prótese.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani
Coorientadora: Dra. Paula Aboud Barbugli

Araraquara

2020

Amaya Arbeláez , María Isabel

Análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais e neoplásicas promovida por metabólitos de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*./ María Isabel Amaya Arbeláez.-- Araraquara: [s.n.], 2020
96 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani
Coorientadora.: Dra. Paula Aboud Barbugli

1. Biofilmes 2. Metabólitos 3. Câncer oral
4. *Candida albicans* 5. *Staphylococcus aureus* I. Título

María Isabel Amaya Arbeláez

Análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais e neoplásicas promovida por metabólitos de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani.

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge.

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling Costa.

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Valeria Valente.

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Claudia Helena Lovato da Silva.

Araraquara, 9 de dezembro de 2020

MARIA ISABEL AMAYA ARBELAEZ

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 12/09/1981- Medellín- Antioquia- Colômbia

Filiação: Rafael Jenaro Amaya Suárez e Luz Amalia Arbeláez Henao

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2001 – 2005: Curso de graduação – Faculdade de Odontologia Universidade CES, Medellín, Antioquia, Colômbia.

2008 – 2010: Curso de Pós-Graduação em Ciências Básicas Biomédicas, área citogenética - Curso de Especialização Faculdade de Medicina Universidade de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colômbia.

2014 – 2016: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Curso de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2016 – 2020: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Curso de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

AGRADECIMENTO

À minha família, em especial aos meus pais, Rafael e Amália, agradeço pelo apoio e o exemplo que me impulsionam a tentar ser uma pessoa melhor, e ao meu irmão Esteban, pelo carinho e todos os momentos de descontração.

Ao Juan Pablo pela ajuda constante, por ser o companheiro de todas as horas, obrigada pelo incentivo, pelo apoio e principalmente pela sua infinita paciência.

Ao professor Carlos Eduardo Vergani e a Paula Barbugli, pelo bom recebimento na sua linha de pesquisa. Agradeço a confiança, a ajuda e orientação durante a realização deste doutorado.

À Professora Valeria Valente do Laboratório de Citologia da FCFar, UNESP, agradeço sua gentileza e por me fazer sentir parte da sua equipe de trabalho em todos os momentos.

Um agradecimento muito especial para os meus amigos e colegas de laboratório Geovana, Rodrigo e Larissa, e ao agregado especial deste grupo Ricardo, agradeço todos os ensinamentos, a companhia, boa disposição e o carinho.

Aos colegas de laboratório de microbiologia aplicada e cultura de células. À Ana Carolina Alves de Paula e Silva, pela ajuda com o desenvolvimento de metodologias e escrita científica.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, por ter me permitido ser parte do programa de pós-graduação em Reabilitação Oral durante este tempo. À coordenadora do programa, a todos os professores, técnicos de laboratório e à seção técnica de pós graduação.

Agradeço à República Federativa do Brasil, ao governo do Estado de São Paulo pelo acolhimento, e por me permitir conhecer o país e a sua valiosa cultura.

Ao Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnologia e Innovación COLCIENCIAS, gobierno de Colombia, pela bolsa e benefícios oferecidos durante 42 meses.

Ao CNPq:

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Código de financiamento 304247/2017-0.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 15/50311-8) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao programa Enlazamundos, da Agência de Educação Superior de Medellín - Sapiencia pela bolsa recebida.

Agradecimento de coração para as minhas queridas amigas Camilla Tasso, Camila Lebre e Aline, obrigada por me lembrar que existe um pedaço de mim em cada uma de vocês. À minha queridíssima Inês, agradecer pelo carinho é muito pouco, obrigada por estar sempre presente em cada momento da minha vida fora de casa. *Al grupo de gringos, gracias por permitirme conocer cada “rinconcito” del mundo desde Araraquara, gracias por el cariño y por supuesto por nuestras infaltables buenas comidas internacionales y fiestas en la embajada mexicana, sede- Araraquara.*

Aos meus amigos da Faculdade especialmente; a todos os meus colegas de pós graduação, obrigada pela companhia, pela amizade, e por todos os ensinamentos valiosos.

A todos os funcionários da biblioteca, agradeço a ajuda e disponibilidade que me deram sempre.

A todos, que durante meu Doutorado, participaram direta ou indiretamente neste caminho e que de alguma maneira me ajudaram na concretização deste estudo, meu muitíssimo obrigada.

“Se derraman más lágrimas por las plegarias atendidas que por aquellas que no son atendidas”. Santa Teresa de Jesús*

*De Jesús ST. Obras completas. Madrid: Biblioteca autores cristianos; 1997.

Amaya Arbeláez MI. Análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais e neoplásicas promovida por metabólitos de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A microbiota oral desempenha um papel importante, tanto no microbioma humano como na saúde. Os micro-organismos presentes na cavidade bucal têm a capacidade de produzir metabólitos e toxinas, gerando relação disbiótica com o hospedeiro e levando ao desenvolvimento de diversas patologias. A inflamação crônica produzida pelo estímulo bacteriano, a inibição da apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio, tem sido descritos como mecanismos de ação da microbiota oral na tumorigênese de cabeça e pescoço. Dados do nosso grupo de pesquisa evidenciam que metabólitos derivados de biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, são capazes de promover resposta inflamatória e morte celular de queratinócitos orais normais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células epiteliais orais normais (NOK-si) e neoplásicas (SCC 25 e Detroit 562) estimuladas com metabólitos (fatores solúveis) provenientes de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*. Para a obtenção dos fatores solúveis (FS) produzidos pelos micro-organismos, foram formados biofilmes jovens e maduros simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, com 16 e 36 horas de cultivo, respectivamente. Os FS foram coletados e incubados com as células epiteliais orais. Primeiramente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por AlamarBlue™ e a morfologia celular foi observada por microscopia confocal para determinar o tempo de exposição das linhagens celulares aos FS dos biofilmes. Realizou-se a análise de perfil do ciclo celular por citometria de fluxo. A análise da expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais foi realizada por qRT-PCR. Em geral, a exposição aos FS de biofilmes de *C. albicans* e misto causou redução na viabilidade das células NOK-si e aumento na fase sub G0 do ciclo celular, com diminuição da expressão gênica em *HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *AKT*, *mTOR*, *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN1B*. No entanto, nesta linhagem, os FS de biofilmes simples de *S. aureus* produziram uma superexpressão do gene *CDKN1A* e *Bcl-2*, seguido pela manutenção da viabilidade celular, e um aumento significativo da população G2/M. Nas células tumorais, SCC 25 e Detroit 562, os estímulos dos FS provenientes dos biofilmes, regularam positivamente proto-oncogenes como *HRAS* e *mTOR*, bem como a superexpressão de *Bcl-2* e *CDKN1A*. As células tumorais apresentaram capacidade de sobrevivência mesmo após 24 h de estímulo com FS de 16 h e 36 h, sem mudanças significativas na progressão do ciclo celular para a linhagem SCC 25 e com uma tendência significativa de aumento de fase G2/M, para a linhagem Detroit 562. Os resultados mostraram que metabólitos provenientes de biofilmes fúngicos e bacterianos de *C. albicans* e *S. aureus*, tanto jovens como maduros, são capazes de gerar alterações ligadas ao processo de tumorigênese, devido à capacidade de promover alterações na viabilidade, dinâmica do ciclo celular e na expressão de genes pro-tumorais e supressores tumorais em linhagens epiteliais orais normais e neoplásicas.

Palavras - chave: Biofilmes. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. Câncer oral. Metabólitos.

Amaya Arbeláez MI. Proto-oncogenes and tumor suppressor genes expression in normal and neoplastic oral epithelial cells stimulated with soluble factors from single and dual biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The oral microbiota plays an important role both in the human microbiome and in health. The microorganisms present in the oral cavity are able to produce metabolites and toxins, generating a dysbiotic relationship with the host and leading to the development of different pathologies. Thus, the aim of this study, was to analyze the expression of proto-oncogenes and tumor suppressor genes in oral epithelial cells, normal (NOK-si), and neoplastic (SCC 25 and Detroit 562) stimulated with metabolites (soluble factors) from single and dual biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. To obtain the soluble factors (SF), biofilms from *C. albicans* and *S. aureus* of 16 h and 36 h were formed. The SF were collected and incubated with the oral epithelial cells. Cell viability assay was performed by AlamarBlue™. The cell morphology was observed by confocal microscopy to determine the exposure time of the cell lines to the biofilms SF. Cell cycle profile analysis was performed by flow cytometry. Proto-oncogenes and tumor suppressor genes expression were analyzed by qRT-PCR. In general, exposure to *C. albicans* and dual SF, caused a reduction in NOK-si cell viability and an increased sub G0 phase of the cell cycle, with a downregulation of *HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *AKT*, *mTOR*, *TP53*, *CDKN1A* and *CDKN1B* genes. However, in this cell line, *S. aureus* SF induced an overexpression of *CDKN1A* and *Bcl2* genes, followed by the cell viability maintenance and a significant increase in the G2/M population. For tumoral cells, SCC 25 and Detroit 562, the stimuli of biofilms SF upregulated oncogenes such as *HRAS* and *MTOR*, as well as *Bcl2* and *CDKN1A* overexpression. These cells could survive even after 24 h of stimuli from both SF (young and older) without significant changes in cell cycle progression for SCC 25 and a significant tendency to increase G2/M phase for Detroit 562. These results point that metabolites from fungal and bacterial biofilms of *C. albicans* and *S. aureus*, can disrupt the homeostasis of normal and neoplastic oral epithelial cells altering proto-oncogenes and tumor suppressor genes expression, remarkably *CDKN1A*, *Bcl2*, *HRAS*, and *mTOR* genes, causing disturbance on cell viability in cells with normal phenotype (NOK-si), and a pro-survival stimuli mainly in neoplastic cell lines (SCC 25 and Detroit 562). In addition, disturbances in cell cycle profile were showed.

Keywords: Biofilms. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. Oral cancer. Metabolites.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Estatísticas Globais do Câncer.....	14
3.2 Câncer de Cabeça e Pescoço.....	15
3.3 Sinais e Sintomas do Câncer de Cabeça e Pescoço.....	16
3.4 Fatores de Risco em Câncer de Cabeça e Pescoço.....	17
3.5 “Hallmarks of Cancer”: Marcadores da Biologia Tumoral.....	18
3.6 Mutações Somáticas Comuns no Câncer de Cabeça e Pescoço.....	20
3.6.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).	20
3.6.2 Via da fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3-K/Akt).....	21
3.6.3 Alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR).....	22
3.6.4 Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)	22
3.6.5 Via de sinalização Janus quinases/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK/STAT).....	23
3.7 Espécies Bacterianas Associadas a Câncer	24
3.7.1 <i>Helicobacter pylori</i>	24
3.7.2 <i>Salmonella entérica sorotipo typhi</i>	24
3.7.3 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	25
3.7.4 <i>Streptococcus bovis</i>	25
3.8 Papel da Microbiota Oral na Carcinogênese de Cabeça e Pescoço.....	26
3.9 Relação entre a Microbiota Oral e o Desenvolvimento de Tumores em Órgãos Distantes.....	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Micro-Organismos e Condições de Armazenamento.....	34
4.2 Obtenção do Inóculo	34
4.3 Formação de Biofilmes	35
4.4 Obtenção dos Fatores Solúveis (FS) Derivados dos Biofilmes	35
4.5 Cultura de Células.....	36
4.5.1 Cultura celular e condições de cultivo	36
4.5.2 Linhagem NOK-SI: queratinócitos orais normais.....	37
4.5.3 Linhagem SCC 25: célula epitelial de carcinoma escamocelular de língua.....	37
4.5.4 Linhagem Detroit 562: célula epitelial metastásica de faringe.....	37
4.5.5 Controle de qualidade: detecção de micoplasma nas culturas celulares	38
4.6 Estímulo das Células com FS Provenientes dos Biofilmes Simples e Misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	38
4.7 Análise da Viabilidade Celular	38

4.8 Análise da Morfologia Celular e Permeabilidade da Membrana por Microscopia Confocal	39
4.9 Análise do Ciclo Celular	40
4.10 Análise da Expressão Gênica	41
4.10.1 Desenho de oligonucleotídeos	41
4.10.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	44
4.10.3 Definição da concentração ótima dos oligonucleotídeos ..	45
4.10.4 Avaliação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos	46
4.11 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Viabilidade Celular	48
5.2 Morfologia Celular e Permeabilidade da Membrana.....	51
5.3 Ciclo Celular	55
5.4 Padronização da Concentração Ótima dos Primers	63
5.5 Eficiência de Amplificação dos Primers.....	66
5.6 Expressão de Proto-Oncogenes e Genes Supressores Tumorais	69
6 DISCUSSÃO.....	82
7 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Os estudos epidemiológicos têm mostrado que cerca de 890.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço (cavidade oral, faringe e laringe) e 450.000 mortes associadas à doença aconteceram no mundo em 2018¹. O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço compreende a grande maioria dos casos diagnosticados. Além de reduzir a qualidade de vida, o tratamento desse câncer altera aspectos funcionais e estéticos do paciente². Este tipo de carcinoma apresenta uma taxa de sobrevivência de 50% em cinco anos, após o diagnóstico³. Os fatores de risco mais significativos para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço incluem o uso de tabaco, o consumo de álcool e infecções por Papilomavírus Humano². Em termos moleculares, a carcinogênese de cabeça e pescoço é um mecanismo que acontece em várias etapas. O acúmulo de diversas alterações genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor resulta na desestabilização dos sistemas de controle do crescimento celular⁴. As vias de sinalização EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK e EGFR/PI3K/AKT/mTOR desempenham um papel central em muitos aspectos desses eventos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência⁵.

O microbioma oral é uma comunidade composta por diversos microorganismos. Aproximadamente 700 espécies residentes, incluindo bactérias, fungos e vírus, estão envolvidas em uma ampla variedade de funções, sendo muitas delas importantes para manter ou restaurar a saúde bucal⁶. O papel do microbioma oral na etiologia e predisposição ao câncer de cabeça e pescoço não tem sido completamente caracterizado até o momento⁶. Possíveis mecanismos relacionados à inflamação crônica, inibição da apoptose, ativação da proliferação celular, e produção de moléculas secretadas por patógenos orais, mesmo em locais distantes do sítio infeccioso, podem contribuir para o surgimento do câncer oral^{7,8,9}.

A relação entre bactérias e câncer ganhou relevância quando o papel patogênico do *Helicobacter pylori* no câncer gástrico foi demonstrado¹⁰. Estudos subsequentes têm associado a carcinogênese com bactérias em outros órgãos, por exemplo, o risco aumentado de carcinoma da vesícula biliar associado à infecção por *Salmonella typhi*¹¹, câncer de pulmão com *Chlamydia pneumoniae*¹², carcinoma de cólon com *Streptococcus bovis*¹³ e câncer pancreático com *Malassezia*¹⁴. Estudos reportam que patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis* e

Fusobacterium nucleatum podem estimular transformações malignas em células epiteliais orais, por meio de receptores Toll-like¹⁵. *Candida albicans* (*C. albicans*), a espécie fúngica mais frequentemente isolada das bases de próteses, tem sido considerada um fator etiológico para doenças potencialmente malignas¹⁶. É reportado que *C. albicans* produz carcinógenos capazes de induzir alterações funcionais e estruturais na replicação do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) e na função das proteínas, promovendo distúrbios no ciclo celular que permitem a ativação de oncogenes¹⁷.

O desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço, tem se manifestado em uma pequena porcentagem dos pacientes, independentemente da presença dos principais fatores de risco estudados¹⁸. Esta afirmação sugere que infecções envolvendo fungos como *C. albicans* e algumas bactérias presentes na cavidade oral, poderiam estar relacionadas à oncogênese de cabeça e pescoço, ou talvez à progressão do tumor^{18,19}. Sabe-se que metabólitos secretados por patógenos orais estão envolvidos com inflamação e distúrbios na resposta celular⁷. A microbiota também pode induzir carcinogênese por meio da liberação de toxinas que podem danificar as células do hospedeiro, levando à inflamação crônica e alterações nos tecidos²⁰.

Tem sido demonstrado que os biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* produzem grandes quantidades de proteinase e fosfolipase-C²¹. Em outro estudo, também foi observado que metabólitos (fatores solúveis) de biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* promoveram resposta inflamatória e morte celular de queratinócitos orais²². Além disso, os fatores solúveis (FS) derivados de biofilmes mistos foram mais tóxicos para as células que os dos biofilmes simples²². Com base nestes resultados, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta celular frente ao tratamento com FS estéreis contendo os metabólitos de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*. Para isso, após o estímulo com os FS derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, foram avaliados o perfil de viabilidade, a progressão no ciclo celular e a expressão gênica de proto-oncogenes e genes supressores tumorais relacionados com as vias de sinalização HRAS/MEK e PI3KCA/AKT/MTOR de células epiteliais normais e neoplásicas orais.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade, dinâmica do ciclo celular e a expressão de genes pro-tumorais e supressores tumorais de células epiteliais orais, normais (NOK-si) e neoplásicas (SCC 25 e Detroit 562), após o contato com metabólitos provenientes de biofilmes jovens (16 h) e maduros (36 h), simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade de células NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 após o estímulo por 4 h, 6 h, 8 h e 24 h com metabólitos, designados fatores solúveis (FS), provenientes de biofilmes jovens (16 h) e maduros (36 h), puros e diluídos simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.
- Analisar a morfologia e permeabilidade da membrana celular das células NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 após 4 h de estímulo com FS de 16 h e 36 h.
- Analisar a expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, nas linhagens supracitadas, dentro de um painel de 12 genes (*MEK1*, *CDKN1B*, *TP53*, *CDKN1A*, *RB1*, *HRAS*, *AKT*, *STAT3*, *Bcl2*, *BRAF*, *mTOR*, *PI3KCA*) após o estímulo por 4 h com FS, provenientes de biofilmes jovem e maduro, simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.
- Analisar alterações no perfil de distribuição do ciclo celular de NOK-si, SCC 25 e Detroit 562, após o estímulo por 4 e 24 h com FS provenientes de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h.

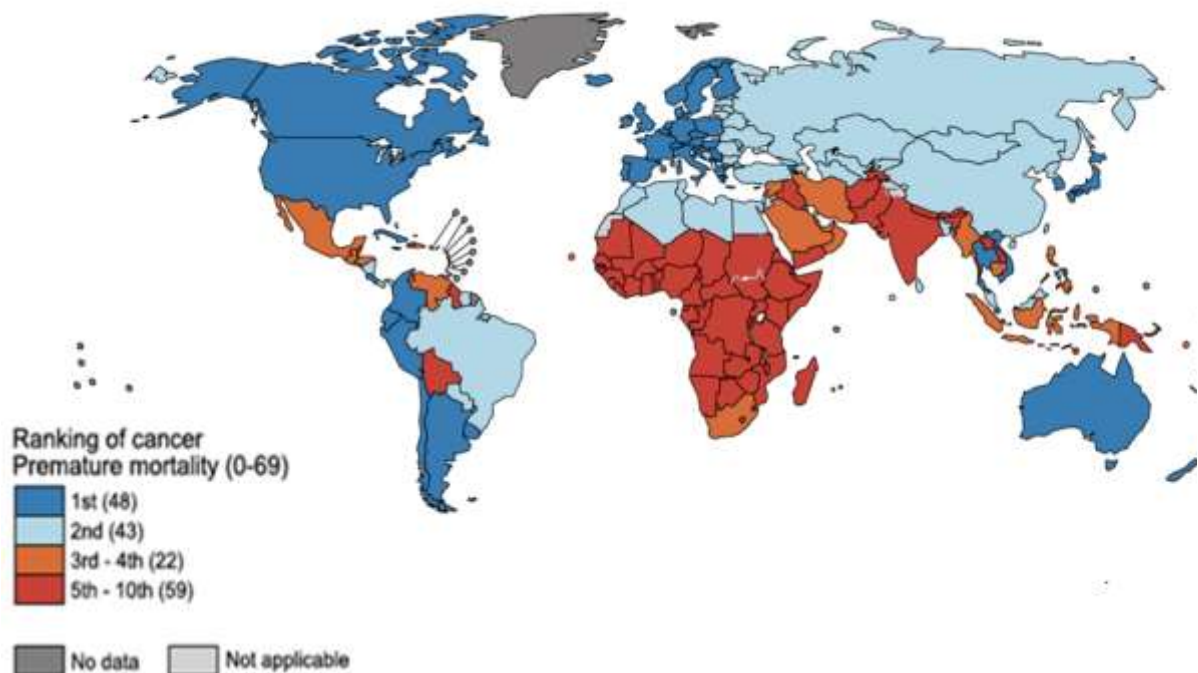
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estatísticas Globais do Câncer

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos mostraram que a incidência e mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente no mundo. Bray et al.¹, em 2018, descreveram que as razões são complexas, porém refletem o envelhecimento e o crescimento populacional, bem como mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco e a associação de alguns deles ao desenvolvimento socioeconômico.

Os autores reportaram que, segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, o câncer se posicionou entre a primeira ou a segunda principal causa de morte antes da idade de 70 anos, em 91 dos 172 países analisados, e ocupa o terceiro ou quarto lugar em outros países, mostrando um aumento das taxas de mortalidade mundiais causadas pelo câncer quando comparadas com outros tipos de doenças (Figura 1).

Figura 1 – Mapa global apresentando o ranking nacional do câncer como causa de morte em idades abaixo de 70 anos em 2015.



Fonte: Bray, 2018¹

3.2 Câncer de Cabeça e Pescoço

Câncer de cabeça e pescoço é um termo que descreve diferentes tipos de neoplasias malignas que se apresentam em faringe, laringe, nariz, seio maxilar, boca ou arredores²³ e representa um dos tipos mais comuns de câncer nos países desenvolvidos, conforme descrito por Joshi²³ em 2014. O carcinoma oral é o tipo mais frequente e o subtipo histológico carcinoma de células escamosas, denominado SCC, representa 90% dos casos diagnosticados, sendo que as maiores taxas de prevalência estão em países como Índia, Paquistão e outros do Sudeste da Ásia, enquanto que o câncer de língua e orofaringe têm maior prevalência nos países ocidentais, como descreveram Bhurgri et al.²⁴ em 2006. A Global Cancer Observatory (GLOBOCAN)¹, no ano 2018, relatou que a incidência do carcinoma de cabeça e pescoço foi de 890.000 casos com 450.000 mortes².

O National Institutes of Health (NIH)²⁵, descreveu os principais tipos de câncer de cabeça e pescoço apresentados na literatura; cada um deles tem sido denominado segundo a parte do corpo em que teve a origem.

- **Câncer de laringe e hipofaringe:** a laringe é um órgão no pescoço situado na parte superior da traqueia, contém as cordas vocais, é importante para a respiração, fala e deglutição. A hipofaringe é a parte inferior da garganta, conhecida como esôfago, junto com a faringe formam um tubo contínuo até o estômago. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas²⁵.
- **Câncer de cavidade nasal e seios paranasais:** a cavidade nasal está situada na parte posterior do nariz e permite a passagem do ar. Os seios paranasais são áreas cheias de ar que se situam ao redor da cavidade nasal. O tipo histológico mais comum é de células escamosas; originado nas células planas, que revestem o interior da cavidade nasal e seios paranasais²⁵.
- **Câncer de nasofaringe:** a nasofaringe é um canal de ar situado na parte superior da faringe, por detrás das fossas nasais. O tipo histológico mais comum é de células escamosas, que tem início nas células planas da nasofaringe²⁵.

- **Câncer oral e de orofaringe:** a cavidade oral inclui lábios, mucosa bucal (epitélio de revestimento interno dos lábios e bochecha), gengiva, dois terços anteriores da língua, assoalho da boca, palato duro e trígono retromolar. A orofaringe, é um pequeno espaço da cavidade bucal compreendida entre a raiz da língua, o palato mole e a epiglote. O tipo histológico mais comum é de células escamosas, originando-se nas células planas do epitélio de boca e de garganta²⁵.
- **Câncer de glândulas salivares:** as glândulas salivares são responsáveis pela produção de saliva. A saliva é liberada na boca para mantê-la úmida, contém enzimas que ajudam na decomposição dos alimentos e na prevenção de infecções de boca e garganta. O tipo histológico mais comum é o carcinoma mucoepidermoide²⁵.

3.3 Sinais e Sintomas do Câncer de Cabeça e Pescoço

Vokes et al.²⁶ em 1993 determinaram que os sinais e sintomas do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, variam segundo a localização do tumor primário e o seu estágio. A localização do tumor, pode estar relacionada com o estilo de vida, fatores ocupacionais e de riscos específicos do indivíduo; a ausência de sintomatologia e mínimos achados físicos estão associados ao câncer nos estágios iniciais. Obstrução nasal, epistaxe e otite média serosa podem estar presentes em pacientes com câncer nasofaríngeo. Sinusite e obstrução unilateral da narina podem ser considerados sintomas precoces de câncer de cavidade nasal e seios paranasais²⁶. A rouquidão persistente pode ser associada ao câncer de laringe. Úlceras orais não cicatrizadas, alterações na adaptação das próteses e dor podem estar relacionadas ao câncer da cavidade oral. Dor de garganta unilateral e otalgia persistentes são, ainda, sintomas comuns em câncer de hipofaringe e região supraglótica, que são diagnosticados em estágio tardio. O diagnóstico precoce do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é um fator importante para alcançar uma taxa de sobrevivência do paciente entre 80-90%, além de diminuir a extensão cirúrgica requerida²⁶.

3.4 Fatores de Risco em Câncer de Cabeça e Pescoço

A etiologia do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é multifatorial. O tabagismo e etilismo são fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Alguns autores como Wang et al.²⁷, em 2018, estudaram por décadas outro fator de risco associado com uma alta incidência de carcinoma oral, o hábito de mastigar *Betel Quid*, que consiste na preparação do fruto da Palmeira de Areca (*Areca Catechu*), denominada noz de areca, triturada e misturada com ingredientes como tabaco e cinzas, e embrulhada na folha de Pimenta de Betele (*Piper Betle*). Esta prática, muito comum no sudeste da Ásia e em outros países asiáticos, tem incrementado três vezes o risco de desenvolver câncer oral.

Em 2016, Kumar et al.²⁸ descreveram a radiação ultravioleta como um fator de risco ocupacional, relacionado especificamente com o desenvolvimento de câncer de lábio²⁸. A exposição constante aos raios UV causa queilite actínica, descrita como uma lesão pré-maligna comum no lábio inferior, que pode se transformar em carcinoma escamocelular²⁸. No mesmo estudo os autores identificaram que o dióxido de enxofre, o amianto e a exposição à pesticidas estão relacionados com o desenvolvimento de câncer na orofaringe, faringe e laringe.

Outro fator de risco muito estudado em diferentes tipos de carcinomas é o Papilomavírus Humano (HPV), detectado em 25% de tecidos tumorais de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço². Alfouzan², em 2019, descreveu diferentes genótipos do HPV relacionados com efeitos oncogênicos, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52 e HPV-58. Com a descoberta do genótipo HPV-16, na década de 1970, foi estabelecido o papel do HPV nas enfermidades malignas²⁹. As alterações celulares relacionadas com o aparecimento do fenótipo maligno inicia-se através da ação das proteínas virais E6 e E7. A oncoproteína E6 pode degradar *TP53*, interferindo na função apoptótica em resposta aos danos no DNA, produzindo assim proliferação descontrolada e instabilidade genômica². A E7 produz degradação do supressor de tumor RB (Retinoblastoma), causando alteração na regulação do ciclo celular². Os pacientes com câncer relacionados ao HPV são, em geral, jovens não fumantes e com status socioeconômico alto²⁹. O risco é aumentado para pacientes com histórico de múltiplos parceiros sexuais e a infecção viral pode estar associada a algumas condições que alteram o comportamento do

tumor. O HPV também é encontrado com alta frequência na cavidade oral de pacientes positivos para infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)²⁹.

Fatores de risco como baixo nível educacional, baixa frequência de consumo de frutas e vegetais frescos e a suscetibilidade genética têm sido identificados em pacientes com carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço³⁰. Em 2013, Chang et al.³⁰ correlacionaram o hábito de cuidados odontológicos com a saúde bucal, demonstrando uma associação positiva entre carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço com a ausência de visitas regulares ao dentista, escovação deficiente, sangramento gengival e perda de dentes. Chang et al.³¹, em 2019, complementaram esses achados com o estudo da taxa de sobrevivência de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e os hábitos de higiene oral, concluindo que existe uma diminuição na sobrevivência dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço associada à falta de higiene oral.

Chocolatewala et al.¹⁸, em 2010, determinaram que aproximadamente 15% dos cânceres de cabeça e pescoço se desenvolvem na ausência dos fatores de riscos clássicos anteriormente descritos, sugerindo que infecções que envolvem patógenos como *Candida albicans* e algumas bactérias poderiam participar da carcinogênese de cabeça e pescoço.

3.5 “Hallmarks of Cancer”: Marcadores da Biologia Tumoral.

Hanahan e Weinberg³², em 2011, descreveram seis características do câncer e estabeleceram um princípio de organização (*Hallmarks of cancer*), proporcionando um marco na compreensão da diversidade das enfermidades neoplásicas. Em relação ao carcinoma de cabeça e pescoço, os autores descrevem o aparecimento das primeiras alterações celulares durante a exposição prolongada da célula epitelial a diversos fatores carcinogênicos, sendo este um processo multifatorial complexo. Braakhuis et al.³³, em 2005, determinaram que, alterações celulares nos mecanismos de metilação do DNA como a hipermetilação e a modificação de proteínas histonas por acetilação ou metilação produzem modificações na regulação das vias de sinalização celular e nos mecanismos de reparo do DNA, permitindo, assim, a evolução de uma célula normal a um estado neoplásico e, finalmente, à aquisição de um fenótipo maligno.

Em 2016, Philip et al.³⁴ revisaram as principais vias de sinalização relacionadas com proliferação, crescimento e sobrevivência celular, os genes, as proteínas e os receptores mais relacionados ao início, promoção e progressão do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço em relação aos alvos ou vias implicados na biologia tumoral. Neste contexto pode-se citar:

- **Imortalidade replicativa:** a principal característica adquirida pelas células cancerígenas para evitar a senescência, e adquirir imortalidade é a regulação do ciclo celular. Alterações em genes associados ao ciclo celular como *TP53*, *CCND1*, *CDKN2A*, *RB1*, *TERT* promovem desenvolvimento de células com crescimento descontrolado³². Genes e fatores de transcrição das células tronco como *NANOG* (*Nanog homeobox transcription factor*), *OCT-4* (*octamer-binding transcription factor*), *BMI1* (*proto-oncogene, polycomb ring finger*), *Snail* (*zinc-finger transcription factor*), *Twist* (*basic helix-loop-helix transcription factor*), e *ABC* (*ATP-Binding cassette transporter superfamily*) desempenham um papel essencial na progressão do câncer e falha do tratamento devido ao crescimento do tumor primário e à metástase³⁴.
- **Alterações na sinalização do fator de crescimento: via do receptor do fator de crescimento epidérmico:** o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) leva à dimerização dos receptores, o que causa ativação de vias de transdução de sinal oncogênico intracelular como RAS/RAF/MAP-quinase, JAK/STAT e PI3K/AKT, gerando um aumento da proliferação celular, ativação da angiogênese e inibição da apoptose³⁴.
- **Insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento (via do fator de transformação do crescimento beta):** o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) atua através do seu receptor e dos mediadores intracelulares de transdução de sinal (SMAD- *SMAD family member*) SMAD2, SMAD3, e SMAD4, responsáveis pela regulação da transcrição do gene alvo, afim de diminuir a proliferação e aumentar a apoptose. A regulação negativa de TGF- β também ativa a via NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*), que fornece sinal de sobrevivência para as células³⁴.

- **Evasão da apoptose: PI3K-PTEN-AKT:** esta é uma importante via de transdução de sinal. Mutações no gene *PI3KCA*, falhas na atividade de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), inibindo a desativação da via PI3K, estão associadas com evasão da apoptose³⁴.
- **Invasão e metástase:** o gene *CSMD1* (*CUB and Sushi Multiple Domains 1*) tem sido estudado por seu envolvimento na invasão e metástase. Na transição epitélio mesênquima, as células perdem sua aderência através de junções, caderinas, desmossomas, e adquirem crescente mobilidade celular, tornando-se migratórias³⁴.
- **Angiogênese:** o crescimento do tumor é limitado pelo suprimento de oxigênio e nutrientes para o interior do tumor e pela eliminação de catabólitos. Fatores de crescimento como o VEGFR são necessários para induzir a formação de células endoteliais e novos vasos sanguíneos que permitam a vascularização tumoral³⁴.

3.6 Mutações Somáticas Comuns no Câncer de Cabeça e Pescoço

Cada vez mais, técnicas utilizadas na pesquisa têm ajudado no estudo de mutações nos principais componentes das vias de sinalização celular, decifrando desta maneira possíveis alvos terapêuticos para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço³⁵.

3.6.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

Thariat et al.³⁵, em 2007, revisaram a sinalização do EGFR relacionada com carcinogênese, progressão do tumor e resposta à terapia em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Descreveram que o receptor apresenta uma expressão em 90% nos carcinomas de cabeça e pescoço e uma menor expressão em lesões displásicas adjacentes ou na mucosa circundante, desempenhando, assim, um papel na carcinogênese. O principal mecanismo de regulação positiva do EGFR é a ativação transcricional, secundária à produção autocrina do fator de transformação de crescimento alfa (TGF- α), para assim dar início à transdução do sinal. Pode ser

superexpresso como resposta a lesões teciduais em macrófagos, células T, e queratinócitos.

Em 2006, Kalyankrishna e Grandis³⁶, descreveram que o EGFR no estroma tumoral possibilita um ambiente permissivo e favorável ao crescimento do tumor, e está relacionado à angiogênese. Desta maneira, a superexpressão do EGFR tem sido relacionada com estádios avançados de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e carcinomas pouco diferenciados, além da associação com uma menor taxa de sobrevida dos pacientes. Esses achados foram sustentados por Sheikh Ali et al.³⁷, em 2008, ao correlacionar a expressão de EGFR por imuno-histoquímica com as variáveis clínicas, e a análise de sobrevida de 91 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, demonstrando que EGFR está superexpresso na maioria dos casos e é associado com um baixo grau de diferenciação do tumor e linfonodos positivos. A relação com o estado clínico-patológico, como estágio tumoral avançado, tamanho do tumor e metástase local e distante, indica diminuição da sobrevida para pacientes com superexpressão de EGFR³⁷.

3.6.2 Via da fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3-K/Akt)

PI3K/AKT é uma das principais vias ativadas pelo receptor EGFR e encontra-se ativa em 50-80% dos casos com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Wan et al.³⁸, em 2015, avaliaram a expressão do gene *PI3KCA* no tecido tumoral e no tecido adjacente ao carcinoma (margem de 2 mm), em 113 pacientes com carcinoma oral de células escamosas (OSCC), encontrando que a expressão do gene *PI3KCA* foi significativamente maior no tecido tumoral comparado com o tecido adjacente.

A regulação da via PI3K no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem sido investigada por outros autores. Fenic et al.³⁹, em 2007, avaliaram mutações nos exons 9 e 20 do gene *PI3KCA*, na expressão do mRNA e na proteína PI3KCA, assim como os níveis de fosforilação de AKT (pAKT). Estes resultados foram comparados com os achados clínico-patológicos de 33 casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Este estudo determinou que *PI3KCA* pode ser um dos oncogenes na posição do cromossomo 3q26.3, relacionado aos estádios iniciais do desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, e sugere que as amplificações ou mutações desse gene não ocorrem com frequência;

porém os eventos epigenéticos podem desempenhar um papel importante em estágios avançados dos tumores.

A proteína serina/treonina quinase *AKT* é um alvo de *PI3K*, regula funções celulares de crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose³⁹. Amornphimoltham et al.⁴⁰, em 2004, realizaram um estudo comparando camundongos e amostras clínicas de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Neste estudo foi realizada uma correlação da expressão de *AKT* com diferentes estádios de progressão do tumor. Os achados demonstraram que a expressão de *AKT* está relacionada com progressão e transformação das células escamosas do tecido epitelial normal a uma condição de displasia assim como de carcinoma de células escamosas invasivo. Outro estudo orientado por Massarelli et al.⁴¹, em 2005, avaliou 52 casos de carcinoma escamo celular de língua por imunohistoquímica, tendo como alvo a proteína *AKT* fosforilada (ativa). Neste trabalho, a sobrevida livre de doença diminuiu significativamente nas amostras positivas para *AKT* fosforilada (log rank test, $P < 0.001$), independentemente do estágio da doença.

3.6.3 Alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR)

A proteína mTOR é reguladora de crescimento celular que se encontra *downstream* à via de PI3K/AKT. Quando ativada por AKT, mTOR fosforila o regulador de tradução p70-S6 quinase e ativa a proteína ribossômica S6, que contribui para o controle do crescimento celular. Um estudo realizado por Amornphimoltham et al.⁴², em 2005, determinou que o acúmulo aberrante de S6 ativada acontece com frequência em lesões displásicas e carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço.

3.6.4 Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

A família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é capaz de traduzir estímulos extracelulares em respostas intracelulares, controlando a proliferação diferenciação e apoptose. RAS e RAF são os primeiros mensageiros químicos desta via⁵. O gene *RAS* têm o potencial de regular as vias, MAPK e PI3K/AKT, portanto, mutações em *RAS* podem ativar ambas as vias relacionadas à progressão tumoral⁴. Mutações nos genes *RAS* (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*), têm sido

observadas em 30% dos pacientes com carcinoma oral de células escamosas, como descrito por Peng et al, em 2018⁵.

O gene *RAF* e as isoformas *ARAF*, *BRAF*, *CRAF* compartilham uma função comum na fosforilação de MEK, assim como mutações somáticas no *hotspot* V600E, do domínio quinase de *BRAF*, resultando em função de *BRAF* quinase aumentada associada com câncer colorretal, carcinoma de tireoide, carcinoma de pulmão, linfoma não Hodgkin e, em uma menor porcentagem, com carcinomas de cabeça e pescoço⁴³.

3.6.5 Via de sinalização Janus quinases/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK/STAT)

A via de sinalização JAK/STAT controla a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, mediante a transmissão de sinais desde a membrana plasmática até o núcleo⁴⁴. Nas células, os receptores se unem através do domínio citosólico a um dos quatro membros tirosina quinase da família JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), permitindo fosforilar o receptor e recrutar substratos ativos, como proteínas STAT (transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição) que, quando fosforiladas, tornam-se ativas regulando a expressão de diferentes genes. Em 1998, Grandis et al.⁴⁴ estudaram, mediante as análises de imunoblotting e EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*), a ativação constitutiva e a ativação induzida por TGF- α de STAT 1 e 3, comparando células epiteliais normais com células originadas em carcinomas de cabeça e pescoço. Os autores concluíram que a expressão e fosforilação de STAT3 eram elevadas no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. A ativação de STAT3 na progressão de tumores de cabeça e pescoço foi analisada por Grandis et al.⁴⁵, em 2000. Neste trabalho, os níveis de expressão e ativação do gene *STAT3*, assim como a expressão da proteína, foram detectados em tecidos de 19 pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Os resultados evidenciaram uma superexpressão do gene e ativação da proteína STAT3 na mucosa saudável e nas lesões tumorais dos pacientes, o que não foi encontrado em indivíduos saudáveis. Estes resultados sugeriram que a ativação constitutiva de STAT3 representaria um evento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço e que a sinalização de STAT3 seria uma via crítica para a progressão do tumor e desregulação apoptótica⁴⁵.

3.7 Espécies Bacterianas Associadas ao Câncer

Estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que algumas espécies bacterianas estão associadas a diferentes tipos de câncer^{46,47}.

3.7.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria de forma espiral, Gram-negativa, microaerófila, associada exclusivamente à células da mucosa gástrica⁴⁶. A introdução de *H. pylori* como agente carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, em 1994, confirmou que a etiologia da gastrite crônica e a cascata que resulta na carcinogênese estavam associadas à infecção por *H. pylori*¹⁰. Em 2017, Chmiela et al.⁴⁶ descreveram que 60% dos cânceres gástricos estavam relacionados com esse tipo de infecção. A presença de fatores de virulência, como CagA, VacA e BabA, aumentou o risco de produzir gastrite aguda e atrófica, seguida por metaplasia intestinal, displasia e finalmente o desenvolvimento do carcinoma⁴⁵. A infecção por *H. pylori* estimulou o desenvolvimento de adenocarcinoma do tipo difuso, causando pangastrite e gastrite hiperplásica rugal⁴⁶.

3.7.2 *Salmonella enterica* sorovar *typhi*

Salmonella enterica sorovar *typhi* (*S. typhi*) é uma bactéria bacilar Gram-negativa, aeróbia e flagelada, sendo o agente etiológico da febre tifoide, que tem sido relacionada ao desenvolvimento de cânceres de vesícula biliar¹¹. Scanu et al.¹¹, em 2015, descreveram que *S. typhi* tem a capacidade de secretar mais de 40 proteínas efetoras nas células do hospedeiro através do seu sistema de secreção do tipo III. Essas proteínas apresentaram atividade enzimática, funcionando como moduladores críticos das enzimas do hospedeiro, processo que poderia contribuir com a transformação celular maligna¹¹. Os autores estudaram a transformação celular induzida por *S. typhi* em organoides de vesícula biliar e fibroblastos embrionários de camundongos, adicionando mutações necessárias para a transformação maligna. Os autores concluíram que a transformação celular mediada por *S. typhi* ocorria através da ativação das vias do hospedeiro, que promoveram a colonização bacteriana e sobrevivência intracelular, demonstrando que a transformação maligna das células

seria, então, o resultado de danos colaterais induzidos por *S.thypi* durante seu ciclo de infecção.

3.7.3 *Chlamydia pneumoniae*

A *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, considerada como o agente causal mais frequente de infecção respiratória aguda na população¹². *C. pneumoniae* tem sido associada com diversas doenças crônicas, incluindo o câncer de pulmão¹². Chaturvedi et al.¹², em 2010, concluíram que o papel de *C. pneumoniae* no desenvolvimento do carcinoma pulmonar poderia estar relacionado com infecção e inflamação crônica. Afim de compreender o mecanismo da tumorigênese de pulmão por *C. pneumoniae*, os autores analisaram a expressão da proteína HSP-60 (*Heat Shock Protein-60*) de *C. pneumoniae* em um estudo de casos e controles. HSP-60 é uma proteína de choque térmico, expressa por *C. pneumoniae* durante a infecção crônica. A resposta do hospedeiro à esta proteína contribui para o dano inflamatório no tecido¹². Os achados deste estudo demonstraram que altos níveis na expressão de HSP-60 persistiram de 2 a 5 anos após a detecção do patógeno, sugerindo que a inflamação crônica produzida pela infecção por *C. pneumoniae* atuaria promovendo o desenvolvimento do câncer de pulmão.

3.7.4 *Streptococcus bovis*

Streptococcus bovis (*S. bovis*) é uma bactéria com forma de coco Gram-positiva, que faz parte da flora do trato gastrointestinal dos seres humanos, relevante em casos de endocardite⁴⁸. Em 1978, Murray e Roberts⁴⁸ descreveram que a endocardite e a septicemia produzida por *S. bovis* poderiam induzir bacteremia no trato gastrointestinal. Em 2000, Ellmerich et al.¹³ analisaram o efeito de antígenos extraídos da parede celular bacteriana de *S. bovis* em lesões pré-neoplásicas do trato gastrointestinal de ratos *Wistar* tratados com o carcinógeno azoximetano. Alterações nas poliaminas da mucosa e a expressão do antígeno nuclear de proliferação (PCNA) foram estudadas na mucosa intestinal, bem como a produção de interleucina 8 (IL-8). Os resultados evidenciaram que os produtos do metabolismo de *S. bovis* promovem a progressão do carcinoma de cólon em ratos *Wistar* com lesões pré-neoplásicas já estabelecidas.

3.8 Papel da Microbiota Oral na Carcinogênese de Cabeça e Pescoço

O papel da microbiota oral no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço tem sido estudado por vários autores^{47,49,50}. Em 2012, Pushalkar et al.⁴⁷ descreveram os micro-organismos presentes na mucosa tumoral e não tumoral. Micro-organismos como *Peptostreptococcus stomatis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Johnsonella ignava* e *Streptococcus parasanguinis*, foram encontrados no tecido tumoral. *Granulicatella adiacens* foi prevalente na mucosa saudável. Lee et al.⁴⁹, em 2017, investigaram diferenças na microbiota oral entre indivíduos saudáveis, pacientes com lesões precursoras epiteliais e pacientes com câncer oral avançado, comparando-os com diferentes hábitos de vida. As análises foram realizadas utilizando sequenciamento de última geração, e os achados deste estudo sugerem que mudanças na comunidade microbiana dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* e *Slackia*, podem representar um marcador na detecção e prognóstico do câncer oral, especialmente na transição lesão precursora epitelial-câncer.

Em 2018, Zhang et al.⁵⁰ citaram três possíveis mecanismos de ação da microbiota oral na patogênese do câncer (Figura 2). O primeiro estaria relacionado com a inflamação crônica produzida pelo estímulo bacteriano. Mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL): IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as metaloproteinases de matriz (MMPs) - MMP-8 e MMP-9, poderiam causar ou facilitar a proliferação celular, a mutagênese, a ativação de oncogenes e a angiogênese. O segundo mecanismo está relacionado com a secreção de proteínas bacterianas efectoras, que utilizam sistemas de secreção tipo 3 ou tipo 4 (T3SS/T4SS) os quais tem a capacidade de promover alterações na proliferação celular, rearranjos do citoesqueleto, ativação do NF- κ B e inibição da apoptose celular; já o terceiro mecanismo descrito é relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), espécies reativas de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species* - RNS), compostos voláteis de enxofre (*Volatile Sulfur Compounds* - VSC) e ácidos orgânicos. Durante uma resposta inflamatória, as células epiteliais e do sistema imunológico podem produzir ROS e RNS⁸. A produção destas espécies ocorre pela indução da NADPH oxidase e óxido nítrico sintase⁸. A NADPH oxidase catalisa o ânion superóxido (O₂⁻), levando à produção de peróxido de hidrogênio.

Simultaneamente a óxido nítrico sintase gera óxido nítrico, que pode ser convertido em dióxido de nitrogênio (NO₂), peroxinitrito (ONOO⁻) e trióxido de dinitrogênio (N₂O₃)⁸. Algumas espécies da cavidade oral envolvidas neste processo produzem peróxido de hidrogênio. Neste grupo encontram-se a família dos *Streptococcus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oligofermentans*⁵¹; e dos *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus minutus* e *Bifidobacterium adolescentes*⁵². A expressão aumentada de NADPH oxidase, de óxido nítrico sintase e de suas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foi identificada em vários tipos de câncer⁸. Estes achados demonstraram a relação dos radicais livres com a inflamação crônica e seu papel no desenvolvimento do câncer e progressão maligna⁸.

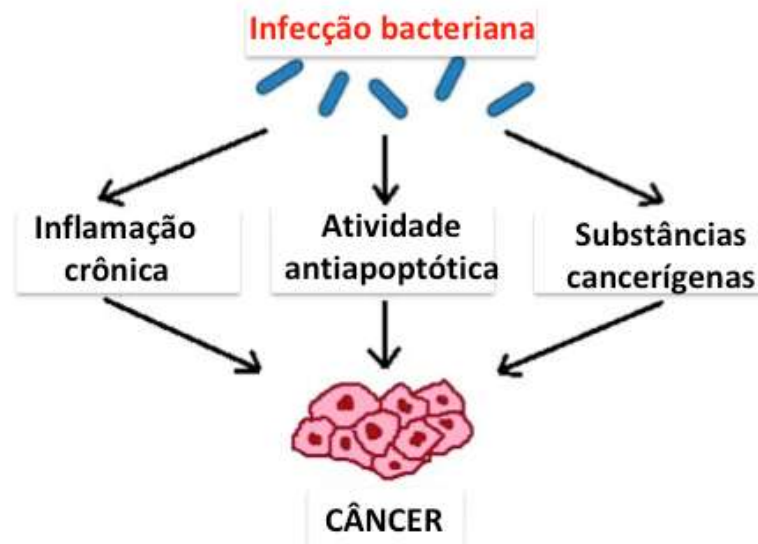
Neste sentido, Yilmaz et al.⁵³, em 2004, estudaram a ação de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) na ativação antiapoptótica da via de sinalização PI3K/AKT, demonstrando que este micro-organismo inibia a externalização da fosfatidilserina, protegendo as células infectadas da apoptose, o que poderia submodular a resposta inflamatória, além de promover a sobrevivência das células do hospedeiro pela via PI3K/AKT. *P. gingivalis*, também apresenta capacidade de acelerar a progressão tumoral através da fase S do ciclo celular, alterando a atividade das quinases, dependentes de ciclinas, reduzindo a atividade da proteína supressora tumoral p53 como descrito por Whitmore et al.⁵⁴, em 2014.

Hooper et al.⁵⁵, em 2007, descreveram que a maioria das espécies encontradas nos tecidos tumorais são acidogênicas e acidúricas. *Proteobacteria* e espécies dos gêneros *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, e *Veillonella* sobrevivem em ambientes de pH baixo. A presença desses micro-organismos nos tumores de cabeça e pescoço reflete a natureza do microambiente ácido e hipóxico dos tumores, pois estas espécies têm sido detectadas também em lesões ácidas de cárie dentária⁵⁵.

Alguns micro-organismos orais são capazes de metabolizar álcool em acetaldeído. O acetaldeído tem sido classificado como carcinógeno do grupo I em humanos, devido a sua capacidade de causar troca entre cromátides irmãs, mutações pontuais, adutos de DNA e hiperproliferação epitelial⁵⁶. Várias espécies microbianas orais, como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*,

Streptococcus salivarius, *Streptococcus sanguinis*, assim como o fungo *Candida* spp, possuem a enzima álcool desidrogenase (ADH), que metaboliza o álcool em acetaldeído, apresentando desta maneira um risco para o desenvolvimento de câncer bucal⁵⁶.

Figura 2 - Mecanismos de ação da microbiota oral na carcinogênese de cabeça e pescoço



Fonte: Karpiński, 2019 modificado⁸

As bactérias Gram negativas, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, dois patógenos envolvidos na periodontite, têm sido relacionados à patogênese de várias doenças malignas¹⁵. O envolvimento desses patógenos na etiologia e progressão do carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço tem sido discutido nas últimas décadas^{7,15}. Inaba et al.⁵⁷, em 2014, demonstraram que *P. gingivalis* regula positivamente a expressão de MMP-9. Os autores observaram que as gingipainas secretadas por *P. gingivalis* clivam a proenzima, ativando MMP-9 e desencadeando a transição epitélio-mesenquima (EMT), que permite a invasão e metástase das células tumorais⁵⁷. Esses achados estão relacionados com o estudo de Ha et al.⁵⁸, em 2015, que evidenciaram que exposições prolongadas das células tumorais ao sobrenadante de *P. gingivalis* produz uma mudança no fenótipo das células, juntamente com a diminuição da expressão de fatores de transcrição responsáveis por alterar a morfologia poligonal característica das células epiteliais normais, conferindo assim às células um fenótipo mesenquimal. Os autores também observaram propriedades migratórias e invasivas das células, resistência aos quimioterápicos, aumento na expressão no receptor CD44, que está relacionado com as interações célula-célula, adesão e migração celular, e também aumento no receptor CD133, utilizado comumente como marcador

de célula tronco tumoral. Outro achado importante neste estudo foi a produção de MMP-1 e MMP-10, conferindo às células tumorais características de agressividade, permitindo a invasão e a aquisição de fenótipo de célula tronco tumoral⁵⁸.

P. gingivalis, além de ter a capacidade de inibir a apoptose, em células epiteliais orais de maneira dependente de atividade mitocondrial, parece ter um papel importante na adaptação e sobrevivência celular⁵⁹. Yao et al.⁵⁹, em 2010, estudaram a importância funcional da sinalização de *AKT* e a expressão das moléculas antiapoptóticas Bad (*BCL2 associated agonist of cell death*) e caspase-9, após a infecção de células epiteliais gengivais com *P. gingivalis*. Os autores demonstraram que existe uma fosforilação significativa da proteína Bad, enquanto os níveis de mRNA para este gene diminuíram. Além disso, descreveram a translocação de Bad mitocondrial para o citosol, após o contato da célula epitelial com o patógeno, tendo a ativação da caspase-9 sido inibida pela infecção ao longo tempo. Em células epiteliais gengivais deficientes em *AKT*, *P. gingivalis* perdeu a capacidade de promover fosforilação e translocação de Bad, enquanto a ativação de caspase 9 foi independente. Estes resultados sugeriram que *AKT* é um componente chave das vias antiapoptóticas estimuladas por *P. gingivalis* e que este patógeno utiliza outras vias mitocondriais para proteger as células do hospedeiro da morte celular, garantindo a sobrevivência das células epiteliais⁵⁹.

Em 2005, Uitto et al.⁶⁰ estudaram a sinalização em células HaCaT após o estímulo por proteinases de *F. nucleatum* e demonstraram que existe um aumento da produção de MMP-13 (colagenase 3) nas células através da ativação da proteína quinase p38, promovendo, assim, migração celular. Interações microbianas entre *F. nucleatum* e *P. gingivalis* têm sido estudadas¹⁵. Gallimidi et al.¹⁵, em 2015, realizaram um modelo murino para o estudo da carcinogênese oral associada à periodontite. Os resultados mostraram que os produtos do metabolismo destes dois patógenos têm a capacidade de ativar a sinalização através dos receptores Toll-like, resultando na produção de IL-6, um importante mediador da inflamação, capaz de ativar STAT3 e de inibir a apoptose nas células durante o processo inflamatório, mantendo-as vivas em ambientes hostis. Os autores também detectaram aumento de Ciclina D1 e de MMP-9, moléculas relacionadas ao controle do ciclo celular e invasão tumoral.

A patogenicidade de *Candida* spp. está relacionada com uma combinação de fatores que contribuem para sua virulência, como sua capacidade de crescer a 37 °C,

sua variabilidade fenotípica, a formação de hifas e pseudo-hifas, a capacidade de formação de biofilmes e de produzir enzimas hidrolíticas como fosfolipases, aspartil proteinases (Sap) e lipases^{61,62}. Essa patogenicidade também pode ser atribuída ao fato de que as células epiteliais humanas possuem o receptor CR3 (*Complement receptor 3*) da integrina humana, o qual é responsável por facilitar a aderência de *Candida* spp. à superfície da mucosa do hospedeiro, por meio da interação entre as adesinas do fungo e os receptores nas células epiteliais⁶². A secreção de fosfolipases é considerada um fator chave para a invasão do epitélio através da ruptura da bicamada fosfolipídica das células do hospedeiro⁶¹

Villar et al⁶³, em 2012, estudaram a resposta de células epiteliais orais em um modelo de infecção por *C. albicans*. Neste estudo foi determinado que *C. albicans* apresentou a capacidade de induzir apoptose precoce em mais do 50% das células epiteliais orais e apenas 15% das células mostraram alterações apoptóticas tardias. Também foi descrito que *C. albicans* promoveu uma diminuição no potencial transmembrana mitocondrial assim como a translocação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, sugerindo ativação da via apoptótica intrínseca em células epiteliais orais, em resposta ao estímulo com *C. albicans*. Os autores demonstraram que a atividade das caspases 3 e 9 aumentou apenas durante as primeiras horas de infecção. Estes achados sugeriram que a ativação de vias de morte celular em resposta aos fatores de virulência de *C. albicans* desempenharam um papel essencial na modulação da patogênese deste fungo⁶³.

Infecções por espécies de *Candida* são comuns em pacientes com câncer⁶⁴. O papel deste fungo em neoplasias da cavidade bucal foi relatado, pela primeira vez, em 1969, e, desde então, alguns estudos indicam que infecções por espécies de *Candida* aumentam o risco de transformações malignas em lesões da cavidade bucal^{64,17}. Dwivedi et al.⁶⁵, em 2009, demonstraram em um modelo animal a relação entre a infecção por *C. albicans* e carcinogênese oral. Neste trabalho, camundongos tratados com o carcinógeno 4NQO (*4 Nitroquinoline 1-oxide*) foram, posteriormente, estimulados com *C. albicans*. Os resultados mostraram que o tratamento com 4NQO não causou lesões epiteliais óbvias e a infecção com *C. albicans* causou apenas hiperplasia epitelial. No entanto, os camundongos tratados com 4NQO e infectados com *C. albicans* apresentaram displasia epitelial da mucosa bucal. Neste estudo foram avaliadas também as proteínas Ki-67 e P16, relacionadas com proliferação celular, mostrando um aumento significativo na expressão destas proteínas nos

camundongos estimulados com 4NQO e infectados com *C. albicans*. Estes resultados indicaram que o desenvolvimento do câncer bucal seria causado por uma combinação de múltiplos fatores, sendo a infecção por *C. albicans* um fator importante⁶⁴. Em 2010, Bakri et al.⁶⁴ demonstraram que as proteinases secretadas por *C. albicans* foram capazes de degradar proteínas de ligação do epitélio à lâmina basal, como a laminina-332 e a E-caderina. Estas proteínas são importantes na adesão entre células. Os autores relataram que os achados apresentavam implicações no potencial de invasão tecidual, na redução da coesão entre as uniões celulares e poderia aumentar a invasão de células epiteliais geneticamente alteradas.

Outro mecanismo carcinogênico envolvendo *C. albicans* é a produção de carcinógenos como nitrosaminas e acetaldeído⁶⁶. Estas moléculas podem atuar diretamente no epitélio oral, sozinhas ou em conjunto com outras moléculas capazes de induzir o desenvolvimento de tumores⁶⁶. Estudos demonstram que *C. albicans* apresenta a capacidade de metabolizar N-benzilmetalamina (BMA) em N-nitrosobenzilmetilamina (NBMA), uma substância carcinogênica capaz de induzir mutações genéticas e promover a formação de carcinoma escamoso oral e esofágico⁶⁶. Também foi relatado que o acetaldeído produzido por espécies de *C. albicans* pode interferir na replicação do DNA, induzir mutações, afetar o reparo do DNA, promover a ativação de proto-oncogenes e promover a formação de tumores⁶⁶.

A bactéria Gram positiva, facultativa *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), tem sido descrita como um importante patógeno humano associado à doenças de pele, assim como faz parte da microbiota oral de indivíduos saudáveis⁶⁷. A presença de resinas acrílicas dentro da cavidade bucal, especialmente bases de próteses dentárias em pacientes idosos, promove um aumento de *S. aureus* na composição da microbiota oral⁶⁷. Os fatores de virulência como as toxinas de *S. aureus* são capazes de induzir respostas nas células do hospedeiro⁶⁸. Zhang et al.⁶⁸, em 2017, descreveram três tipos de toxinas produzidas por *S. aureus* capazes de induzir apoptose em vários tipos de células. Primeiramente, a α -toxina (*Alpha toxin*) e a PVL (Panton-Valentine Leukocidin) foram descritas pelos autores como toxinas causadoras de dano na membrana celular. O segundo tipo descrito foram as toxinas relacionadas aos receptores da membrana celular, como a família das enterotoxinas SEs (*Staphylococcal enterotoxins*), as SELs (*Staphylococcal enterotoxins-like proteins*), e as TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome toxin-1*). Por fim, o terceiro tipo de

toxina descrito pelos autores foram as enzimas SspB (*Staphylococcal staphopain B*) e a coagulase.

Estudos têm demonstrado que a α -toxina produzida por *S. aureus* poderia induzir efeitos diretos em queratinócitos, como citotoxicidade e inflamação local mediada pela produção de TNF- α ⁶⁹. Em 2009, Kirker et al.⁷⁰ estudaram um modelo de co-cultura de *S. aureus* com queratinócitos humanos. Neste trabalho, foram avaliados parâmetros como a morfologia e a viabilidade celular e também o processo de apoptose dos queratinócitos, após o contato com os produtos metabólicos provenientes de biofilmes e culturas planctônicas de *S. aureus* em diferentes tempos (3, 24, 48 e 72 h). Nesse estudo, foi demonstrado que os estímulos com os produtos derivados do metabolismo de biofilmes e de culturas planctônicas *S. aureus* tiveram capacidade de induzir alterações na morfologia celular após 24 h de contato, assim como de diminuir significativamente a viabilidade celular, tendo sido observado aumento da apoptose após 9 h de contato. Em um estudo realizado posteriormente, em 2011, por Secor et al.⁷¹, estes mesmos estímulos foram avaliados (produtos derivados de biofilmes e culturas planctônicas de *S. aureus*) na resposta transcricional de genes associados à inflamação em queratinócitos humanos. Os resultados deste estudo mostraram a capacidade dos produtos derivados dos biofilmes de *S. aureus* em regular positivamente genes pró-inflamatórios, citocinas e genes relacionados à apoptose, além de supressão da sinalização celular por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), sugerindo que, os produtos derivados de biofilmes de *S. aureus* foram capazes de modular importantes processos de sinalização celular.

As enterotoxinas de *S. aureus* foram estudadas no desenvolvimento de linfoma cutâneo de células T. Krejsgaard et al.⁷², em 2014, descreveram a capacidade das enterotoxinas de *S. aureus* em induzir comunicação entre células T malignas e benignas, levando à produção de interleucina-10 nas células T malignas. Esta ativação maligna exerce um papel fundamental na desregulação imunológica própria dos casos de linfoma cutâneo de células T⁷².

3.9 Relação entre a Microbiota Oral e o Desenvolvimento de Tumores em Órgãos Distantes

Os micro-organismos presentes na cavidade oral têm sido relacionados com tumores em órgãos distantes⁷³. Mecanismos como a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios, desencadeados por alguns micro-organismos orais, podem estar envolvidos na resposta imunológica relacionada ao desenvolvimento do câncer⁷³. Michaud et al.⁷³, em 2007, concluíram que a perda dentária, como consequência da doença periodontal, representa um risco para o desenvolvimento de câncer de pâncreas. Os autores sugeriram que a inflamação e a produção do carcinógeno nitrosamina, produto das toxinas dos patógenos periodontais, promovem o desenvolvimento de tumores no pâncreas. Estes achados levaram à realização de estudos sobre a microbiota oral e a relação entre disbiose oral e cânceres não orofaríngeos. Em 2018, Fan et al.⁷⁴ realizaram um estudo prospectivo de casos e controles com o objetivo de avaliar o perfil da microbiota oral de amostras obtidas a partir de um enxaguatório bucal, em pacientes com câncer pancreático e indivíduos saudáveis. A composição da microbiota oral foi caracterizada por sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S bacteriano. Os autores encontraram que *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram associados a um maior risco de desenvolvimento de câncer de pâncreas.

O perfil da microbiota oral, também foi estudado prospectivamente em carcinomas de esôfago. Peters et al.⁷⁵, em 2017, estudaram a relação entre a microbiota oral e o risco de desenvolvimento de carcinoma escamocelular e adenocarcinoma de esôfago. Os patógenos orais foram analisados por sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de enxaguatório bucal de pacientes com carcinomas de esôfago e indivíduos saudáveis. Os autores relataram que os patógenos periodontais *Tannerella forsythia* e *P. gingivalis* foram mais abundantes nos casos de adenocarcinoma e carcinoma escamocelular de esôfago, respectivamente.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Micro-Organismos e Condição de Armazenamento

As cepas *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) e *S. aureus* ATCC 25923 foram armazenados em freezer -80 °C. *C. albicans* foi reativada em meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA- Acumedia® Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA. cat. 741-60581), suplementado com cloranfenicol (0,1 g/L), e *S. aureus* em *Brain Heart Infusion* (BHI- Acumedia® Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA. cat. 741-60110), suplementado com anfotericina B (0,025 g/L) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat.1397-89-3). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h.

4.2 Obtenção do Inóculo

O pré-inóculo foi preparado com cinco colônias de *C. albicans* em 10 mL de caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco™, Becton Dickinson Sparks, MD, EUA. cat. 743-28737), suplementado com 100 mM de glicose. Os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C por 16 h. Após este período, uma alíquota da suspensão de crescimento foi observada entre lâmina e lamínula em microscópio de luz transmitida. Observaram-se células com características de levedura sem nenhum tipo de contaminantes na amostra. O inóculo de *C. albicans* foi formado em triplicata, a partir da diluição do pré-inóculo na razão de 1:10. Os inóculos foram incubados a 37 °C, por aproximadamente 8 h, referente ao meio da fase exponencial (mid-log), com $5,2 \times 10^6$ UFC/mL (com variação de $\pm 9,47 \times 10^5$ células) e evidenciado pela medida da densidade óptica em 540 nm ($0,5 \pm 0,15$). Para o pré-inóculo de *S. aureus*, sete colônias da cepa ATCC 25923 foram transferidas para tubos estéreis contendo 10 mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB- Acumedia®, Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA. cat. 741-60665). Os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C, por 18 h. Após este período, uma alíquota da suspensão de crescimento foi observada entre lâmina e lamínula em microscópio de luz transmitida. Observaram-se células com características esféricas (cocos) agrupadas e sem contaminantes na amostra. O inóculo de *S. aureus* foi formado em triplicata, a partir da diluição do pré-inóculo na razão de 1:20. Os inóculos foram incubados a 37 °C por aproximadamente 4h, referente ao meio da fase exponencial (mid-log), com $2,35 \times 10^8$ CFU/mL (com

variação de $\pm 1,7 \times 10^8$ células) e evidenciado pela medida da densidade óptica em 600 nm ($0,597 \pm 0,019$). Cada inóculo foi ajustado para concentração final de 1×10^7 UFC/mL.

4.3 Formação de Biofilmes

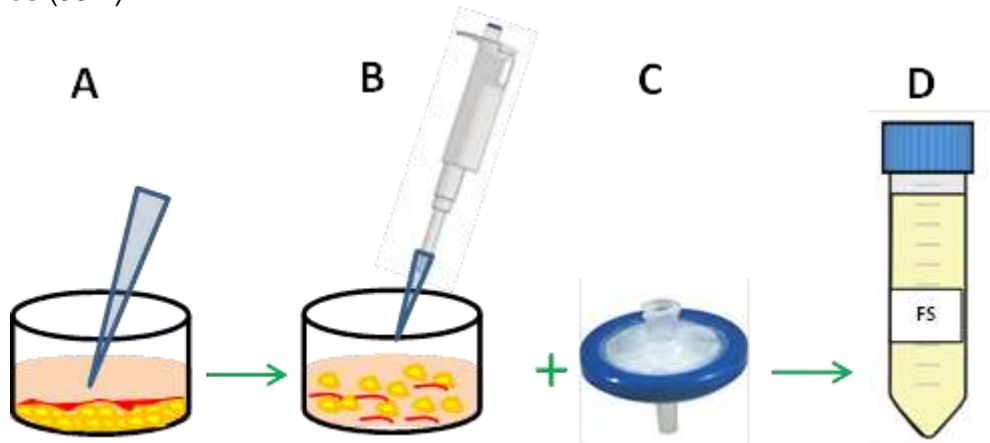
Os inóculos de *C. albicans* e *S. aureus* foram lavados duas vezes em tampão fosfato 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 1000 mL de água destilada, pH 7,2) (4000 xg, 10 minutos, 4 °C). Em seguida, os micro-organismos foram ressuspensos em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. R6504), suplementado com HEPES (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. H4034), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. 59202C) e bicarbonato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil. cat. 30091), pH = 7,0. Foram formados biofilmes simples e mistos. Para os biofilmes simples, em uma placa de 24 poços, já contendo 750 μL de RPMI-1640 suplementado, foram adicionados 750 μL do inóculo 1×10^7 UFC/mL de *C. albicans* e *S. aureus*, separadamente. Enquanto que, para o biofilme misto, em cada poço foram dispostos 750 μL do inóculo 1×10^7 UFC/mL de *C. albicans* e 750 μL do inóculo 1×10^7 UFC/mL de *S. aureus*. A placa foi submetida à fase de adesão, em incubação por 90 minutos, sob agitação orbital de 75 rpm a 37 °C⁷⁶. Após a fase de adesão, todo o meio líquido de cada poço foi removido e lavado cuidadosamente com PBS 1X, por duas vezes, para remoção das células não aderidas. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de RPMI-1640 suplementado em cada poço. As placas foram colocadas em agitador orbital a 37 °C, por 16 h (biofilmes jovens) ou 36 h (biofilmes maduros). Para o biofilme de 36 h, metade do meio foi substituído por meio RPMI-1640 fresco após 24 h de cultivo, de maneira a repor nutrientes consumidos pelos micro-organismos.

4.4 Obtenção dos Fatores Solúveis (FS) Derivados dos Biofilmes

Após o tempo de crescimento, os biofilmes foram desestruturados gentilmente do fundo da placa (Figura 3), juntamente com o meio em que estavam cultivados, com o auxílio de uma ponteira estéril de 1000 μL ²⁰. Esta suspensão foi homogeneizada com a pipeta, recolhida e filtrada com a ajuda de um filtro SFCA de baixa ligação proteica de 0,20 μm (Corning®, NY, EUA. cat.431219), para esterilização da

suspensão e separação dos componentes não solúveis. Cada um dos filtrados foi identificado como Fatores Solúveis (FS) e armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso por no máximo duas semanas.

Figura 3 – Obtenção dos fatores solúveis provenientes de biofilmes jovens (16 h) e maduros (36 h)



Em **A**, desestruturação delicada do biofilme no meio de cultivo; em **B** homogeneização da suspensão contendo micro-organismos (amarelo), componentes de matriz (vermelho) e o meio de cultura contendo os metabólitos solúveis (laranja). Em **C**, filtro SFCA utilizado para a esterilização da suspensão e separação dos componentes não solúveis; em **D**, obtenção dos FS: identificação e armazenamento em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fonte: Elaboração da Doutora Paula Aboud Barbugli.

4.5 Cultura de Células

Para este estudo, foram escolhidas três linhagens celulares. O queratinócito normal oral NOK-si, a célula epitelial de carcinoma escamocelular de língua SCC 25 e célula epitelial metastática de faringe Detroit 562.

4.5.1 Cultura celular e condições de cultivo

Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 (Corning®, NY, EUA. cat. 3290) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em incubadora com 5% de CO_2 . A monocamada celular com 90% de confluência foi lavada com PBS 1X, despreendida com solução de tripsina (0,05%) /EDTA ($0,53\text{ mmol. L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. T4049) e centrifugada a 400 xg por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio de

cultura, coradas com azul de tripan (proporção 1:1/v:v, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. T10282) para determinação da porcentagem de células viáveis, utilizando o contador automático Countess II FL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

4.5.2 Linhagem NOK-si: queratinócitos orais normais

Os queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados⁷⁷, gentilmente cedidos pelo professor Carlos Rossa Júnior (Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP), foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium com 4,5 g/L glicose (DMEM- Lonza™ BioWhittaker™, BS, Switzerland. cat. BE12-614F), acrescido de 2,0 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. 59202C) e 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco™, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. 16000036).

4.5.3 Linhagem SCC 25: célula epitelial de carcinoma escamocelular de língua

A linhagem SCC 25 foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ-cod 0194) e cultivada em meio DMEM:Ham's F12, contendo 1.200 mg/L bicarbonato de sódio (Lonza™ BioWhittaker™, BS, Switzerland. cat. BE12-719B), 2,5 mM de L-glutamina, 15 mM de HEPES, 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. H0888) e 10% SFB.

4.5.4 Linhagem Detroit 562: células epiteliais metastáticas de faringe

A linhagem Detroit 562 foi adquirida do BCRJ (cod 0076) e cultivada em meio DMEM com 1,0 g/L glicose, 1% aminoácidos não essenciais (Lonza™ BioWhittaker™, BS, Switzerland. cat. BE04-687Q), acrescido de 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. P5280), 1.500 mg/L bicarbonato de sódio e 10% de SFB.

4.5.5 Controle de qualidade: detecção de micoplasma nas culturas celulares

Todas as linhagens celulares usadas neste estudo foram testadas para a identificação de micoplasmas, baseando-se no protocolo de Young et al.⁷⁸. As linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 foram avaliadas pelos métodos de microscopia confocal por marcação nuclear com o reagente Hoechst 33342 2 µg/mL (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. 62249), assim como cultivo de lisado celular em caldo ágar Difco™ PPLO Broth (Difco™, Becton Dickinson Sparks, MD, EUA. cat. N° 255420), a 37°C em 5% de CO₂ por 15 dias, além de checagem final por PCR. Para todos os métodos, as células foram cultivadas até a terceira passagem em meio de cultura sem antibiótico previamente à realização dos testes supracitados.

4.6 Estímulo das Células com FS Provenientes dos Biofilmes Simples e Misto de *C. albicans* e *S. aureus*

Cada uma das linhagens celulares foi estimulada com FS provenientes dos biofilmes simples de *C. albicans* e de *S. aureus*, de 16 h (jovem) e 36 h (maduro), e com FS provenientes dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, também de 16 h e 36 h. Foram realizados estímulos em cada um dos grupos com os FS provenientes dos biofilmes puros e diluídos 1:4 em meio DMEM (razão 1 volume de FS para 4 volumes de DMEM). Como controle de células vivas, as células foram cultivadas em condições padrão no meio RPMI-1640, suplementado com e sem diluição 1:4.

4.7 Análise da Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio fluorimétrico AlamarBlue™ (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. DAL1025), uma técnica que determina a viabilidade celular em função da atividade metabólica das enzimas mitocondriais. Em placas próprias para ensaios de fluorescência com 96 poços (Corning®, NY, EUA. cat. 3925), foram plaqueadas $2,0 \times 10^4$ células/poço das linhagens NOK-si, SCC 25 e Detroit 562, separadamente, e incubadas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂ durante 40 h. Após o tempo de incubação, as células foram colocadas em contato com os FS puros e diluídos (1:4) (200 µL por poço),

provenientes dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h. O reagente AlamarBlue™ foi utilizado na concentração de 10% do volume total do poço. Foram realizadas leituras nos tempos de incubação 4 h, 6 h, 8 h, e 24 h. Como controle de morte celular, as células foram tratadas com Triton™ X-100 (0.9%) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. 9002931). A mensuração da fluorescência foi realizada no equipamento Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA.), com filtros de excitação em 544 nm e emissão em 590 nm. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata, em três ocasiões independentes (n=12). Os valores de fluorescência foram transformados em porcentagem em relação com o grupo controle (células cultivadas em condições padrão).

4.8 Análise da Morfologia Celular e Permeabilidade da Membrana por Microscopia Confocal

Para analisar a morfologia celular e a permeabilidade da membrana plasmática, foram cultivadas $3,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 24 poços, das linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562, separadamente, colocadas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂ durante 40 h. Após o tempo de incubação, as células foram estimuladas durante 4 h com os FS puros provenientes de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h (500 µL por poço). Posterior ao tempo de estímulo com os FS, os núcleos celulares foram marcados com 2 µg/mL de Hoescht 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA. cat. 62249), por 10 minutos de incubação. As células foram lavadas com PBS 1X, e posteriormente, foi realizada a marcação de células com 40 µg/mL de iodeto de propídeo (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. P3566) durante 5 minutos, seguido de lavagem com PBS 1X. Em seguida as células foram fixadas com formalina tamponada 10% em pH 6,8, durante 20 minutos a 37 °C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS 1X e permeabilizadas com 0,1% de Triton™ X-100, por 10 minutos. Para a marcação do citoesqueleto, foi utilizada a faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. A12379), por 30 minutos. Células cultivadas em condições padrão foram utilizadas como controle. Como controle de morte celular, as células foram estimuladas com camptotecina, na concentração de 10 µg/mL (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. C9911). A

obtenção das imagens foi realizada por meio do Microscópio de Fluorescência Confocal Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan, com auxílio do Software ZenBlue versão 2.3.

A marcação nuclear para Hoescht 33342 foi obtida pela excitação das amostras com laser em 405 nm, na faixa espectral de 405 nm até 450 nm; para a visualização dos núcleos de células mortas, marcados com iodeto de propídeo, foi utilizado o laser em 488 nm, na faixa espectral de 560 nm até 620 nm; e por fim, para a visualização da faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488, foi utilizado o laser em 488 nm, na faixa espectral de 488 nm até 520 nm.

4.9 Análise do Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada por meio da marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo, a distribuição das fases do ciclo celular subG0 (população de células apoptóticas), G0/G1 (população de células com o DNA não replicado), S (fase de síntese do DNA) e G2/M (população de células com o DNA totalmente replicado), foi realizada para cada uma das linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 após diferentes estímulos. As células foram cultivadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ por poço, em placas de 6 poços (Corning®, NY, EUA. cat. 430639), colocadas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂ durante 40 h. Após o tempo de incubação, as células foram estimuladas durante 4 e 24 h com FS puros provenientes de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h (3 mL por poço). As células foram lavadas com PBS 1X, removidas com solução de Accutase® (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. A6964), recolhidas em microtubos e centrifugadas a 400 xg, por 5 minutos. Após a obtenção do *pellet*, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1X e homogeneizadas gentilmente. O volume de 900 µL de etanol 70% resfriado foi adicionado gentilmente (gotejamento), sob leve agitação. Os tubos foram incubados *overnight* a 4 °C. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 700 xg, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuspensado em 100 µL de PBS e 100 µL de solução de ciclo celular (3,4 mM tris HCl pH 7,4; 0,1% Triton X-100; 700 U/L RNase (PureLink™ RNase A – Invitrogen™ Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. 12091021); 10mM NaCl (Synth, Diadema, SP, Brasil. cat. 01C1060) e 30 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA cat. P3566). Os tubos

foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para determinar a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular, a suspensão celular foi analisada no equipamento *BD FACSAria™ III cell sorter* com auxílio do programa *BD FACS Diva software*. Um gráfico *dot plot* SSC (*Side SCatter*) versus FSC (*Forward SCatter*) foi construído para analisar a homogeneidade das amostras. A população foi derivada em gráfico do tipo *dot plot de PE* (filtro para a fluorescência referente ao iodeto de propídeo) em função de PE-W, para a exclusão de *debris* e *doublets*. A população de análise foi derivada também em gráfico do tipo histograma com eixo X para PE em escala linear. Células não marcadas foram usadas como controle negativo de fluorescência. Foram adquiridos 10.000 eventos para cada condição. A distribuição das fases do ciclo celular foi seguida pelo gráfico de histograma, com PE-A para o eixo X em escala linear. A distribuição das fases do ciclo celular foi analisada com o *Watson Pragmatic model* pelo software *FlowJo™* (Windows) vs 10.

4.10 Análise da Expressão Gênica

Para a análise da expressão gênica, foram escolhidos os genes supressores tumorais (*TP53*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *RB1*) e os oncogenes (*HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *PI3KCA*, *Akt*, *mTOR*, *STAT3*, *Bcl2*); todos relacionados com os sistemas de controle do crescimento celular (proliferação, diferenciação e sobrevivência). Os genes foram escolhidos de acordo com os dados descritos por nosso grupo de pesquisa que evidenciou que, os FS derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* são capazes de promover resposta inflamatória e morte celular de queratinócitos orais normais (Quadro 1).

4.10.1 Desenho de Oligonucleotídeos

Foram desenhados oligonucleotídeos (F: *forward* e R: *reverse*) analisando o perímetro de cada éxon dentro do maior transcrito com auxílio do software *OligoExplorer 1.2*, de acordo com os parâmetros T_m (temperatura de melting): 62-64 °C, GC%: 55-60%, 3' tail GC%: 40%, tamanho máximo da sequência amplificada: 90 –150 nucleotídeos. As sequências foram sintetizadas pela empresa *Integrated DNA technologies, Inc.* (IDT- Coralville, IA, EUA). Os primers foram diluídos segundo as recomendações do fabricante e quantificados por espectrofotômetro *NanoDrop™* 2000/2000c (ThermoFisher Scientific).

Quadro 1 - Descrição e sequência dos genes utilizados no estudo (Continua)

GENE	NOME	DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIA
<i>MEK1</i>	Proteína quinase ativada por mitógeno 1	Este gene codifica uma proteína membro da família das proteínas quinase, estimula a atividade enzimática das MAP quinases mediante sinais extra e intracelulares. Está envolvido nos processos celulares de proliferação, diferenciação e regulação da transcrição.	F5'-CGTGGGCACAAGGTCCTACA-3' R5'-CTCCCAACCGCCATCTCTAC-3'
<i>CDKN1B</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (p27, Kip1)	Este gene codifica à proteína p27, uma inibidora de quinases dependentes de ciclina. Controla a progressão do ciclo celular em G1, sendo importante para a transição celular do estado de quiescência para o estado proliferativo.	F5'-ACGGGGTTAGCGGAGCAATG-3' R5'-CCACAGAACCGGCATTTGGG-3'
<i>TP53</i>	Proteína de Tumor p53	Este gene codifica uma proteína supressora de tumor contendo domínios de ativação transcricional, ligação ao DNA e oligomerização. A proteína codificada responde a diversos tipos de estresse celular para regular a expressão dos genes alvo, induzindo a interrupção do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo.	F5'-GCTGAATGAGGCCTTGGAAC-3' R5'-TTATGGCGGGAGGTAGACTG-3'
<i>CDKN1A</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (p21, Cip1)	Este gene codifica à proteína p21, uma inibidora de quinases dependentes de ciclina. A expressão deste gene é controlada pela proteína supressora de tumor p53, através da qual controla a parada da fase G1 do ciclo celular em resposta a estímulos de estresse.	F5'-TGGAGACTCTCAGGGTCGAA-3' R5'-CTCCTGTGGGCGGATTAGG-3'

Quadro 1 - Descrição e sequência dos genes utilizados no estudo (continuação)

<i>RB1</i>	Retinoblastoma1	Este gene codifica uma proteína reguladora negativa do ciclo celular. Está relacionado com a estabilização da heterocromatina constitutiva para manter a estrutura geral da cromatina.	F5'-CAGAAGGTCTGCCAACACCA-3' R5'-GAGCACACGGTCGCTGTTAC-3'
<i>HRAS</i>	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato de Harvey	Esse gene pertence à família dos oncogenes Ras, cujos membros estão relacionados com os genes transformadores dos retrovírus do sarcoma de mamífero. Codifica uma proteína transdutora de sinais, que apresenta união ao GTP ou GDP, e produz uma atividade intrínseca de GTPase.	F 5'-GGCTTCCTGTGTGTGTTTGC-3' R 5'-AGCCAGGTCACACTTGTTC-3'
<i>AKT</i>	Homólogo 1 do oncogene viral de timoma murino v-akt	Este gene codifica uma proteína serina treonina quinase, sua ativação ocorre através da Fosfatidilinositol 3 quinase. Participa na transdução de sinais ao interior da célula, regulando processos relacionados com crescimento e sobrevivência celular.	F5'-TCGGGCTCACCCAGTGACAA-3' R5'-TTGCCAGCAGCTTCAGGTA- 3'
<i>STAT3</i>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	Este gene codifica uma proteína da família STAT. Regula a expressão de genes em resposta a estímulos celulares, desempenhando assim um papel fundamental em processos como crescimento celular e apoptose.	F5'-ACCATTGACCTGCCGATGTC-3' R5'-CCGAGGTCAACTCCATGTCA-3'

Quadro 1 - Descrição e sequência dos genes utilizados no estudo (conclusão)

<i>Bcl2</i>	Proteína 2 da leucemia/linfoma de células B	Este gene codifica uma proteína externa da membrana mitocondrial. Tem como função inibir a morte celular por apoptose.	F5'-CAACATCGCCCTGTGGATGA-3' R5'-GCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'
<i>BRAF</i>	Proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase	Este gene codifica uma proteína que pertence à família serina treonina quinase RAF, desempenhando um papel importante na regulação da divisão celular, diferenciação e sobrevivência.	F5'-AGGCGTCCTTAGCAGAGACT-3' R5'-AGGGCTGTGGAATTGGAATGG-3'
<i>mTOR</i>	Alvo da rapamicina em mamíferos	Este gene codifica uma proteína que pertence à família da fosfatidilinositol quinase. Tem uma função na resposta ao dano no DNA. A proteína atua como alvo da parada do ciclo celular.	F5'-CCAGCTCAGATGCCAATGAG-3' R5'-GGAGGAGTTCCGAAGATAG-3'
<i>PIK3CA</i>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade catalítica alpha	Este gene codifica uma proteína responsável por utilizar o ATP para fosforilar PtdIns, PtdIns4P e PtdIns (4,5) P2. Este gene está relacionado com vias de transdução de sinais e controle do crescimento celular.	F5'-TAGGCAAGTCGAGGCAATGG-3' R5'-GGTCGCCTCATTGCTCAAC-3'

Fonte: Elaboração própria.

4.10.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a expressão gênica, foram cultivadas $2,5 \times 10^5$ células de cada linhagem em garrafas de 25 cm² (Corning®, NY, EUA. cat. 430639), as quais foram mantidas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂ durante 40 h. Após o tempo de incubação, as células NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 foram estimuladas durante 4 h com os FS puros provenientes de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h (5 mL por poço). Para a extração de RNA das células, foram adicionados 1.000 µL de TRIzol (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. 15596026) em cada garrafa de célula, durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada amostra, sob agitação vigorosa por 15 segundos, seguido de

incubação a temperatura ambiente, por 15 minutos. Ao término da incubação, as amostras foram centrifugadas (12.000 *xg* por 15 minutos a 4°C) para a separação do RNA na porção superior (fase aquosa) e do DNA com as proteínas na porção inferior (fase orgânica - clorofórmio + trizol). A fase aquosa foi coletada e transferida para microtubos de 1,5 mL. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 250 uL de isopropanol refrigerado em cada tubo, seguidos de homogeneização delicada. As amostras foram colocadas em freezer -20 °C, durante 12 h, para melhor eficiência no processo de precipitação do RNA. Após este período, realizou-se a centrifugação das amostras (12.000 *xg* por 10 minutos a 4°C), para a obtenção do *pellet* de RNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA lavado duas vezes com etanol 70% refrigerado, de forma intercalada com centrifugações de 12.000 *xg* por cinco minutos a 4°C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o tubo aberto foi colocado na bancada para secar o resíduo de etanol. O *pellet* foi ressuspensionado em 30 uL de água molecular (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA. cat. W4502). As moléculas de RNA obtidas foram quantificadas no equipamento QuantiFluor® RNA System Protocol (Promega, Madison, WI, USA) e estocadas em freezer -80 °C.

As amostras foram tratadas com o kit DNase I, RNase-free (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA. cat. EN0521), de acordo com as recomendações do fabricante para remover resíduos de DNA genômico contaminante. Para a síntese do cDNA, foi realizada a reação de transcrição reversa do RNA, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems®, CA, EUA. cat. 4368814), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.10.3 Definição da concentração ótima dos oligonucleotídeos

A primeira etapa desta padronização consistiu na execução de uma reação de qRT-PCR, utilizando-se quatro diluições para cada um dos oligonucleotídeos (primers) anteriormente desenhados (0,25 µM, 0,50 µM, 1,0 µM e 1,5 µM) para a avaliação da concentração ideal de uso. Nesta reação, foi utilizado como template uma mistura dos cDNAs das linhagens NOK-si, SCC 25, Detroit 562, DOK (células epiteliais displásicas orais), THP1 (monócito derivado de uma leucemia monocítica aguda), a fim de garantir a expressão de todos os genes escolhidos para este estudo. A quantidade ideal de cada oligonucleotídeo foi determinada pela menor concentração utilizada de forma suficiente para obtenção do menor valor possível de *Cycle threshold*

(Ct). Os valores de Ct foram definidos na fase exponencial da reação, indicando em qual ciclo a fluorescência poderia atingir o limiar (definido como limite). Portanto, a quantidade de produto inicial da reação foi estimada por meio do número de ciclos que foram necessários para atingir o limiar de fluorescência.

4.10.4 Avaliação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos

Após a determinação da concentração ideal de cada oligonucleotídeo, foram realizadas 4 diluições seriadas de cDNAs (partindo-se da concentração de 40 ng/uL) para a verificação da eficiência de amplificação dos primers. Conforme os padrões de diluição obtidos para cada gene, foi possível obter a curva de eficiência ideal para cada par de primers. As curvas foram obtidas a partir da interpolação dos valores de Ct obtidos em cada reação (Eixo Y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA das amostras (Eixo X). A reta média foi traçada a partir dos valores médios de Ct de cada diluição de cDNA e a eficiência da reação (E) de qRT-PCR foi calculada, utilizando-se a fórmula: $\text{Eficiência} = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$, sendo o slope correspondente ao coeficiente de inclinação da reta da curva padrão. Uma reação com 100% de eficiência apresentaria um valor de slope de -3,3 para análises da variação de Ct em função do \log_{10} de diluições de cDNA. O coeficiente de correlação (R^2) determina a proximidade entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras, onde valores próximos a 1 indicaria uma proporção ideal entre esses parâmetros, que sob condições ideais de amplificação, seria correspondente à quantidade de produto gerado de maneira exponencial (dobrando a cada ciclo da reação).

A expressão relativa do mRNA foi quantificada usando-se o qRT-PCR *Gene Amp® 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems®, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram detectados com *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, CA, EUA. cat.4367659). Em cada reação de volume final igual a 12 uL, foram utilizados 3 uL de solução de oligonucleotídeos (*Forward* e *Reverse*) em concentração variável de acordo com os protocolos descritos em 4.10.3 e 4.10.4; 6 uL de *SYBR Green*, e 3 uL de cDNA. O gene *HPRT* (hipoxantina guanina fosforribosil transferase) foi usado como controle interno (gene normalizador)⁷⁹. O ensaio foi realizado em triplicata, em duas ocasiões independentes (n=6). O nível de expressão relativa foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁸⁰

4.11 Análise Estatística

Para a análise de dados, os valores obtidos para o teste de viabilidade celular foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Shapiro Wilks. Como os dados de viabilidade celular não apresentaram normalidade, foram aplicados testes de Kruskal-Wallis com o teste de comparação múltipla de Dunn, usando-se o software GraphPad PRISM vs 8.0. O nível de significância adotado foi de 5%. A distribuição das fases do ciclo celular, por Citometria de fluxo, foi analisada com o *Watson Pragmatic model* pelo software FlowJo™ (Windows) vs 10. O nível de expressão gênica relativa foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores de expressão relativa, referentes às reações de qRT-PCR, foram analisados estatisticamente por intervalos de confiança (IC), com nível de confiança de 95% no software GraphPad PRISM.

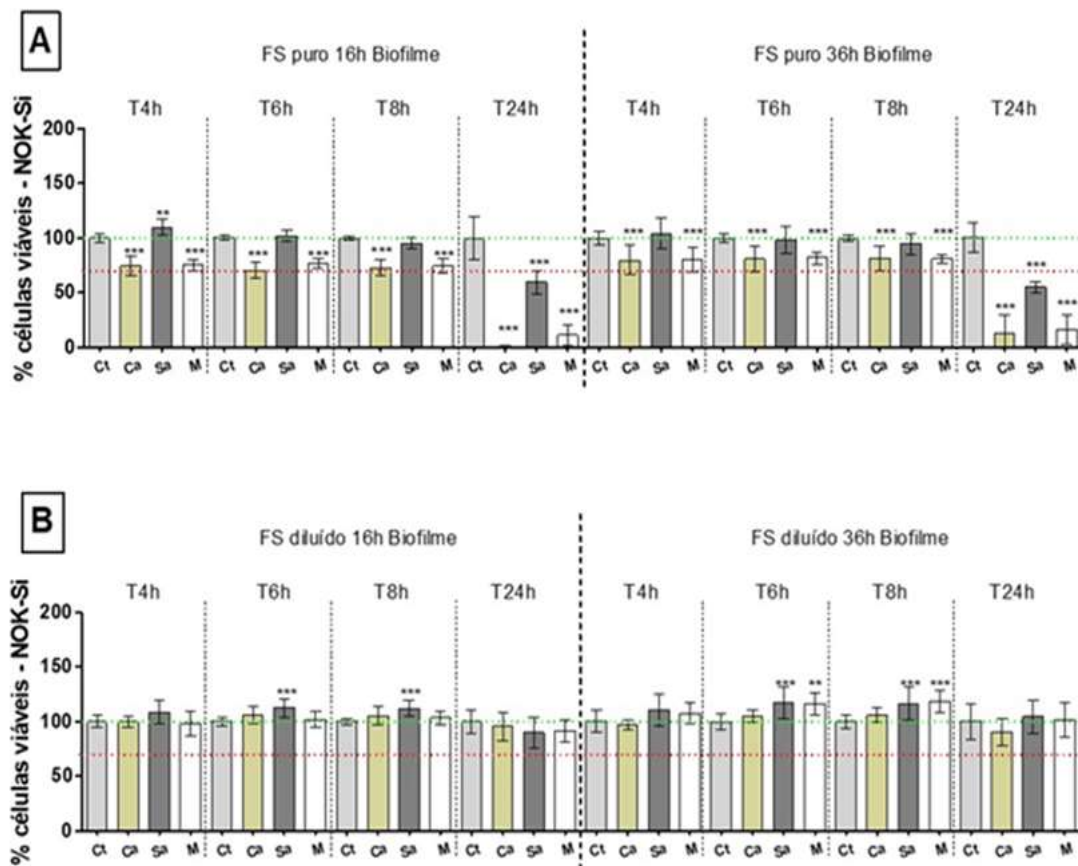
5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular por AlamarBlue™ foi realizado para avaliar o perfil de viabilidade das linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562, após os estímulos durante 4 h, 6 h, 8 h, e 24 h com FS puros e diluídos, derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h (Figuras 4, 5, 6). Foi observado que o perfil de viabilidade celular de NOK-si (Figura 4A), após o estímulo com FS derivados de biofilmes puros foi semelhante ao de 36 h para todos os tempos avaliados. Um leve incremento na quantidade de células viáveis foi observado na linhagem celular NOK-si, após o estímulo com FS de biofilmes de *S. aureus* de 16 h após 4 h de estímulo, porém, o estímulo com FS de biofilmes de *S. aureus* de 36 h não produziu para esta linhagem, diferença estatisticamente significante quando comparado com o grupo controle (Ct). O estímulo com os FS puros derivados de biofilmes simples de *C. albicans* e misto apresentou uma diferença estatística importante na diminuição da viabilidade celular depois de 4 h de estímulo e, principalmente, após 24 h. Para o estímulo com FS diluídos derivados de biofilmes de 16 h e 36 h não houve alterações significativas na viabilidade celular para linhagem NOK-si (Figura 4B). A linhagem celular SCC 25 apresentou um índice de viabilidade celular igual ou superior ao do grupo controle (Ct), após o estímulo de 4 h com FS derivados de biofilmes puros de *S. aureus* de 16 h, porém, estímulos de 6 h, 8 h e 24 h com FS puros derivados de biofilmes de *C. albicans* e misto de 16 h e 36 h produziram uma redução na viabilidade celular (Figura 5A). Foi observada uma diminuição na viabilidade celular da linhagem SCC 25 quando as células foram mantidas em contato com os FS derivados do biofilme de *C. albicans* de 36 h diluído. Os biofilmes de *S. aureus* e misto de 16 h diluídos, produziram esta mesma modulação na viabilidade celular desta linhagem após 24 h de estímulo. Os FS derivados de biofilmes de *C. albicans* e misto de 16 h e 36 h puros produziram na linhagem celular Detroit 562 uma diminuição significativa na viabilidade celular (Figura 6A). O estímulo a partir de 4 h com o FS derivados do biofilme de 36 h de *S. aureus*, produziu nesta linhagem uma diminuição na viabilidade celular quando comparado com o grupo controle. Os FS derivados do biofilme misto de 36 h diluído, produziram um índice de viabilidade celular igual ou superior ao do grupo controle nesta linhagem celular após 24 h de estímulo (Figura 6B). Em geral os FS puros derivados dos biofilmes de *C.*

albicans e misto de 16 h e 36 h promoveram na linhagem celular metastática Detroit 562 uma diminuição de cerca do 50% no índice de viabilidade celular em um primeiro momento (4 h), porém esses estímulos mostraram a capacidade de promover alterações no perfil de viabilidade celular nessa linhagem, aumentando assim o índice de viabilidade após 24 h. A linhagem celular NOK-si foi mais suscetível do que as linhagens celulares neoplásicas, após 24 h de exposição aos FS puros derivados de biofilmes de 16 h e 36 h de *C.albicans* e misto.

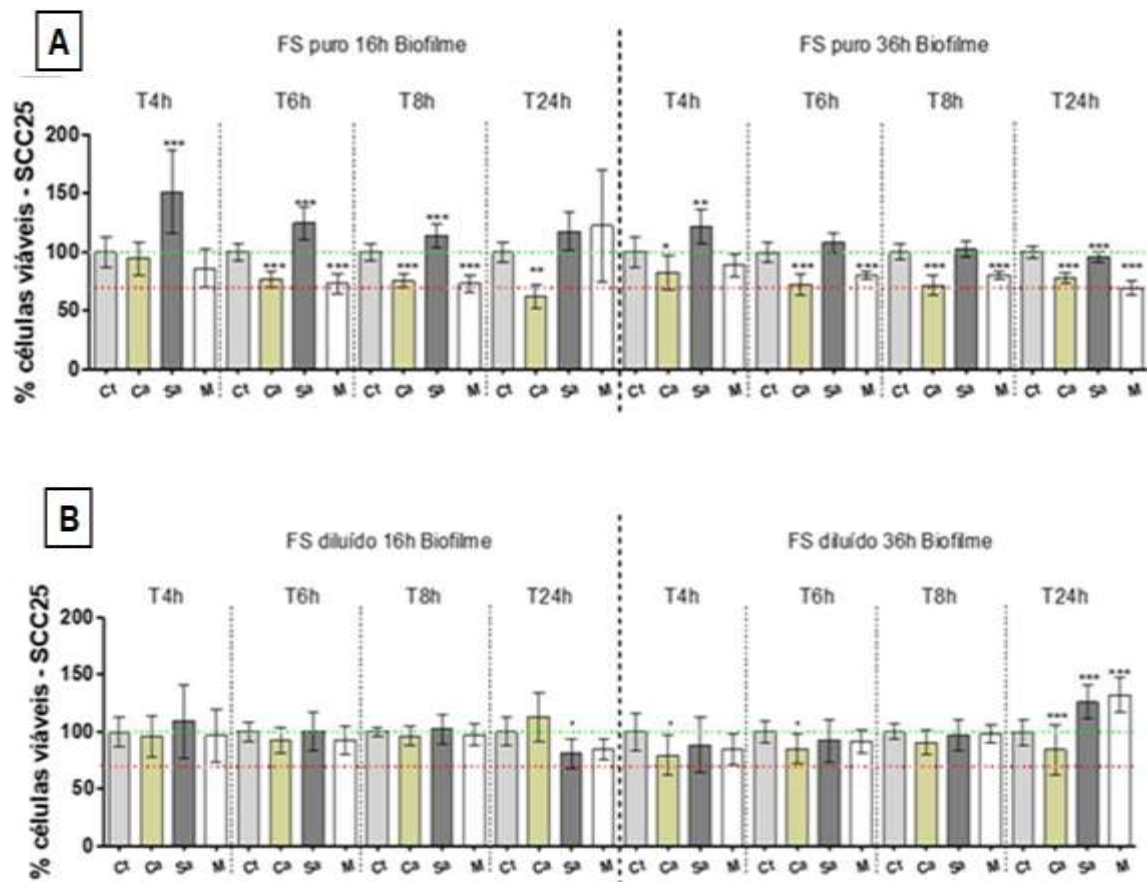
Figura 4 – Perfil de viabilidade celular. Linhagem celular NOK-si estimulada com FS puros e diluídos derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h.



A viabilidade celular da linhagem NOK-si foi avaliada pelo ensaio de AlamarBlue™ após 4,6,8, e 24 h de estímulo com FS puros (A) e diluídos (B) derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M) de 16 e 36 h. Dados não paramétricos (médias e desvios-padrão). ANOVA a 1 fator – “Kruskal- Wallis test” – “Dunn`s Multiple Comparison Test” * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle (Ct) dentro de cada período de análise. A linha tracejada vermelha corresponde ao 100% de células viáveis, a linha tracejada verde corresponde ao 70% de células viáveis.

Fonte: Elaboração própria.

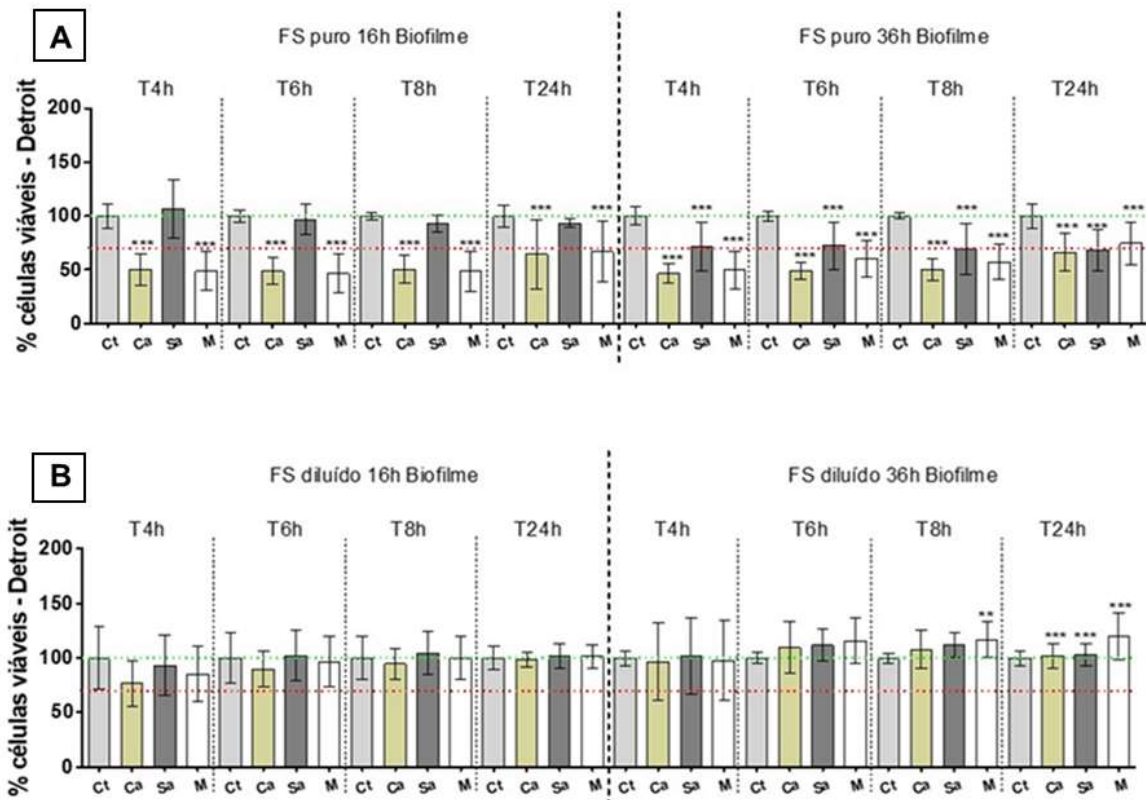
Figura 5 – Perfil de viabilidade celular. Linhagem celular SCC 25 estimulada com FS puros e diluídos derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h.



A viabilidade celular da linhagem SCC 25 foi avaliada pelo ensaio de AlamarBlue™ após 4,6,8, e 24 h de estímulo com FS puros (A) e diluídos (B) derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M) de 16 e 36 h. Dados não paramétricos (médias e desvios-padrão). ANOVA a 1 fator – “Kruskal- Wallis test” – “Dunn`s Multiple Comparison Test” * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle (Ct) dentro de cada período de análise. A linha tracejada vermelha corresponde ao 100% de células viáveis, a linha tracejada verde corresponde ao 70% de células viáveis.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 – Perfil de viabilidade celular. Linhagem celular Detroit 562 estimulada com FS puros e diluídos derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h.



A viabilidade celular da linhagem Detroit 562 foi avaliada pelo ensaio de AlamarBlue™ após 4,6,8, e 24 h de estímulo com FS puros (A) e diluídos (B) derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M) de 16 e 36 h. Dados não paramétricos (médias e desvios-padrão). ANOVA a 1 fator – “Kruskal- Wallis test” – “Dunn’s Multiple Comparison Test” * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle (Ct) dentro de cada período de análise. A linha tracejada vermelha corresponde ao 100% de células viáveis, a linha tracejada verde corresponde ao 70% de células viáveis.

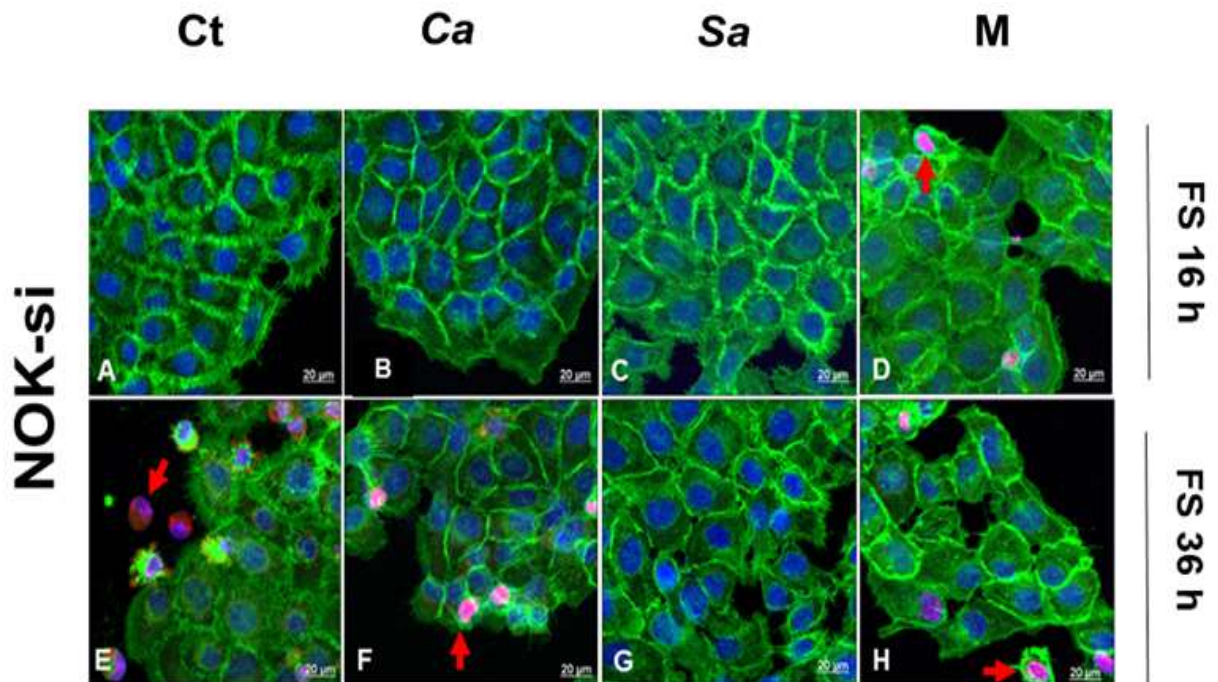
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Morfologia Celular e Permeabilidade da Membrana

A microscopia confocal foi realizada para avaliar a morfologia celular e a integridade da membrana plasmática das linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562, após o estímulo com FS solúveis puros derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h e 36 h (Figuras 7, 8, 9). As células foram estimuladas durante 4 h com os FS puros derivados destes biofilmes e observou-se que a F-actina, que conforma o citoesqueleto de cada uma das linhagens cultivadas em monocamada, foi marcada seletivamente com a faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488, mostrando uma estrutura organizada e sem alterações da actina do

citoesqueleto das diferentes linhagens (verde). Os núcleos celulares mostraram-se esféricos e marcados de maneira uniforme pelo reagente Hoescht 33342 (azul), seguindo a direção do citoesqueleto. A marcação com iodeto de propídeo (rosa) foi evidente na linhagem celular NOK-si, após 4 h de estímulo com os FS mistos de 16 e 36 h (Figuras 7D, 7H). A mesma marcação também foi observada para o estímulo nesta linhagem celular com FS de biofilmes de 36 h de *C. albicans* (Figura 7F). A linhagem celular SCC 25 mostrou marcação com iodeto de propídeo apenas para o estímulo de 4 h com FS provenientes do biofilme misto de 16 h (Figura 8D). Na linhagem celular Detroit 562, a marcação com iodeto de propídeo foi evidente, após o estímulo com FS derivados de biofilmes simples de *C. albicans* de 16 h e 36 h (Figuras 9B, 9F) e, também, após o estímulo com FS de biofilmes mistos, de 16 h e 36 h (Figuras 9D, 9H).

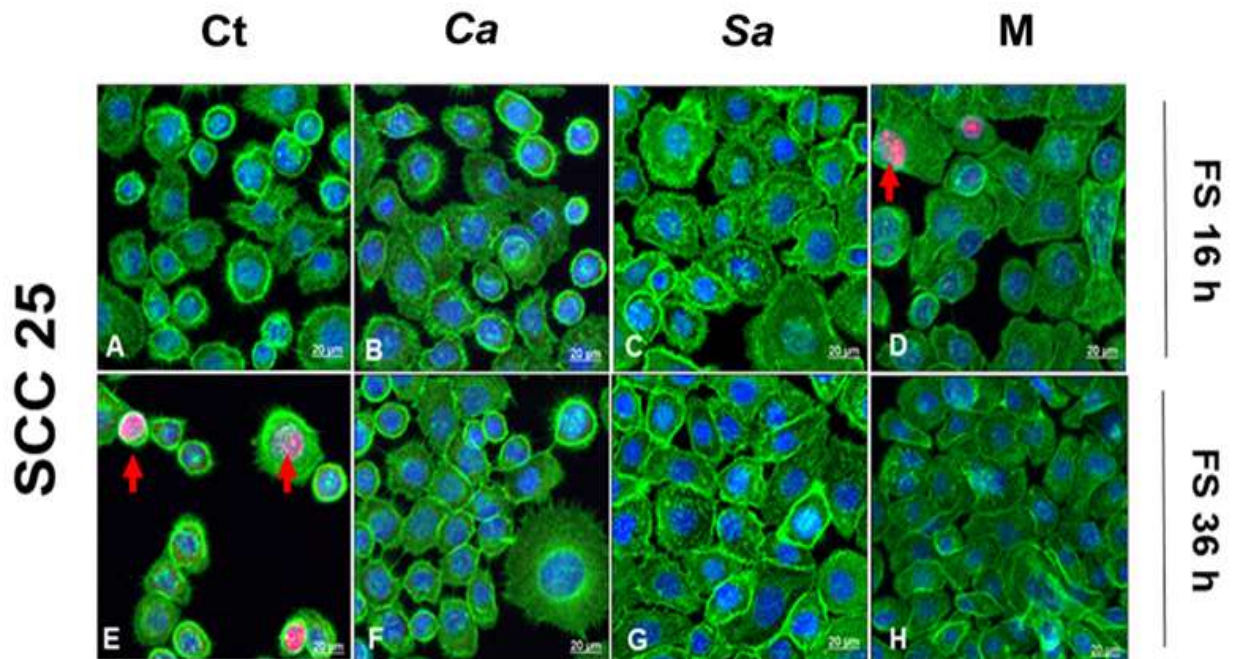
Figura 7 - Imagens adquiridas por microscopia confocal da linhagem celular NOK-si cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo com FS puros, derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h.



NOK-si cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo com FS derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa) e misto (M) de 16 e 36 h. Para visualizar o citoesqueleto, as células foram marcadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488 (verde). Os núcleos foram marcados com Hoescht 33342 (azul). A marcação com iodeto de propídeo (rosa) foi realizada para avaliar a integridade da membrana celular. (A) Células cultivadas em condições padrão no meio RPMI-1640 suplementado (ct). (E) Células expostas a camptotecina 10 µg/mL (marcação positiva para iodeto de propídeo). Observou-se marcação positiva com iodeto de propídeo após o estímulo com o FS de biofilmes mistos, de 16 h (D) e de 36 h (H). O estímulo com FS de *C. albicans* de 36 h (F) também apresentou marcação positiva para iodeto de propídeo. A barra nas imagens corresponde a 20 µm.

Fonte: Elaboração própria.

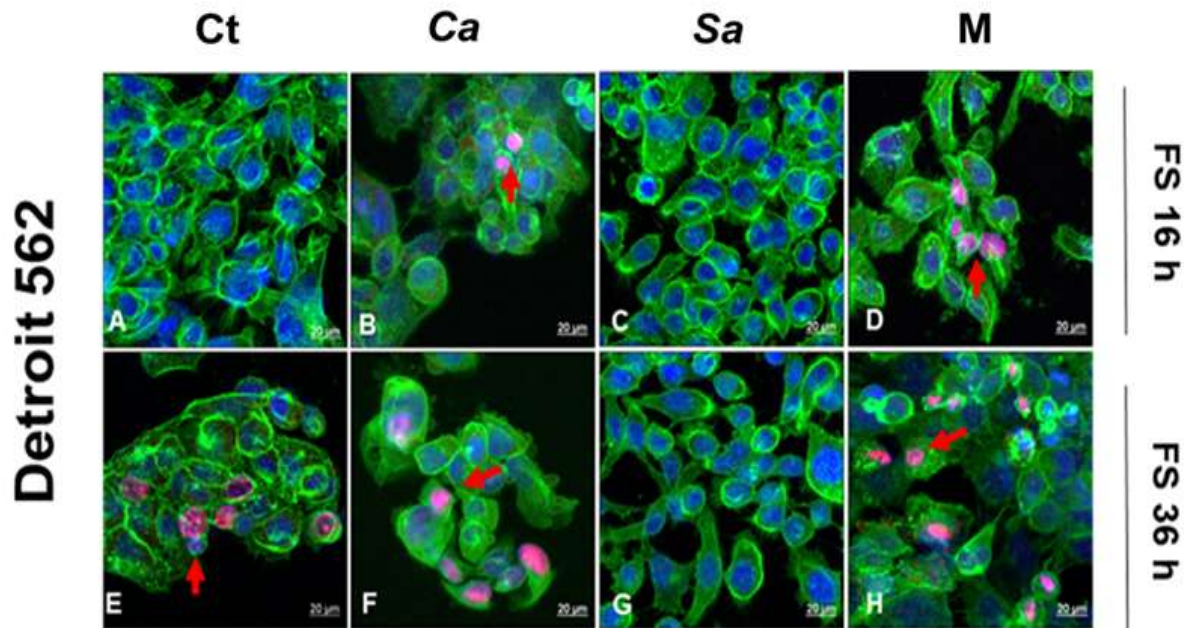
Figura 8 - Imagens adquiridas por microscopia confocal da linhagem celular SCC 25 cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo com FS, puros, derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h.



SCC 25 cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo. com FS derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa) e misto (M) de 16 e 36 h. Para visualizar o citoesqueleto, as células foram marcadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488 (verde). Os núcleos foram marcados com Hoescht 33342 (azul). A marcação com iodeto de propídeo (rosa) foi realizada para avaliar a integridade da membrana celular. Células cultivadas em condições padrão no meio RPMI-1640 suplementado (ct) (A). Células estimuladas com camptotecina 10 µg/mL (marcação positiva para iodeto de propídeo) (E). Observou-se marcação positiva com iodeto de propídeo após o estímulo com o FS de biofilme misto, de 16 h (D). A barra nas imagens corresponde a 20 µm.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Imagens adquiridas por microscopia confocal da linhagem celular Detroit 562 cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo com FS, puros, derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h.



Detroit 562 cultivada em monocamada, após 4 h de estímulo. com FS derivados de biofilmes simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa) e misto (M) de 16 e 36 h. Para visualizar o citoesqueleto, as células foram marcadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 488 (verde). Os núcleos foram marcados com Hoescht 33342 (azul). A marcação com iodeto de propídeo (rosa) foi realizada para avaliar a integridade da membrana celular. Células cultivadas em condições padrão no meio RPMI-1640 suplementado (ct) (A). Células estimuladas com camptotecina 10 µg/mL (marcação positiva para iodeto de propídeo) (E). Observou-se marcação positiva com iodeto de propídeo após o estímulo com FS de biofilmes de *C. albicans*, de 16 h (B) e 36 h (F), e com o FS de biofilmes mistos, de 16 h (D) e de 36 h (H). A barra nas imagens corresponde a 20 µm.

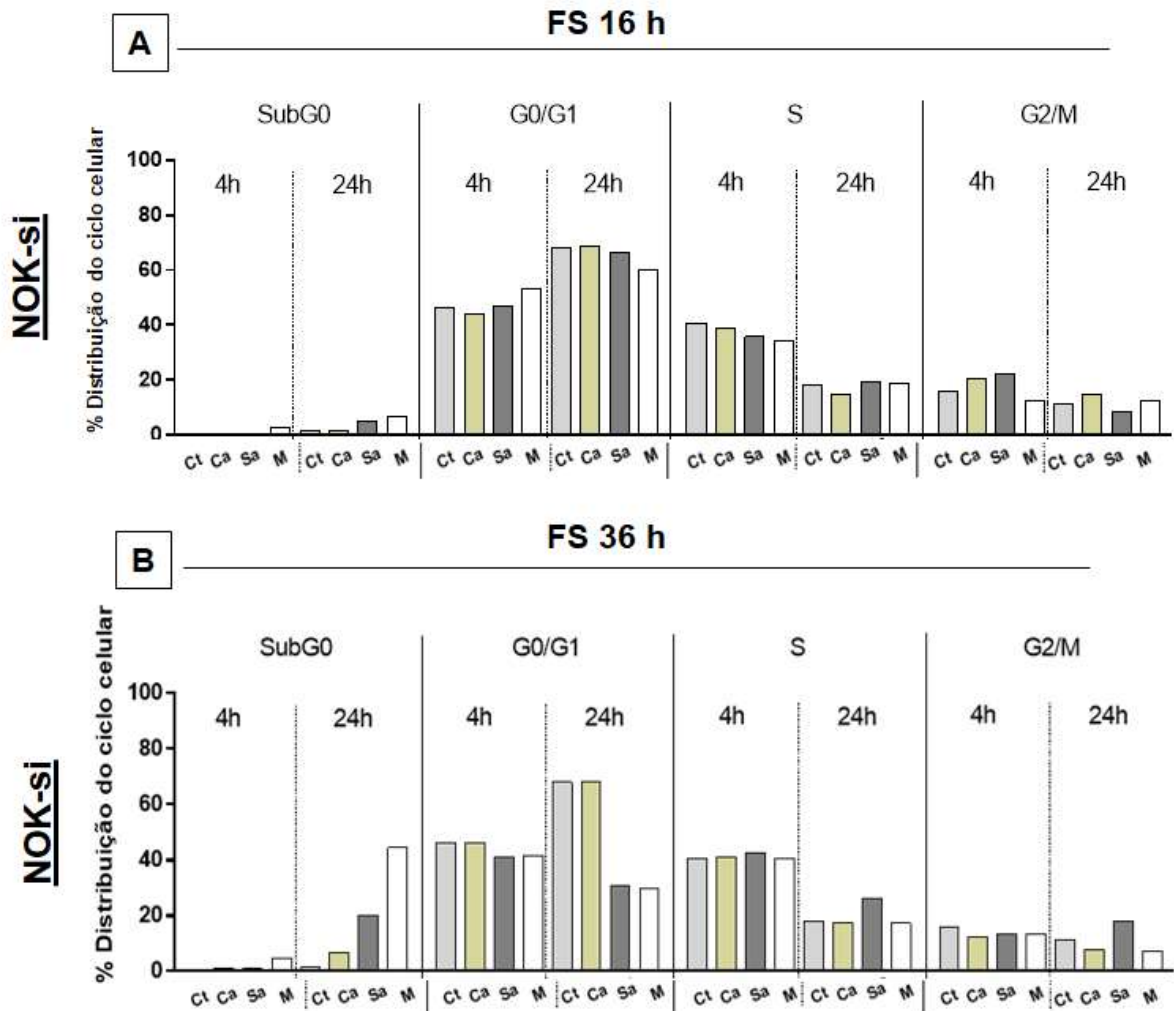
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Ciclo Celular

A distribuição do ciclo celular foi analisada após estímulos de 4 h e 24 h com FS puros derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h, para determinar possíveis alterações na proliferação celular das linhagens celulares NOK-si, SCC 25 e Detroit 562 (Figuras 10 a 15). Não foram observadas alterações na distribuição do ciclo celular em relação ao grupo controle (Ct) para a linhagem NOK-si, quando estimulada durante 4 h e 24 h com FS derivados de biofilmes de 16 h (Figura 10A). Porém estímulos de 24 h com FS derivados de biofilmes de 36 h apresentaram um aumento na população sub-G0, principalmente para o estímulo com o FS derivado do biofilme misto, e aumento significativo da

população G2/M, após o estímulo com FS derivados do biofilme de *S. aureus* (Figura 10B). Uma redução na porcentagem de células em fase G1 foi observada após o estímulo de 24 h com FS derivados de biofilmes simples de *S. aureus* e misto de 36 h (Figura 11B). A linhagem celular SCC 25 apresentou um aumento na população sub-G0, principalmente após o estímulo de 24 h com FS derivados dos biofilmes de 16 h de *C. albicans*, *S. aureus* e misto (Figura 12A). Estímulos de 24 h com FS derivados de biofilmes de *S. aureus* e misto, de 16 e 36 h, induziram nesta mesma linhagem uma redução na fase G1 (Figuras 13A, 13B). A linhagem celular Detroit 562 mostrou um aumento na população sub-G0, após 4 h de estímulo, principalmente com os FS derivados de biofilmes de *S. aureus* e misto, de 16 h e 36 h (Figuras 14A, 14B); sob este mesmo estímulo, as células metastáticas mostraram ter uma redução no número de células em fase G1, durante períodos de estimulação de 4 e 24 h (Figuras 15A, 15B). O estímulo de 24 h com o FS derivado do biofilme de *C. albicans* de 36 h também promoveu uma leve diminuição na fase G1 (Figura 15B). Nesta linhagem celular também foi observada uma tendência significativa de aumento da população em G2/M, após 24 h de estímulo com os FS derivados de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, de 16 h e 36 h.

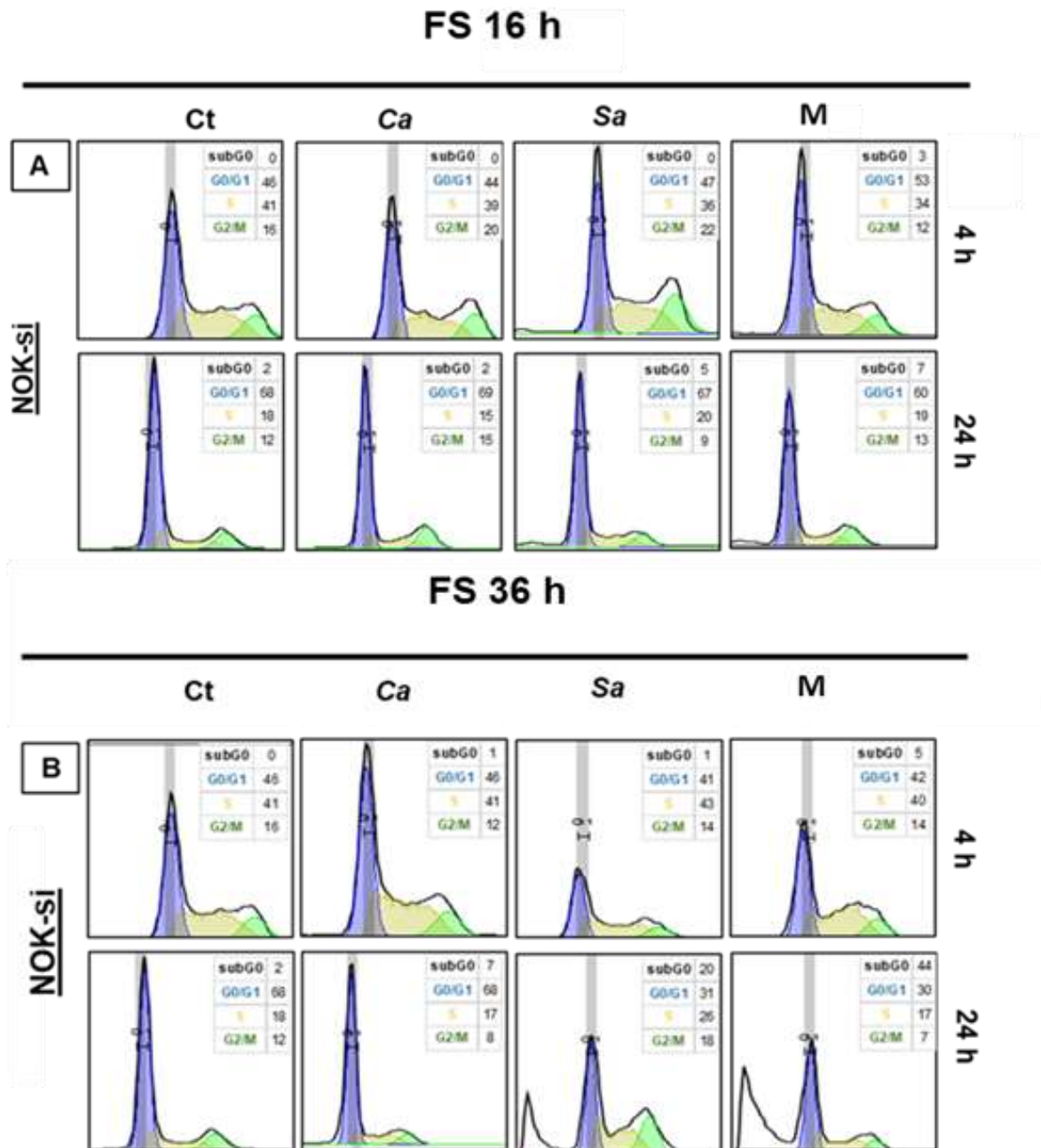
Figura 10 – Distribuição do ciclo celular da linhagem NOK-si (A), estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).



As células foram fixadas e marcadas com PI e o conteúdo de DNA para cada linhagem foi analisado por citometria de fluxo. A distribuição do ciclo celular (Sub-G0, G0/G1, S, G2/M) foi analisada após estímulos de 4 e 24 h.

Fonte: Elaboração própria.

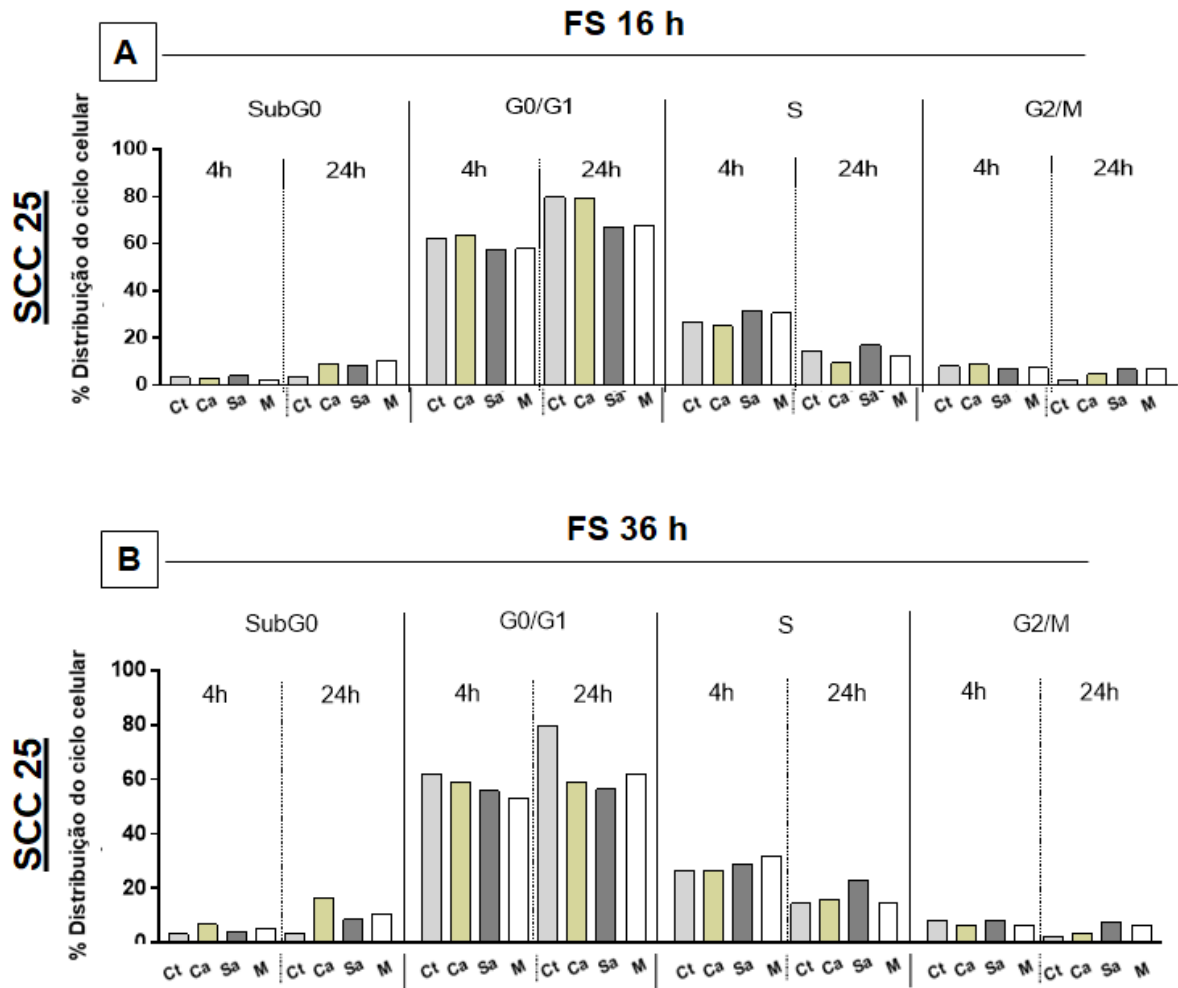
Figura 11 – Distribuição das fases do ciclo celular na linhagem NOK-si, estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B) simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).



Histogramas das fases G0/G1 (azul), S (amarelo) e G2/M (verde) analisado na linhagem celular NOK-si após 4 e 24 h de estímulo com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M). O quadro dentro de cada histograma representa a taxa de distribuição (%) de cada fase do ciclo celular. Sub-G0/G1: população vista à esquerda do pico G0/G1. Análise realizada com o *Watson Pragmatic model* pelo programa FlowJo™ software (Windows) v10.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Distribuição do ciclo celular da linhagem SCC 25, estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 – Distribuição das fases do ciclo celular na linhagem SCC 25 estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).

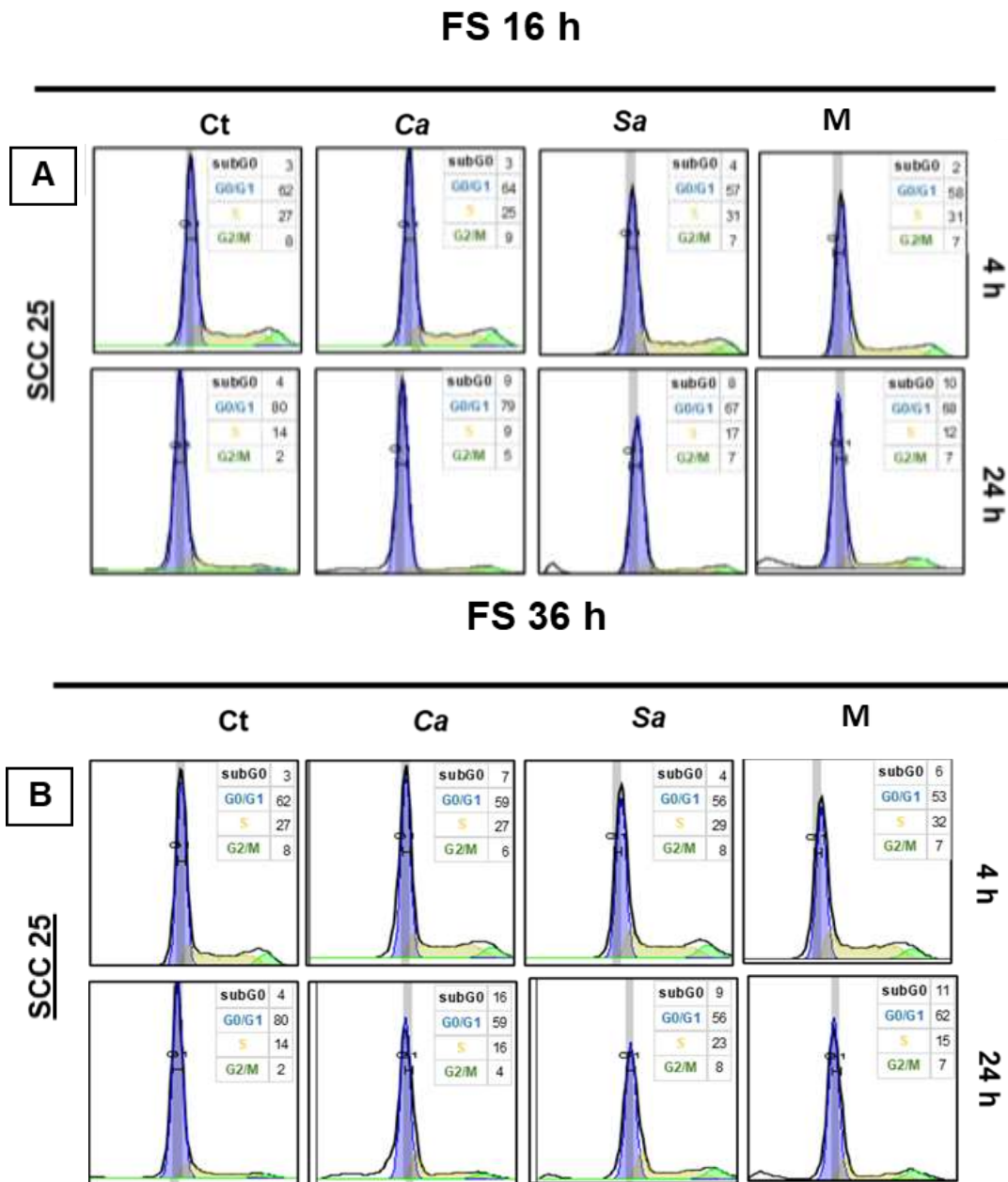
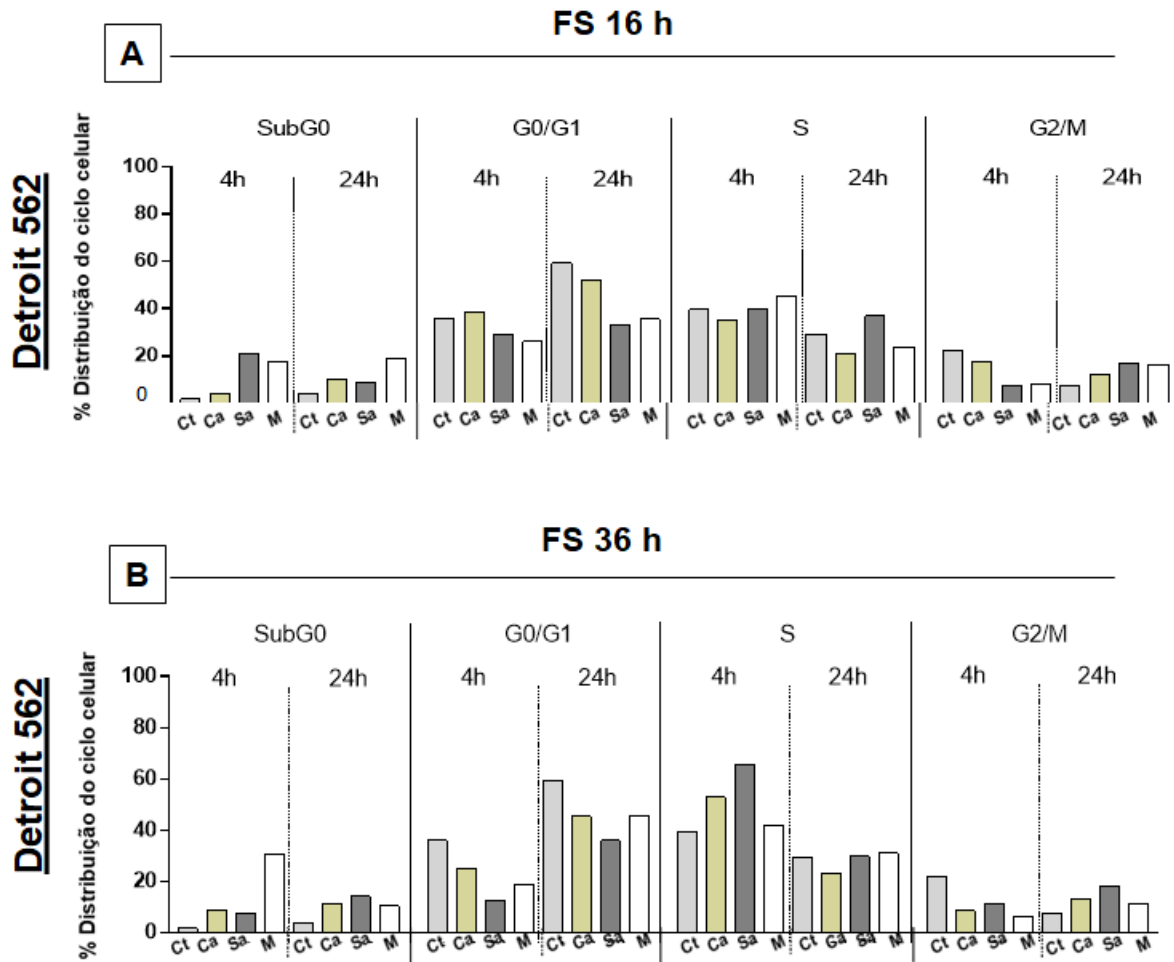
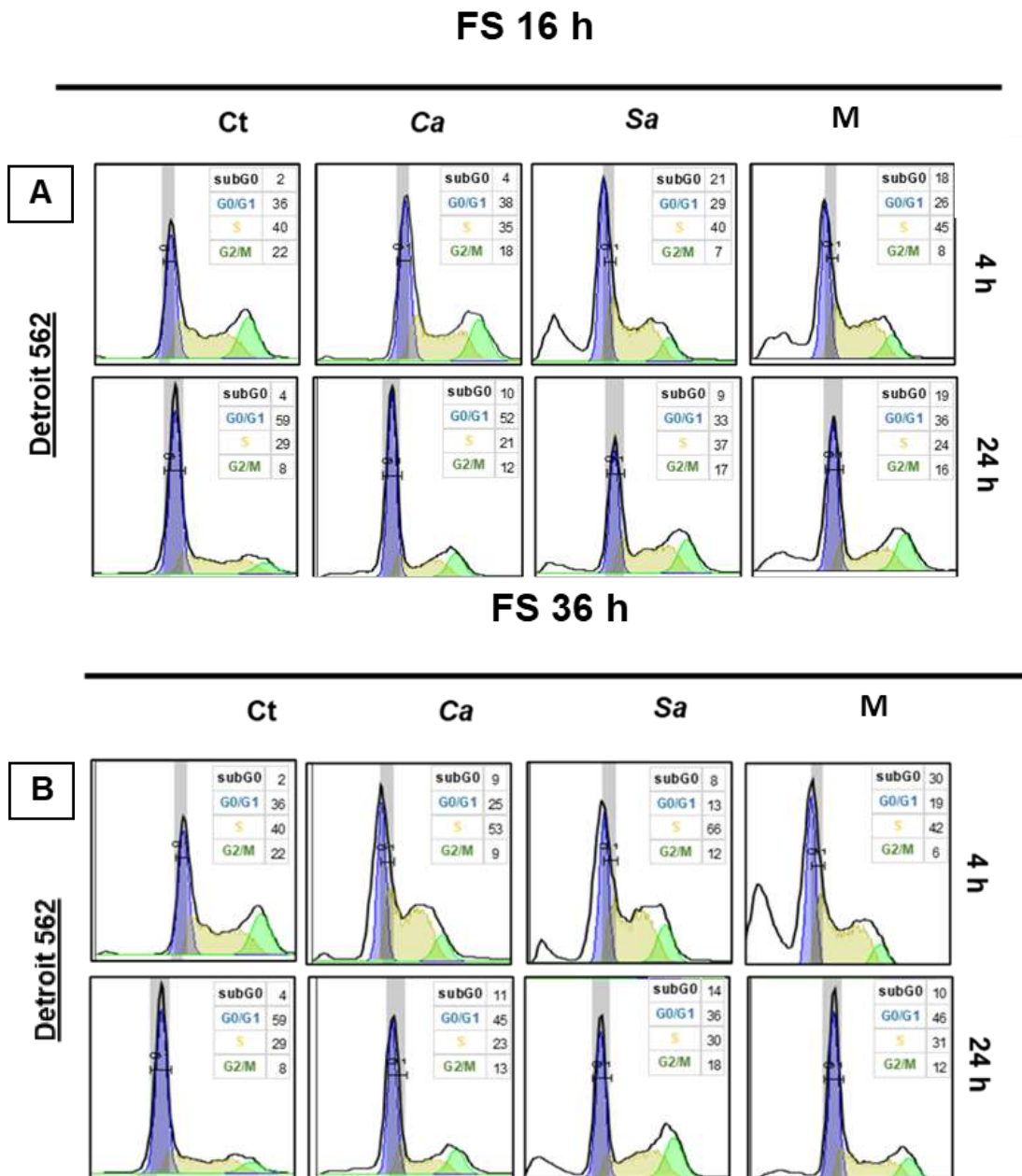


Figura 14 – Distribuição do ciclo celular da linhagem Detroit 562, estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 – Distribuição das fases do ciclo celular na linhagem Detroit 562 estimulada com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M).



Histogramas das fases G0/G1 (azul), S (amarelo) e G2/M (verde) analisado na linhagem celular Detroit 562 após 4 e 24 h de estímulo com FS derivados de biofilmes de 16 (A) e 36 h (B), simples de *C. albicans* (Ca) e *S. aureus* (Sa), e misto (M). O quadro dentro de cada histograma representa a taxa de distribuição (%) de cada fase do ciclo celular. Sub-G0/G1: população vista à esquerda do pico G0/G1. Análise realizada com o *Watson Pragmatic model* pelo programa FlowJo™ software (Windows) v10.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Padronização da Concentração Ótima dos Primers

Nas Tabelas de 1 a 12, encontram-se os valores de Ct das reações realizadas em triplicata para os genes *MEK1*, *CDKN1B*, *TP53*, *CDKN1A*, *RB1*, *HRAS*, *AKT*, *STAT3*, *Bcl2*, *BRAF*, *mTOR*, *PI3KCA*. As concentrações ideais obtidas para cada primer foram destacadas nas tabelas abaixo.

Tabela 1 - Padronização da concentração ótima dos primers para MEK1

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,25 uM	23,39114	23,48761	23,49142	23,45672035	0,05683
0,50 uM	23,34541	23,33335	23,55457	23,41111056	0,124387
1,0 uM	23,93425	23,95887	23,92875	23,94062424	0,016041
1,5 uM	23,9317	23,96354	23,90739	23,9342111	0,02816

Fonte: Elaboração própria

Tabela 2 - Padronização da concentração ótima dos primers para CDKN1B

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,25 uM	18,63142	17,94941	18,59716	18,39266205	0,384248
0,50 uM	18,03528	18,42237	18,33397	18,26387533	0,20284
1,0 uM	18,28705	18,53552	18,28965	18,37074089	0,142708
1,5 uM	18,57637	18,57846	17,47224	18,2090257	0,638072

Fonte: Elaboração própria

Tabela 3 - Padronização da concentração ótima dos primers para TP53

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,25 uM	24,33379	24,44446	26,08793	24,95539411	0,982368
0,50 uM	21,91327	21,90869	21,17542	21,66579119	0,424681
1,0 uM	21,09546	21,36776	21,2	21,22107251	0,13737
1,5 uM	21,55495	21,89834	21,25717	21,57015101	0,320856

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Padronização da concentração ótima dos primers para CDKN1A

	Cycle threshold				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR
0,25 uM	23,27073	23,47711	22,60033	23,1160539	0,458399
0,50 uM	23,26449	23,49494	22,7144	23,15794563	0,40103
1,0 uM	23,00523	23,24408	22,90497	23,05142403	0,17421
1,5 uM	23,31672	23,34867	23,11993	23,26177152	0,123876

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Padronização da concentração ótima dos primers para RB1

	Cycle threshold				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR
0,25 uM	22,9934	23,02306	22,97651	22,9976565	0,023562
0,50 uM	23,13475	23,10147	23,03014	23,08878708	0,053446
1,0 uM	23,17321	23,21029	23,33214	23,23854637	0,083148
1,5 uM	23,85428	23,78025	23,88603	23,84018771	0,054276

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Padronização da concentração ótima dos primers para HRAS

	Cycle threshold				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR
0,25 uM	23,04007	23,04171	23,02065	23,03414218	0,011717
0,50 uM	23,29166	23,36024	23,90901	23,52030182	0,338373
1,0 uM	23,13241	23,44908	23,24832	23,27660306	0,160217
1,5 uM	23,55815	23,39353	23,26809	23,40659014	0,145472

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Padronização da concentração ótima dos primers para AKT

	Cycle threshold				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR
0,25 uM	21,52407	21,51408	21,53105	21,52306747	0,008532
0,50 uM	22,12604	21,79253	20,90358	21,60738182	0,631912
1,0 uM	21,72647	21,5871	20,85338	21,38898023	0,46905
1,5 uM	21,79368	21,64231	21,19033	21,54210599	0,313906

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 - Padronização da concentração ótima dos primers para STAT3

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,25 uM	22,81854	22,85795	22,87994	22,8521417	0,031108
0,50 uM	22,91269	22,93105	22,90557	22,91644033	0,013147
1,0 uM	23,20491	23,29346	23,1216	23,20665741	0,085941
1,5 uM	23,38059	23,38231	23,38967	23,38419088	0,00482

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 - Padronização da concentração ótima dos primers para Bcl2

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,25 uM	20,80219	20,77987	20,6642	20,74875323	0,074071
0,50 uM	20,88825	20,98388	20,53324	20,8017896	0,23744
1,0 uM	20,8104	20,77364	20,71664	20,76689339	0,047243
1,5 uM	20,9029	20,63411	20,69412	20,74370956	0,141091

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 10 - Padronização da concentração ótima dos primers para BRAF

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,125 uM	28,33936	28,27534	28,22859	28,28109805	0,05561
0,25 uM	27,90993	27,9279	27,8249	27,88757579	0,055017
0,50 uM	27,75543	27,73575	27,71334	27,73483785	0,021061
1,0 uM	27,52165	27,40295	27,41623	27,44694392	0,065036

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 11 - Padronização da concentração ótima dos primers para mTOR

	Cycle threshold			Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,125 uM	22,58069	22,64791	22,65477	22,62778854	0,040931
0,25 uM	22,35378	22,31167	22,61749	22,42764727	0,165749
0,50 uM	21,76091	22,27301	22,20846	22,08079402	0,278898
1,0 uM	21,47796	21,42689	21,45304	21,45262973	0,025538

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 12 - Padronização da concentração ótima dos primers para PI3KCA

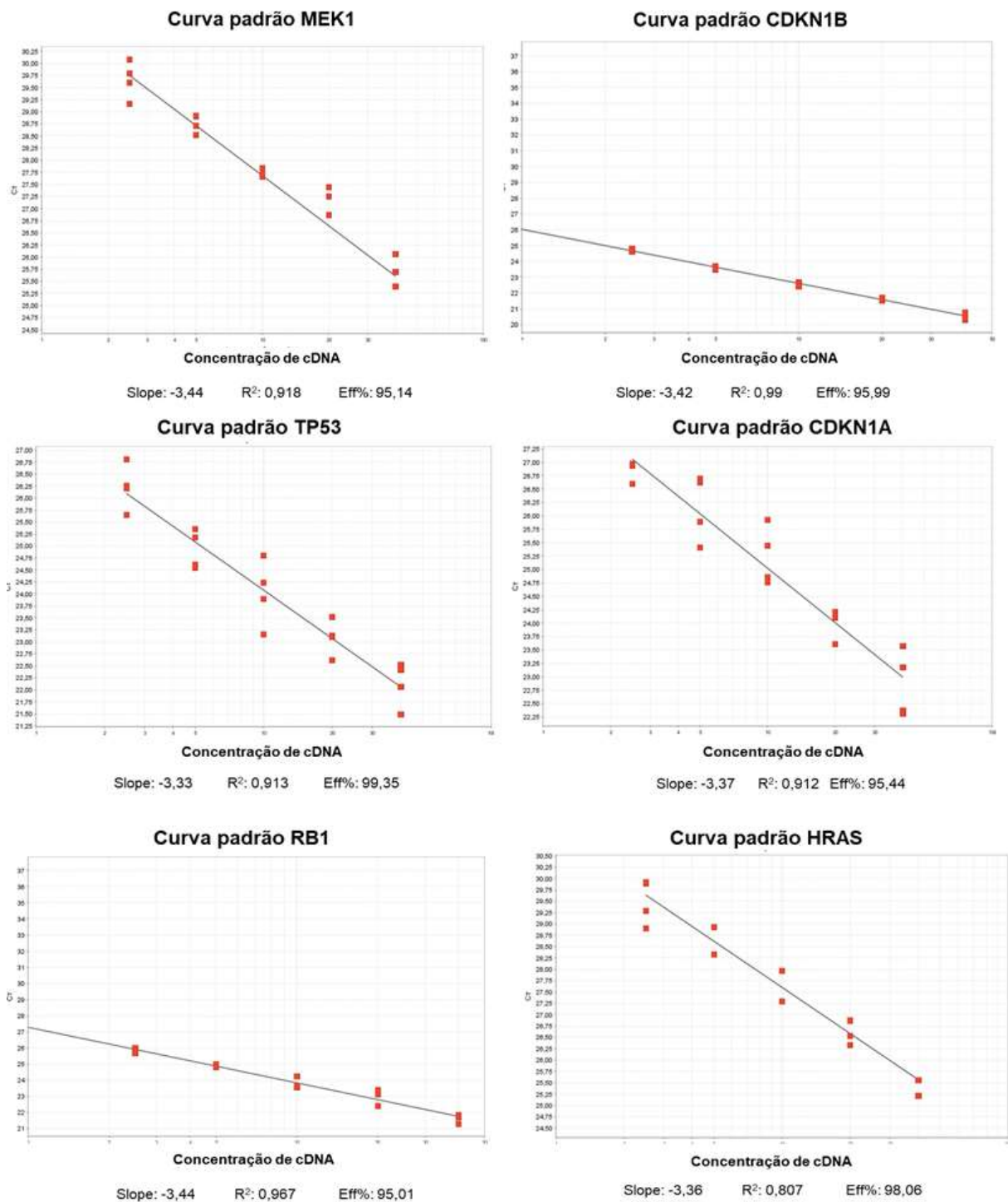
	Cycle threshold				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR
0,125 uM	27,68341	27,15195	26,5364	27,12392108	0,574019
0,25 uM	26,8675	26,88791	26,89913	26,88484764	0,016037
0,50 uM	26,74709	26,73715	26,81834	26,76752726	0,044287
1,0 uM	26,42015	26,48395	26,6379	26,5139974	0,111943

Fonte: Elaboração própria.

5.5 Eficiência de Amplificação dos Primers

O nível de mRNA dos genes em estudo foram avaliados no mix de cDNA's das linhagens celulares através de qRT-PCR, utilizando o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green®. O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A verificação da eficiência dos primers foi calculada por meio da reta média. Os gráficos foram obtidos pelo software do equipamento 7500 Real Time PCR System (Figuras 16, 17).

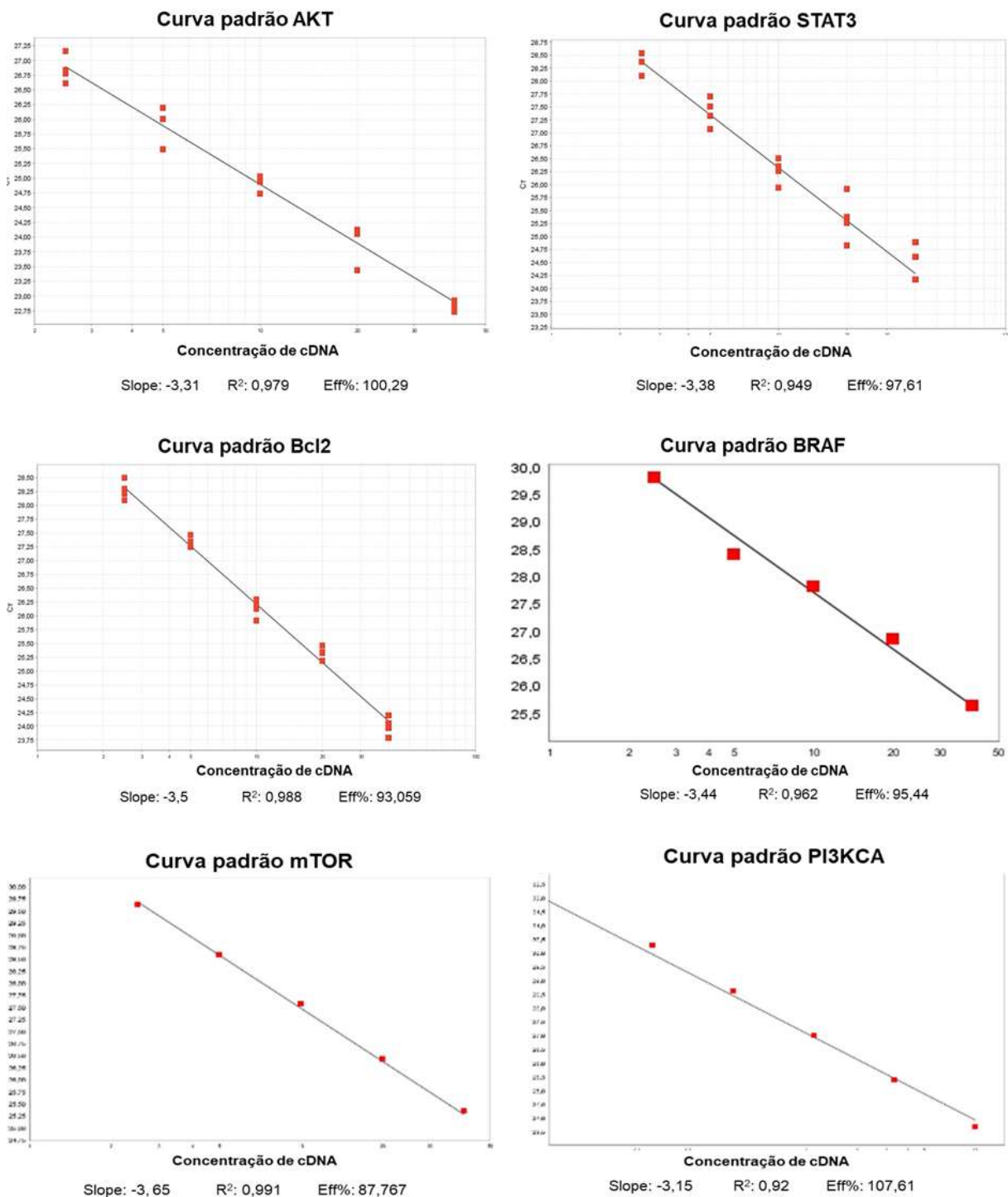
Figura 16 - Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação dos primers *MEK1*, *CDKN1B*, *TP53*, *CDKN1A*, *RB1*, *HRAS*.



As curvas foram obtidas a partir da interpolação dos valores de Ct obtidos de cada reação (Eixo Y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA das amostras (Eixo X). A reta média foi traçada a partir dos valores médios de Ct de cada diluição de cDNA e a eficiência da reação (E) de qRT-PCR foi calculada pelo software do equipamento 7500 Real Time PCR System.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 - Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação dos primers *AKT*, *STAT3*, *Bcl2*, *BRAF*, *mTOR*, *PI3KCA*.



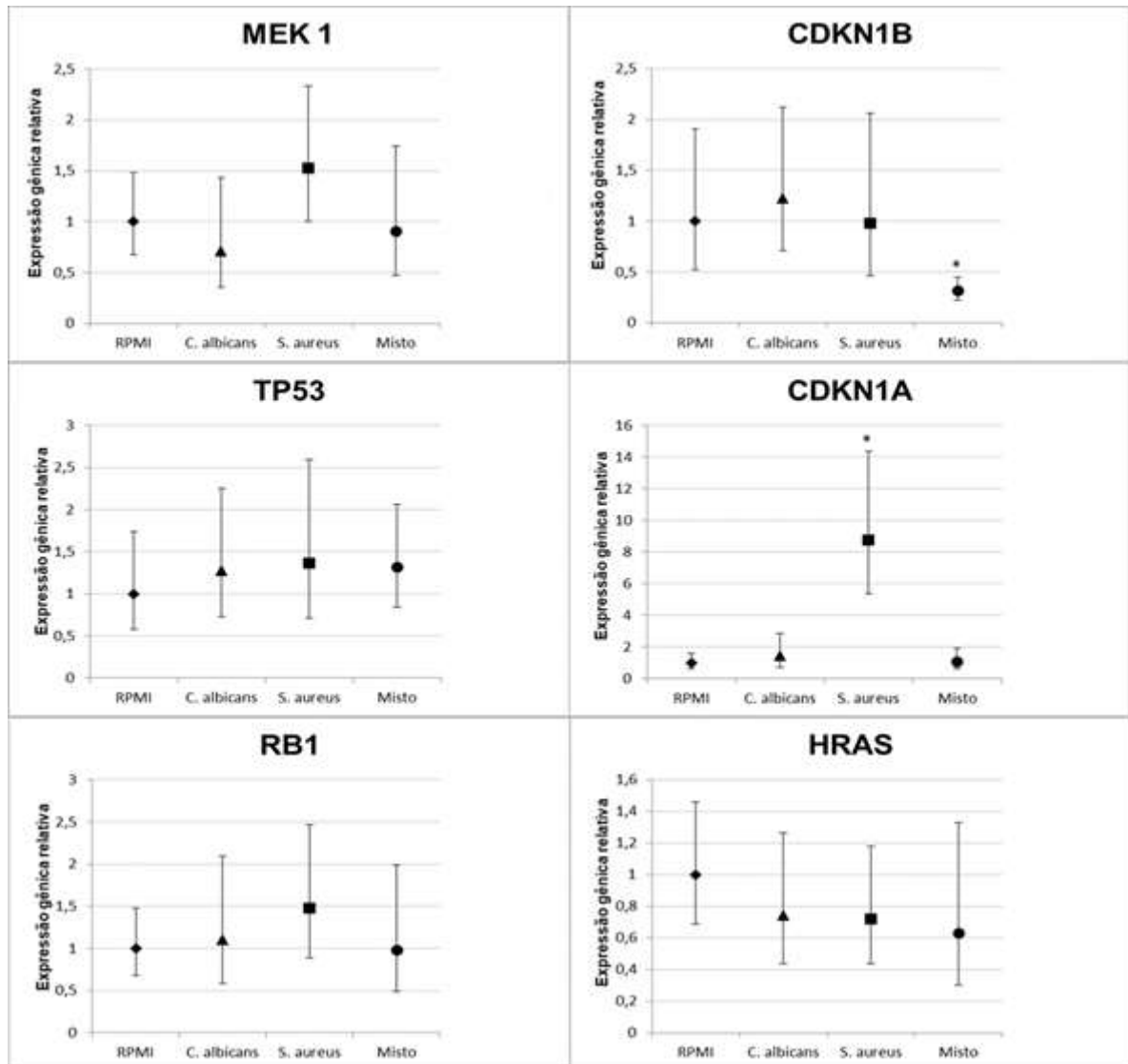
As curvas foram obtidas a partir da interpolação dos valores de Ct obtidos de cada reação (Eixo Y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA das amostras (Eixo X). A reta média foi traçada a partir dos valores médios de Ct de cada diluição de cDNA e a eficiência da reação (E) de qRT-PCR foi calculada pelo software do equipamento 7500 Real Time PCR System.

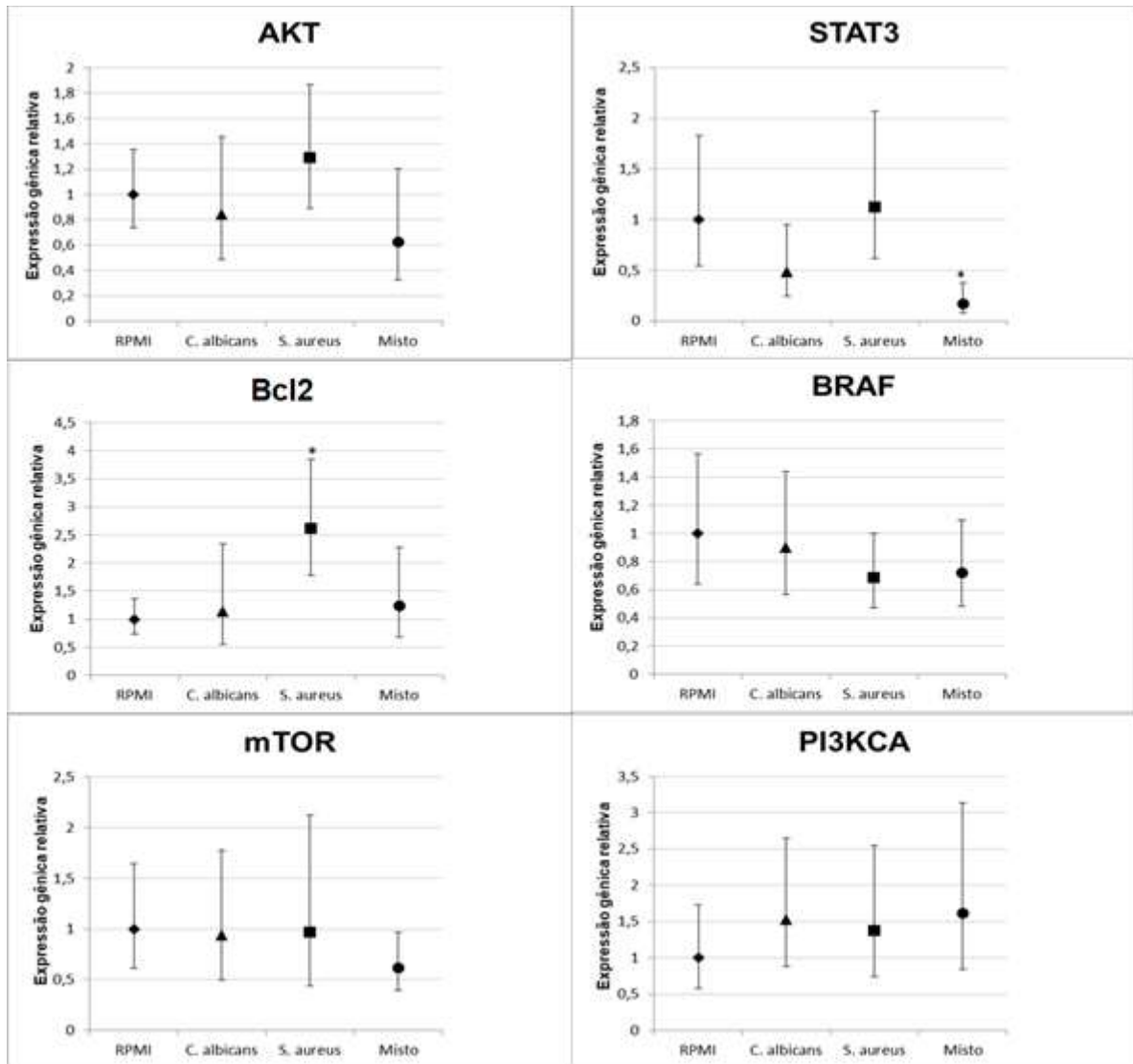
Fonte: Elaboração própria

5.6 Expressão de Proto-Oncogenes e Genes Supressores Tumorais

O efeito dos estímulos com FS na expressão gênica, relativa para a linhagem celular NOK-si, mostrou que FS derivados de biofilmes de *S. aureus* de 16 h e 36 h têm a capacidade de induzir superexpressão do gene *CDKN1A*. Os FS derivados do biofilme de *S. aureus* de 16 h promoveram uma superexpressão do gene *Bcl2* (Figuras 18, 21). O estímulo com o FS derivado do biofilme de *C. albicans* de 36 h promoveu uma diminuição significativa dos genes supressores tumorais *TP53*, *CDKN1A* e *CDKN1B*, e dos oncogenes *HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *AKT*, *mTOR* e *STAT3* (Figura 21). FS derivados de biofilmes mistos de 16 h regularam negativamente os genes *CDKN1B* e *STAT3*, tendo essa regulação negativa também sido observada para esta linhagem celular nos genes *AKT*, *mTOR* e *HRAS*, após o estímulo com FS derivados de biofilmes de *S. aureus* de 36 h (Figura 21). Nas células tumorais, FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus*, e misto de 16 h promoveram a superexpressão do gene antiapoptótico *Bcl2*, na linhagem celular SCC 25 (Figura 19). O oncogene *PI3KCA* foi superexpresso nesta mesma linhagem, após estímulos com FS derivados de biofilmes de *C. albicans* e misto de 16 h. Também foi observada uma superexpressão do gene *HRAS* pelo estímulo com FS derivados dos biofilmes de *S. aureus* e misto de 16 h (Figura 19). Estímulos com FS derivados dos biofilmes de *C. albicans* e misto de 36 h induziram, na linhagem celular SCC 25, uma regulação negativa do gene *CDKN1B* (Figura 22). A linhagem celular Detroit 562, após estímulos com FS derivados de biofilmes de 16 h de *C. albicans*, *S. aureus* e misto, mostrou uma superexpressão do gene *CDKN1A*; os estímulos com FS de biofilmes de 36 h de *C. albicans* e misto mostraram, também, superexpressão do gene *CDKN1A* para esta linhagem celular (Figuras 20, 23). O estímulo com o FS de *C. albicans* de 16 h induziu uma superexpressão nos oncogenes *HRAS*, *BRAF*, *PI3KCA*, *mTOR*, e no gene antiapoptótico *Bcl2*. Além disso, foi observado nesta linhagem celular que FS derivados de biofilmes mistos de 16 h induziram uma superexpressão no gene *Bcl2*, e regulação negativa do gene *MEK1* (Figura 20). Em Detroit 562, FS de derivados de biofilmes de *S. aureus* de 36 h estimularam uma regulação negativa dos genes *TP53*, *RB1* e *HRAS* (Figura 23).

Figura 18 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 16 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular NOK-si, após 4 h de estímulo.

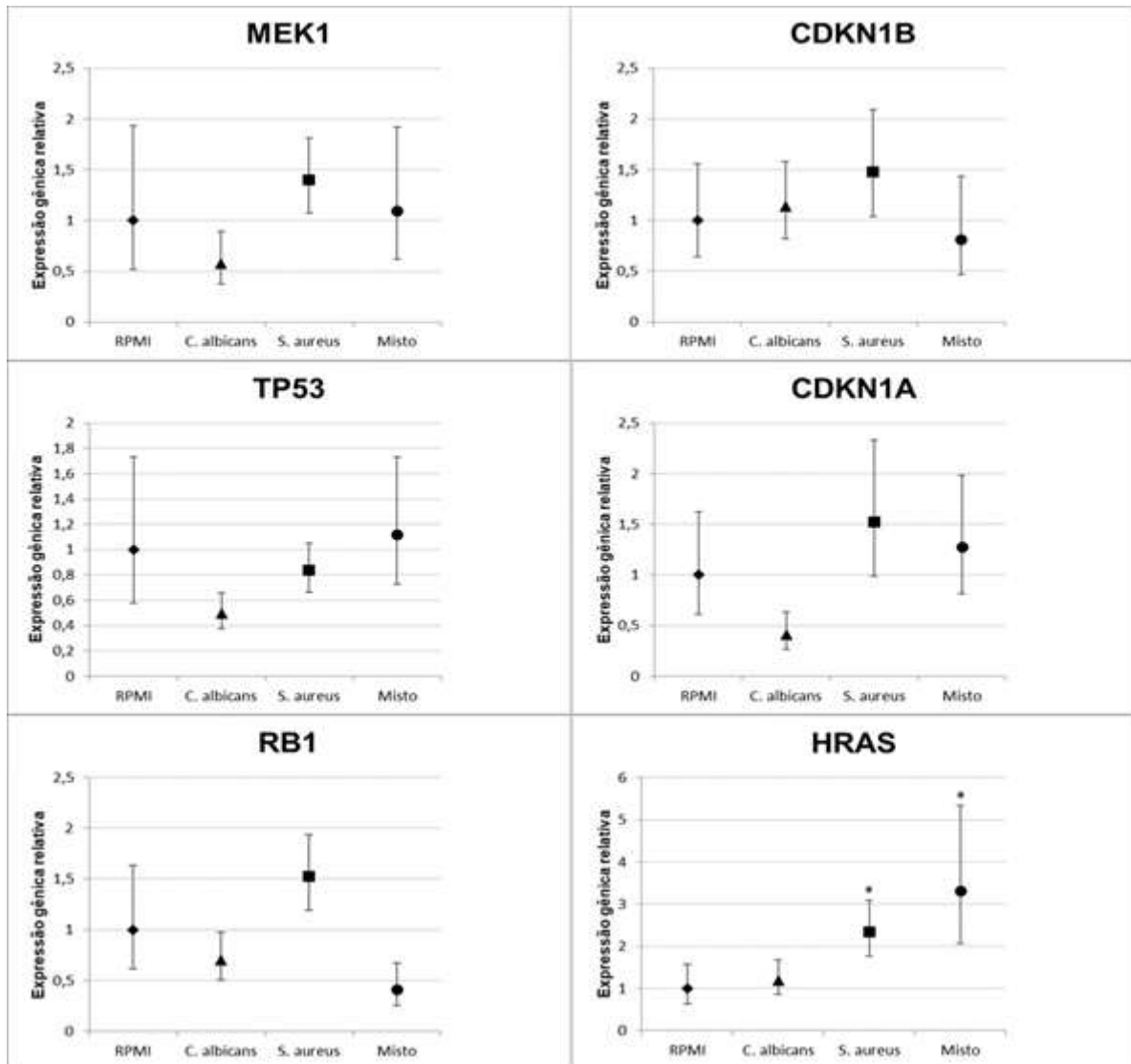


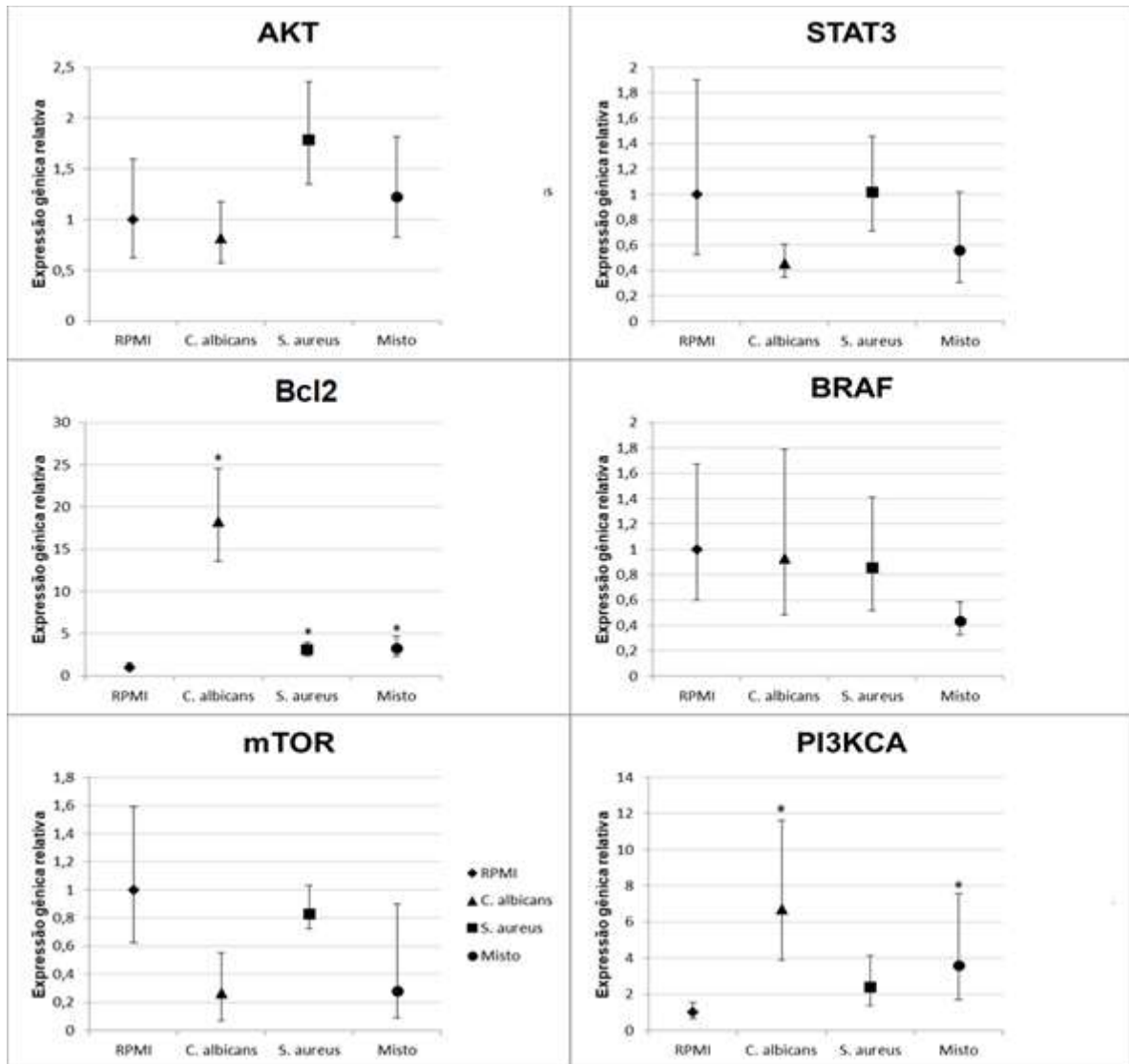


Valores de expressão gênica relativos comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 16 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular SCC 25, após 4 h de estímulo.

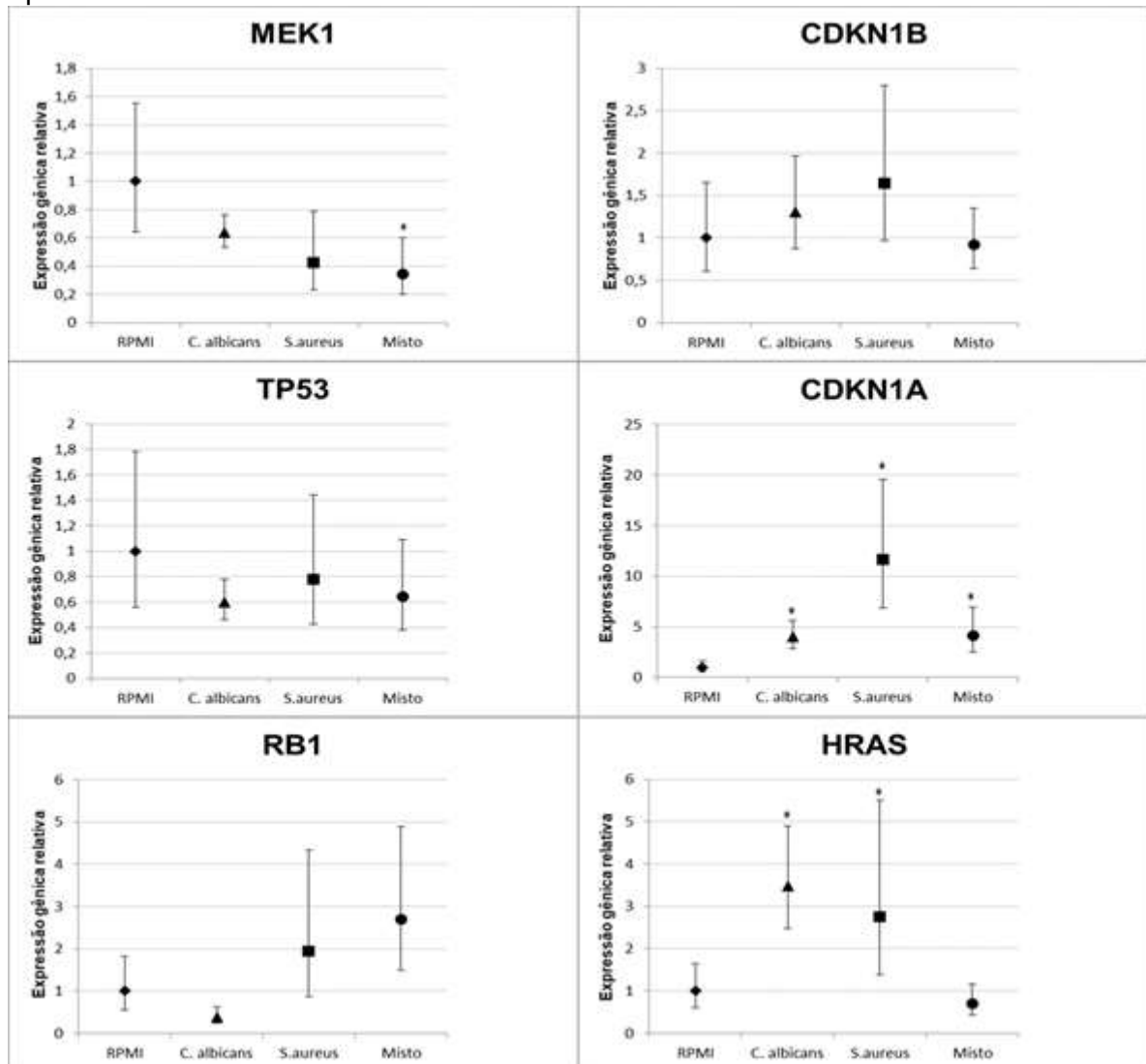


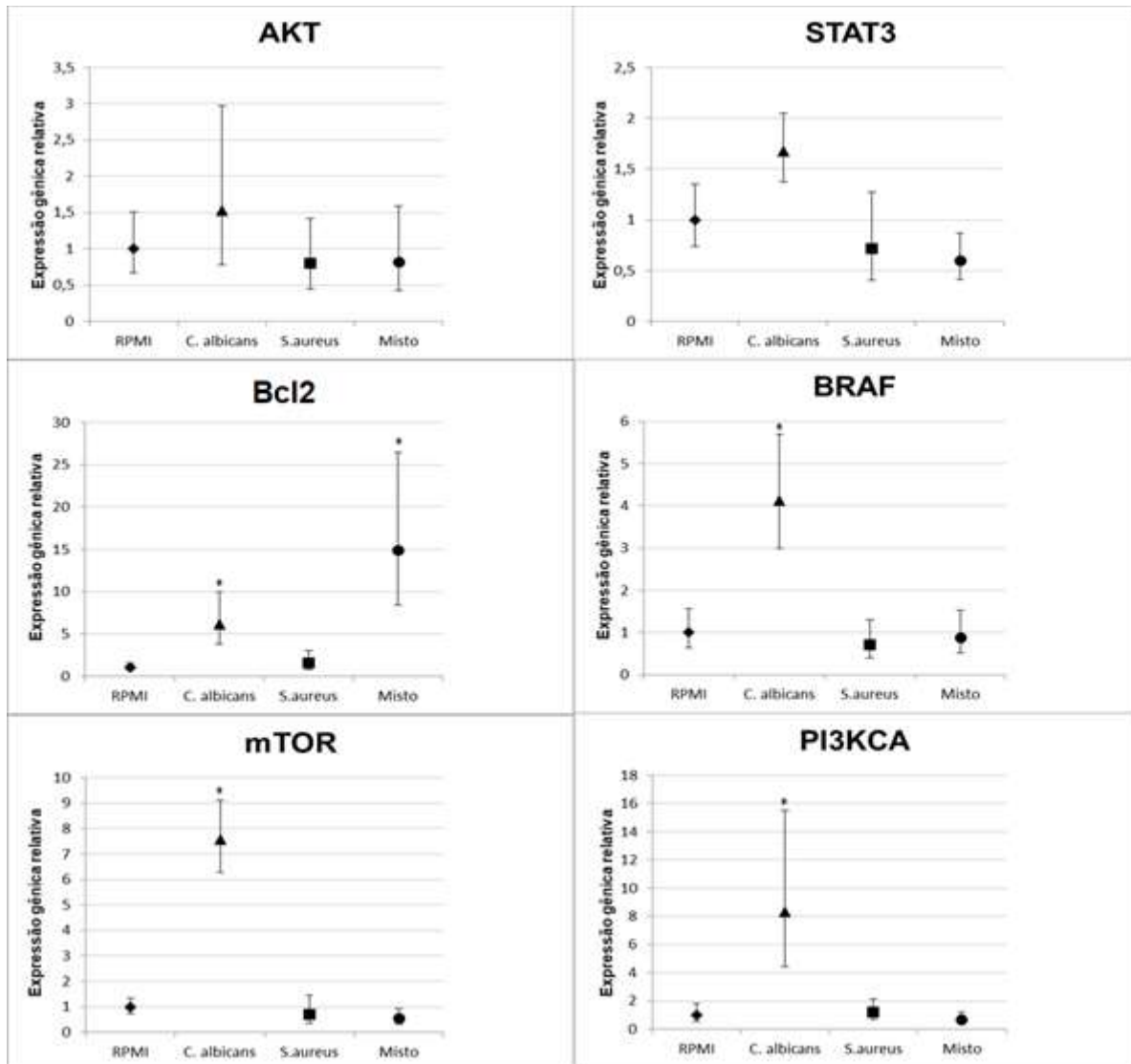


Valores de expressão gênica relativa comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 16 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular Detroit 562, após 4 h de estímulo.

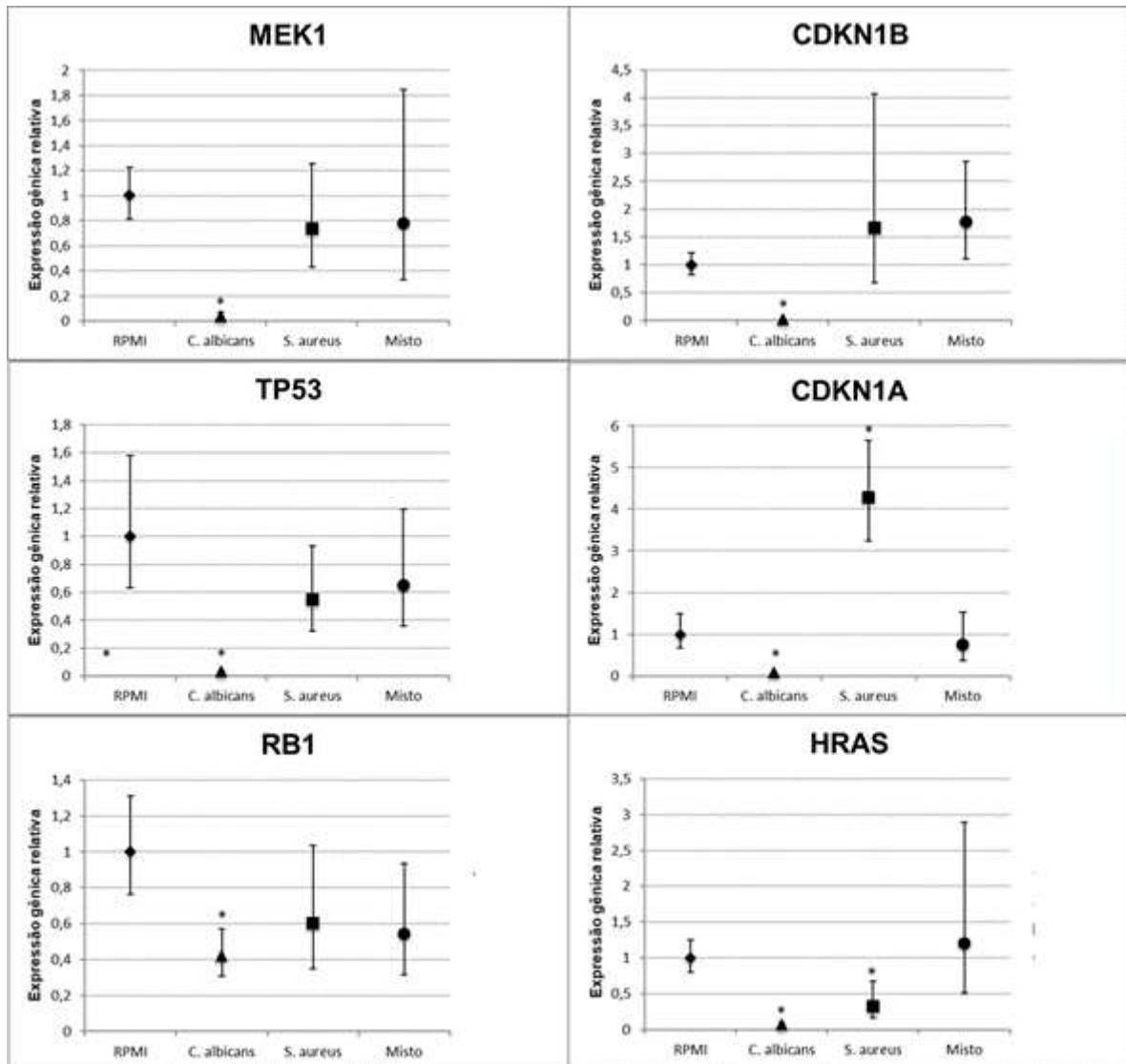


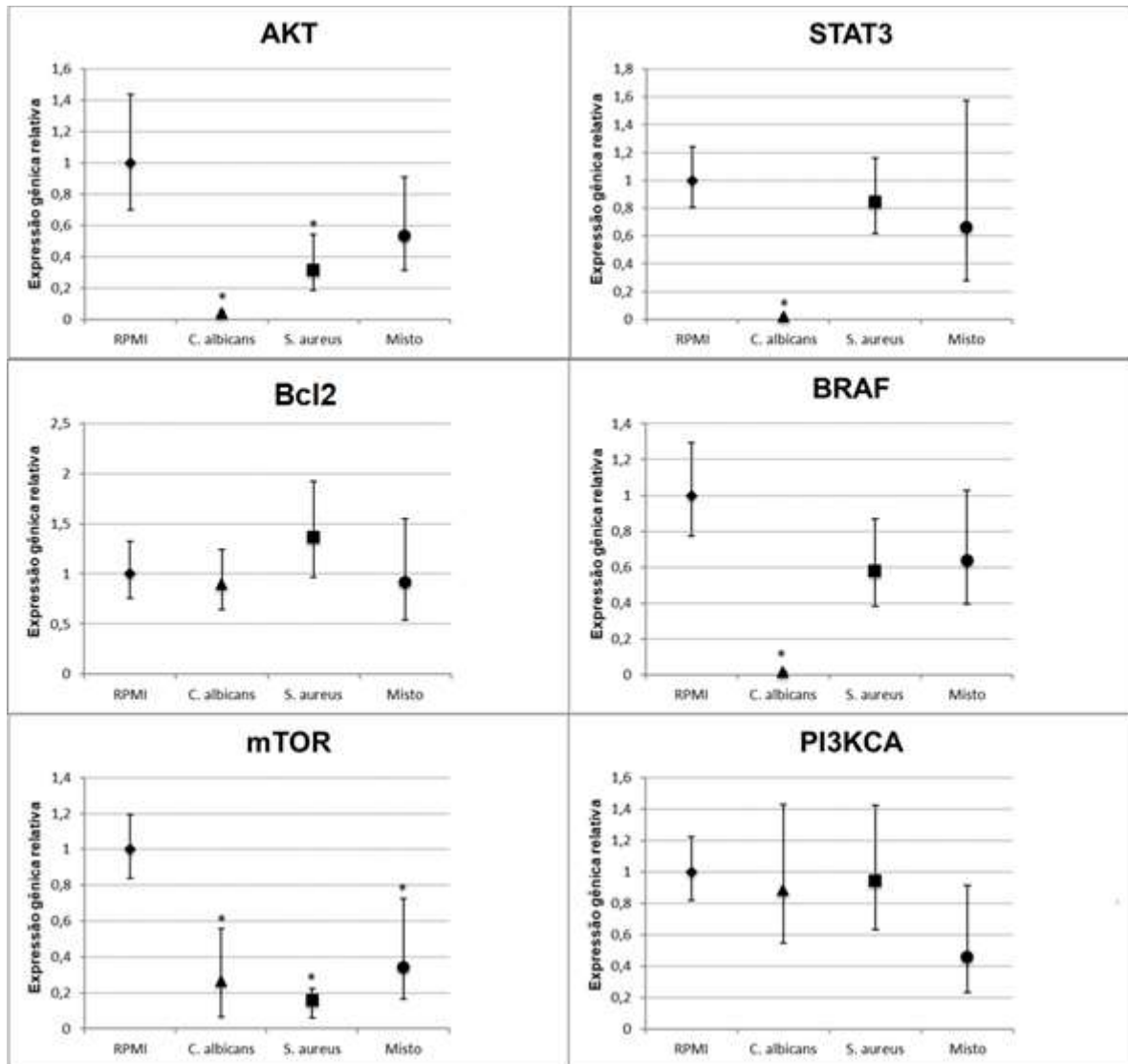


Valores de expressão gênica relativa comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 36 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular NOK-si, após 4 h de estímulo.

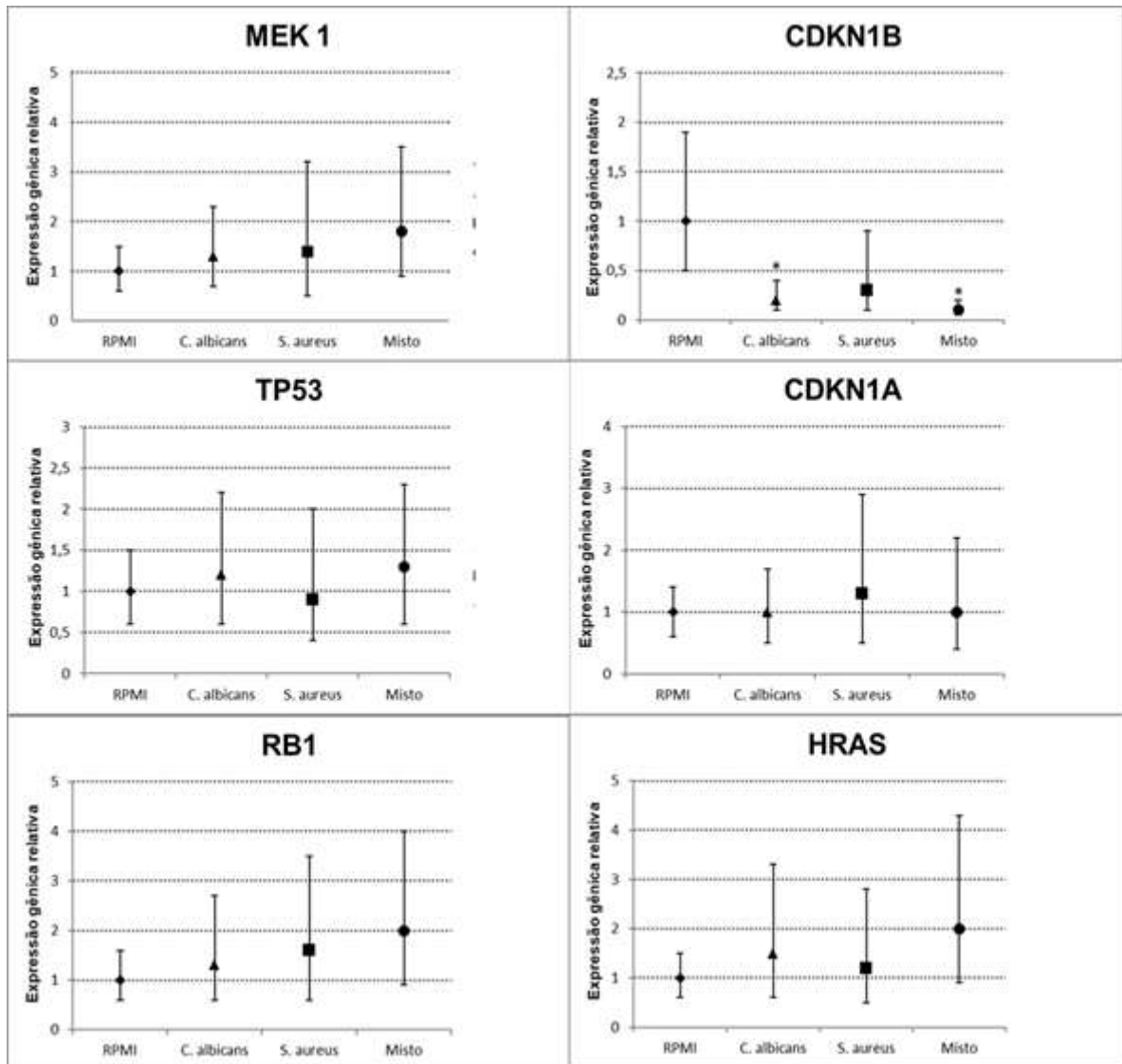


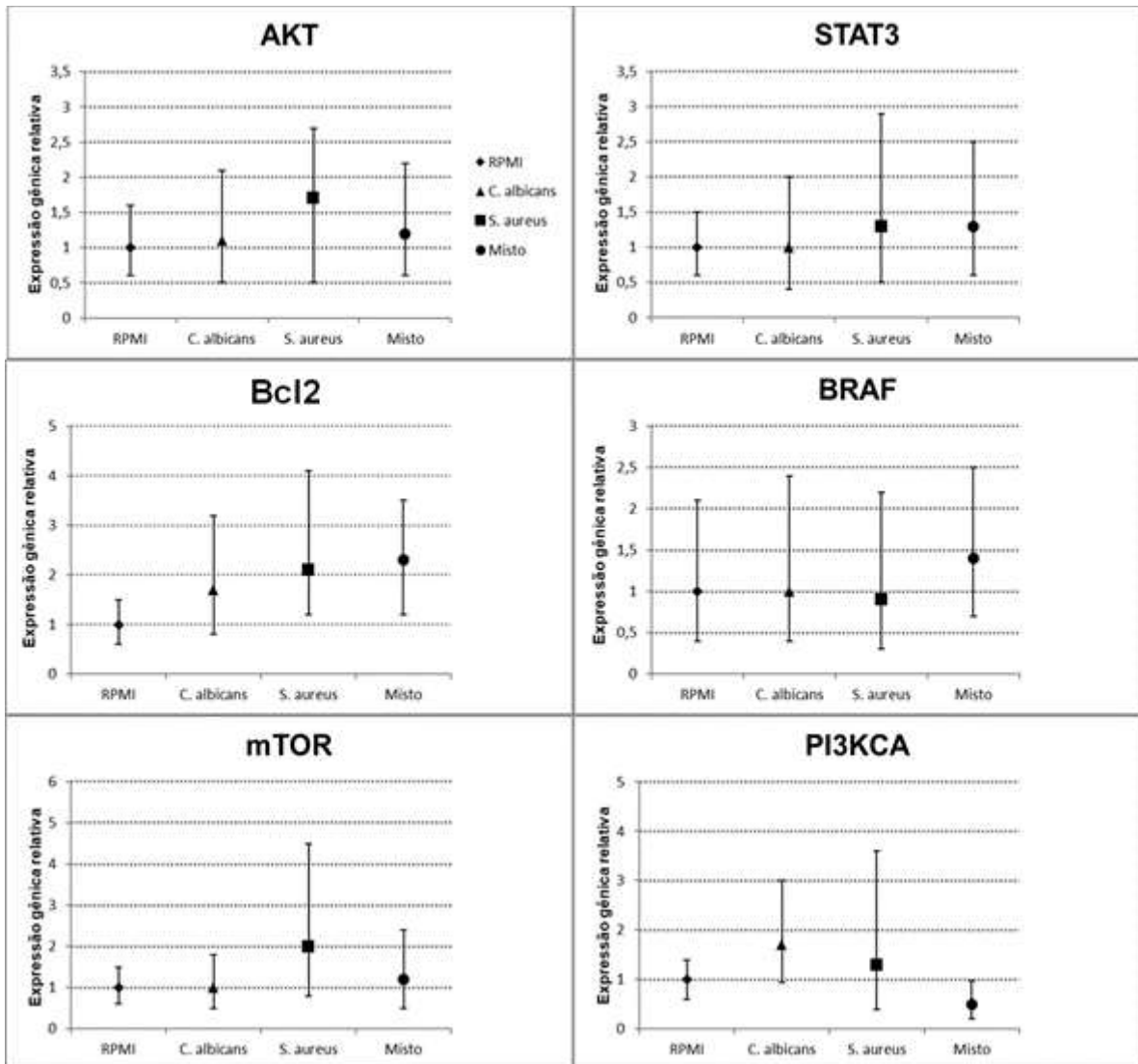


Valores de expressão gênica relativa comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 36 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular SCC 25, após 4 h de estímulo.

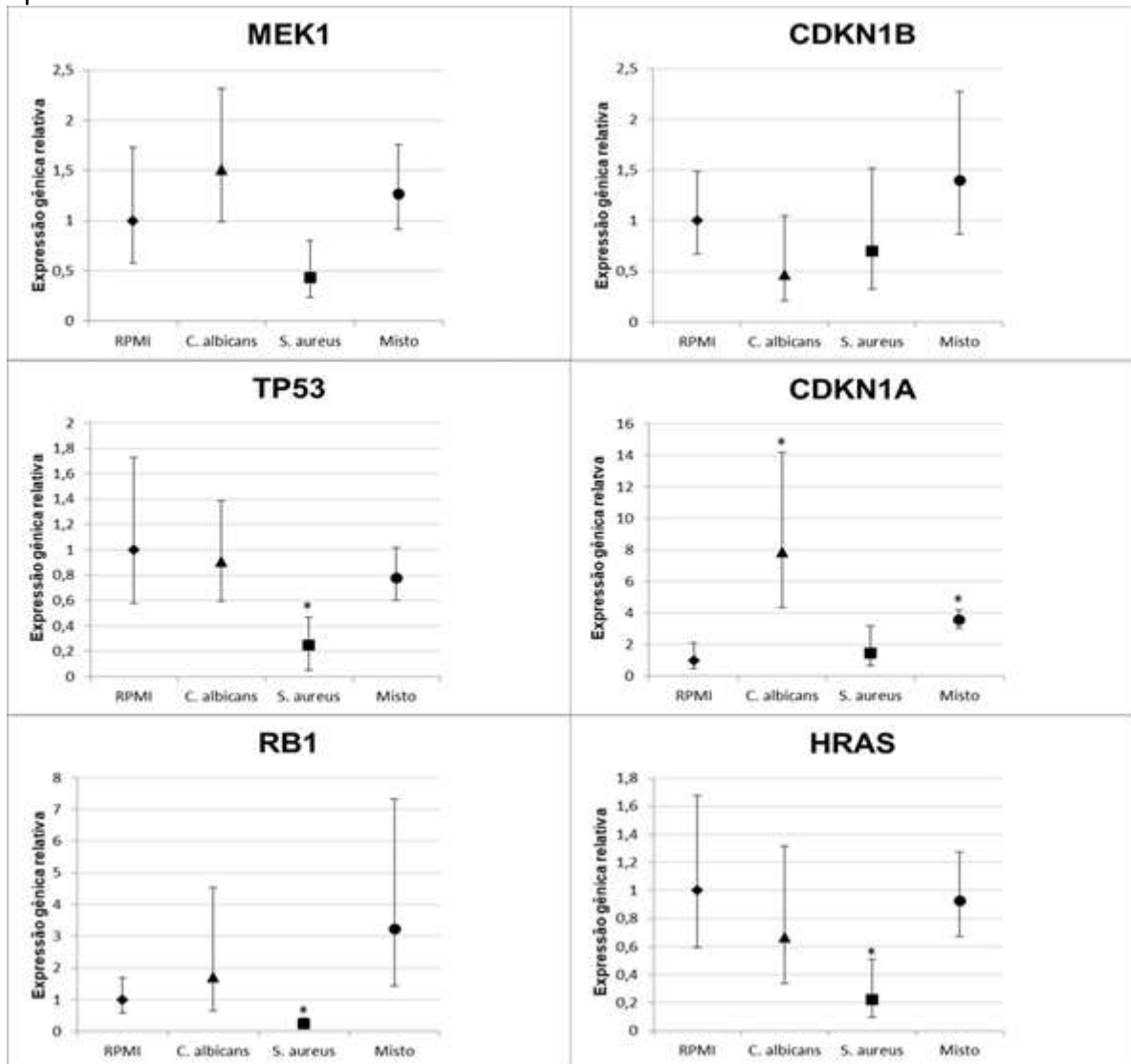


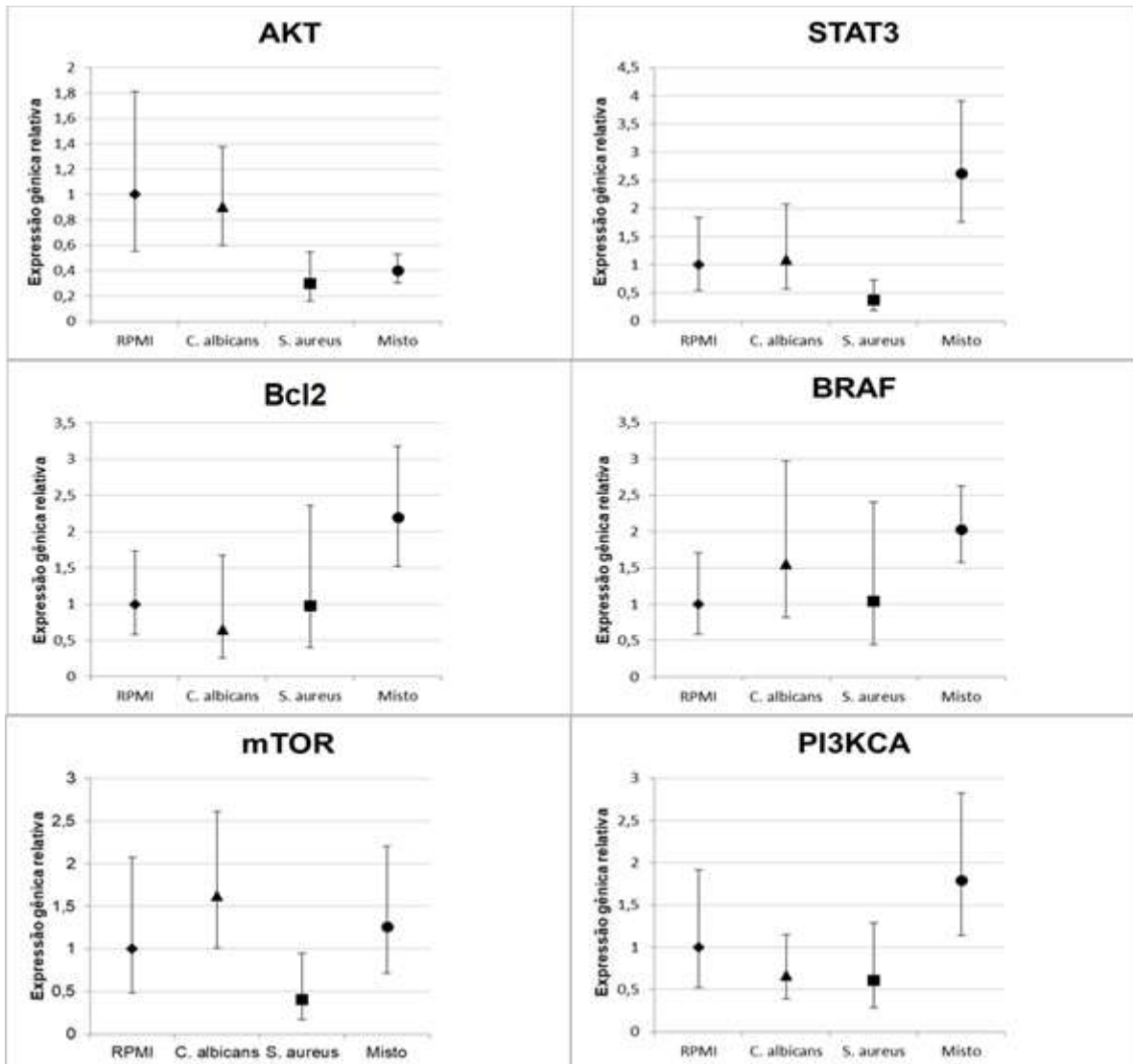


Valores de expressão gênica relativa comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 – Efeito dos FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 36 h na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais da linhagem celular Detroit 562, após 4 h de estímulo.





Valores de expressão gênica relativa comparados com células estimuladas com meio RPMI-1640 suplementado (controle), calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A barra representa o intervalo de confiança de 95% de um $n=6$ (IC 95; $n=6$). * representa diferença estatística significativa em relação ao controle.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A microbiota oral desempenha um papel importante, tanto no microbioma humano como na saúde⁷. A relação disbiótica entre os micro-organismos e o hospedeiro resulta no desenvolvimento de doenças inflamatórias e câncer⁵⁰. Os patógenos orais têm a capacidade de produzir metabólitos e toxinas capazes de danificar o DNA do hospedeiro²⁰. A circulação desses metabólitos tóxicos, pode contribuir para o desenvolvimento ou progressão tumoral em locais distantes aos quais um determinado patógeno reside²⁰. Avanços recentes no estudo de fatores de virulência da microbiota oral sugerem que esses metabólitos poderiam estimular a carcinogênese de cabeça e pescoço por diferentes mecanismos relacionados à inflamação crônica, inibição da apoptose celular, ativação da proliferação e/ou da produção de substâncias carcinogênicas^{5,8}. Este estudo avaliou a modulação na expressão gênica de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, o perfil de viabilidade e ciclo celular em células epiteliais orais, normais (NOK-si) e neoplásicas (SCC 25 e Detroit 562), após estímulos com FS (metabólitos) de biofilmes jovens (16 h) e maduros (36 h) simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus*.

Os FS derivados de biofilmes maduros (36 h) simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus* demonstraram a capacidade de promover resposta inflamatória e morte celular em células epiteliais orais normais NOK-si²². Com base nestes achados, consideramos avaliar o papel dos FS nas células epiteliais orais, normais e neoplásicas. A linhagem celular oral com fenótipo normal NOK-si selecionada para este estudo mostrou uma superexpressão no gene *Bcl2* após a exposição aos FS derivados de biofilmes de *S. aureus* de 16 h. *Bcl2* é um gene de atividade antiapoptótica, cuja função está relacionada com a proteção celular contra estímulos citotóxicos⁸¹. O gene *Bcl2* é expresso nas camadas basais do epitélio normal; a superexpressão está relacionada com alterações na apoptose e a subsequente progressão do tumor⁸². Essa superexpressão do gene *Bcl2* induzida por FS derivados de biofilmes de 16 h de *S. aureus*, concomitante com a viabilidade e a morfologia celular inalteradas (Figura 7C), pode representar uma resposta antiapoptótica em células normais NOK-si. Mudanças na expressão do gene *TP53* e seu efetor *CDKN1A* estão comumente envolvidas na carcinogênese oral⁸³. Estímulos derivados de FS de biofilmes de *S. aureus* de 16 h e 36 h (Figuras 18, 21) tiveram a capacidade de induzir, na linhagem celular NOK-si, a superexpressão de *CDKN1A* e uma expressão

inalterada do gene *TP53*, sugerindo que a ativação do gene *CDKN1A* por FS derivados de biofilmes de *S. aureus* ocorreu independentemente de alterações na expressão do gene *TP53*⁸³. *CDKN1A* é um gene responsável por regular a progressão na fase G1 do ciclo celular e codifica a proteína p21, relacionada com a resposta celular ao estresse. A superexpressão dos genes *CDKN1A* e *Bcl2*, acompanhada da manutenção na viabilidade celular (Figuras 4A,18,21), conservação da morfologia celular e um aumento significativo da população na fase G2/M no perfil do ciclo celular (Figuras 10A, 10B), aponta para seu papel importante para a sobrevivência celular da linhagem com fenótipo normal NOK-si, após ter sido submetida às condições de estresse.

Os FS derivados de biofilmes de 36 h de *C. albicans* promoveram em NOK-si uma diminuição significativa dos oncogenes *HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *AKT*, *mTOR*, e *STAT3*, e dos genes supressores tumorais *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN1B* (Figura 21), além da redução significativa na viabilidade celular (Figura 4A) e aumento da porcentagem de células em fase sub G0 (Figura 10B). Esses achados sugerem que metabólitos secretados por *C. albicans* são capazes de induzir um efeito antiproliferativo em queratinócitos orais normais. Um estudo anterior demonstrou a capacidade dos FS de *C. albicans* induzirem morte celular em NOK-si²¹.

O gene *CDKN1B* codifica a proteína p27, uma potente inibidora de quinases dependentes de ciclina⁸⁵. Esse gene desempenha um papel significativo na regulação negativa do ciclo celular, principalmente durante as fases G0 e G1, sendo necessário para a transição celular do estado de quiescência ao estado proliferativo⁸⁵. Os genes *STAT3* e *mTOR* são reconhecidos como reguladores de uma variedade de funções celulares, incluindo sobrevivência celular, metabolismo, crescimento e proliferação^{60,84}. Os estímulos com FS derivados de biofilmes mistos de 16 h demonstraram a capacidade de regular negativamente os genes *CDKN1B*, *STAT3*. Estímulos derivados de biofilmes mistos de 36 h são capazes de regular negativamente o gene *mTOR* (Figuras 18, 21), diminuindo a viabilidade celular após 4 h de estímulo, alterando a permeabilidade na membrana (Figura 7D, 7H) e culminando em morte celular após 24 h de exposição (Figura 4A) em células NOK-si. Esses achados se correlacionam com a redução no número de células na fase G1 e um aumento da população sub G0, principalmente para estímulos com os FS derivados dos biofilmes de 36 h (Figura 11B). Desta maneira, estímulos com FS derivados de biofilmes mistos de 16 h e 36 h poderiam promover dano celular em queratinócitos orais normais,

levando à parada do ciclo celular e morte celular, principalmente na presença de *C. albicans*, uma vez que FS derivados de biofilmes de *S. aureus* não promoveram diminuição na viabilidade celular, mesmo após 24 h de estímulos (Figura 4A).

Após estímulos com FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 16 h, a linhagem celular NOK-si não apresentou alterações na expressão dos oncogenes *PI3KCA*, *AKT*, *mTOR*, *HRAS*, *BRAF*, *MEK1*, nem nos genes supressores tumorais *TP53* e *RB1* (Figura 18). O estímulo com os FS diluídos, não promoveu nenhuma mudança significativa na viabilidade celular para esta linhagem.

A expressão do gene *Bcl2* em relação com as características clínico-patológicas do carcinoma oral de células escamosas, mostrou que existe uma correlação positiva entre a superexpressão deste gene nas células tumorais e o grau de progressão tumoral, índice mitótico, mitoses atípicas, bem como um padrão micro focal da margem invasiva do tumor, promovendo características histopatológicas desfavoráveis⁸⁶. O oncogene *PI3KCA*, codifica a subunidade alfa catalítica (p110 α) da classe IA PI3K e está relacionado com a regulação da sobrevivência, crescimento e metabolismo celular⁸⁷. Este gene tem sido estudado em cânceres humanos, incluindo o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁸⁷. Estudos determinaram que a superexpressão de *PI3KCA* em células neoplásicas promoveu o crescimento celular, a evasão da apoptose e a invasão, contribuindo para a formação e progressão tumoral⁸⁸. A linhagem celular SCC 25, após ser estimulada com FS derivados de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h manteve a viabilidade celular, mesmo após estímulos de 24 h (Figura 5A), assim como a conservação da morfologia celular, além de promover a superexpressão dos genes *Bcl2*, *PI3KCA* e *HRAS* (Figura 19), demonstrando que FS de biofilmes 16 h, principalmente na presença de *C. albicans*, têm a capacidade de induzir a sobrevivência celular de células neoplásicas orais em ambientes hostis.

A regulação negativa do gene *CDKN1B* tem sido correlacionada com um prognóstico ruim de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, assim como uma relação direta com fenótipos mais agressivos⁸⁵. Os FS derivados de biofilmes de *C. albicans* e misto de 36 h promoveram uma regulação negativa no gene *CDKN1B* (Figura 22) e uma redução no número de células na fase G1 (Figura 11B). Os estímulos com FS derivados de biofilmes de *S. aureus* de 16 h promoveram um aumento significativo no perfil da viabilidade celular com 4 h de estímulo. Os FS de 36 h não promoveram alterações significativas na viabilidade celular mesmo após

estímulos de 24 h (Figura 5A). Tanto os estímulos causados por biofilmes jovens e maduros, promoveram poucas alterações na morfologia celular e mantiveram uma distribuição normal do ciclo celular na linhagem SCC 25 (Figura 12A, 12B). A linhagem celular SCC 25, após estímulos com os FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto, de 16 h e 36 h, não apresentou alterações na expressão dos oncogenes *AKT*, *mTOR*, *BRAF*, *MEK1* e *STAT3* nem nos genes supressores tumorais *CDKN1A*, *TP53* e *RB1* (Figuras 19, 22). A expressão do gene *CDKN1B* não foi alterada pelo estímulo com os FS derivados de biofilmes de 16 h (Figura 19) e os genes *PI3KCA*, *Bcl2* e *BRAF* foram normalmente regulados após estímulos com FS de biofilmes de 36 h (Figura 22). Os biofilmes diluídos não apresentaram alterações na viabilidade celular para esta linhagem.

FS derivados de biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h mostraram ter a capacidade de promover a superexpressão dos genes *HRAS* e *BRAF* na linhagem celular Detroit 562 (Figura 20). Estas células mostraram sobrevivência após estímulos prolongados (24 h) (Figura 6A) e apresentaram um aumento significativo da fase G2/M no perfil do ciclo celular (Figura 14A). Os genes *HRAS* e *BRAF* estão relacionados com a via das MAP quinases, responsáveis por promover a sobrevivência celular⁸⁹. Esses achados sugerem que metabólitos presentes nos FS de *C. albicans* e *S. aureus* de 16 h poderiam estimular a sobrevivência de células metastáticas em lesões tumorais avançadas. O mesmo estímulo com o FS de *C. albicans* promoveu a superexpressão do gene *PI3KCA* (Figura 20). Alguns estudos têm demonstrado que as alterações em *PI3KCA* estão correlacionadas com o estágio avançado do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, metástases em linfonodos e desenvolvimento de resistência ao tratamento quimioterápico^{41,88}. Desta maneira, metabólitos de biofilmes de 16 h de *C. albicans* poderiam promover mudanças no ambiente tumoral, levando a diferentes respostas nas células metastáticas. Os FS derivados de biofilmes simples de *C. albicans* e misto de 16 h também estimularam na linhagem celular Detroit 562 a superexpressão do gene *Bcl2*. Os tumores *Bcl2* positivos estão associados a um baixo grau de diferenciação, e estágios avançados do tumor; entretanto, a expressão de *Bcl2* nesses tumores prediz um melhor resultado no tratamento dos pacientes, não apenas em termos de controle local, mas também em sobrevida⁸⁹.

Os FS derivados de biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* são capazes de induzir uma superexpressão do gene *CDKN1A* (Figura 20), bem como estimular a

sobrevivência celular, mesmo após 24 h de estímulos (Figura 6A), com uma tendência significativa de aumento na fase G2/M (Figura 14A, 14B). *CDKN1A* tem sido descrito como um marcador significativo no prognóstico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. O aumento da expressão desse gene em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem sido correlacionado com metástases nodais, recorrência do tumor e diminuição da sobrevida⁹⁰. O possível mecanismo de ação no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço está relacionado ao seu efeito antiapoptótico e proliferação celular descontrolada; portanto, está relacionado ao desenvolvimento de resistência à terapia e diminuição da sobrevida do paciente⁹⁰. Assim, os FS derivados de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, principalmente os derivados de biofilmes de 36 h, poderiam atuar como mitógenos em células de fenótipo metastático como Detroit 562. Os FS derivados de biofilmes de *S. aureus* de 36 h promovem a manutenção da sobrevivência celular em células metastáticas, devido ao comportamento na viabilidade celular, conservação da morfologia celular e aumento da fase G2/M, mesmo após estímulo de 24 h (Figuras 6A, 14B), sendo que esse mesmo estímulo teve a capacidade de regular negativamente os genes *TP53* e *RB1* (Figura 23). Estímulos derivados de biofilmes de *C. albicans* de 16 e 36 h promoveram, na linhagem celular Detroit 562, diminuição significativa na viabilidade celular e marcação positiva com iodeto de propídeo, após 4 h de estímulo, mostrando distribuição normal do ciclo celular (Figura 15A, 15B). Os FS mistos de 16 e 36 h também estimularam uma diminuição significativa na viabilidade celular e marcação positiva com iodeto de propídeo. Esta linhagem após estímulos com FS derivados de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto de 16 e 36 h não apresentou alterações na expressão dos genes *CDKN1B*, *STAT3* e *AKT*. Os genes supressores tumorais *TP53* e *RB1* mostraram uma expressão normal após estímulos com FS derivados de biofilmes de 16 h, e os genes *PI3KCA*, *Bcl2*, *MEK1*, *MTOR* e *BRAF*, também foram normalmente regulados, após estímulos com FS de biofilmes de 36 h (Figuras 20, 23).

7 CONCLUSÃO

Fatores solúveis derivados de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* promoveram, em linhagens de células epiteliais orais normais e neoplásicas, alterações na expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais.

- Estímulos derivados de biofilmes jovens (16 h) e maduros (36 h) de *S. aureus*, induziram a superexpressão dos genes *Bcl2* e *CDKN1A* nas linhagens celulares orais, normal (NOK-si) e neoplásicas (SCC 25 e Detroit 562), avaliadas neste estudo. Estes FS também demonstraram a capacidade de aumentar a população de células na fase G2/M do ciclo celular, indicando a ocorrência de danos no DNA ou problemas na realização da mitose.
- Estímulos derivados de biofilmes simples de *C. albicans* e misto, de 16 h e 36 h, causaram uma diminuição significativa na viabilidade de células epiteliais orais normais, principalmente após 24 h de estímulo, assim como um aumento da porcentagem de células em fase sub G0 do ciclo celular, acompanhado de uma baixa regulação dos genes que estão relacionados com o crescimento celular e a sobrevivência.
- As linhagens celulares neoplásicas, estimuladas com FS provenientes de biofilmes simples de *C. albicans* e misto de 16 e 36 h, modularam a superexpressão dos oncogenes *HRAS*, *BRAF*, *PI3KCA*, além de mostrar um perfil de sobrevivência celular após estímulos prolongados.
- Alterações na permeabilidade da membrana celular foram observadas após estímulos com FS derivados dos biofilmes mistos de 16 h e 36 h, nas linhagens celulares NOK-si e Detroit 562. Os FS de *C. albicans* de 16 h e 36 h, também mostraram a capacidade de induzir estas alterações na linhagem celular Detroit 562.

REFERÊNCIAS*

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Alfouzan AF. Head and neck cancer pathology: old world versus new world disease. *Niger J Clin Pract*. 2019; 22(1): 1–8. doi: 10.4103/njcp.njcp_310_18.
3. Seoane J, Takkouche B, Varela-Centelles P, Tomás I, Seoane-Romero JM. Impact of delay in diagnosis on survival to head and neck carcinomas: a systematic review with meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2012; 37(2): 99-106. doi: 10.1111/j.1749-4486.2012.02464.x.
4. Derka S, Vairaktaris E, Papakosta V, Vassiliou S, Acil Y, Vylliotis A, et al. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncol*. 2006; 42(5): 540–50. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.008.
5. Peng Q, Deng Z, Pan H, Gu L, Liu O, Tang Z. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer (Review). *Oncol Lett*. 2018; 15(2): 1379–88. doi: 10.3892/ol.2017.7491.
6. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016; 221(10): 657–66. doi: 10.1038/sj.bdj.2016.865.
7. Perera M, Al-Hebshi NN, Speicher DJ, Perera I, Johnson NW. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: A review with special reference to periopathogenic bacteria. *J Oral Microbiol*. 2016; 8: 32762. doi: 10.3402/jom.v8.32762.
8. Karpiński TM. Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms*. 2019; 7(1): 20. doi: 10.3390/microorganisms7010020.
9. Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 9: 476. doi: 10.3389/fcimb.2019.00476.
10. Marwick C. Helicobacter: new name, new hypothesis involving type of gastric cancer. *JAMA*. 1990, 264(21): 2724–27. doi: 10.1001/jama.1990.03450210014004.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Scanu T, Spaapen RM, Bakker JM, Pratap CB, Wu L en, Hofland I, et al. Salmonella manipulation of host signaling pathways provokes cellular transformation associated with Gallbladder carcinoma. *Cell Host Microbe*. 2015; 17(6): 763–74. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.002.
12. Chaturvedi AK, Gaydos CA, Agreda P, Holden JP, Chatterjee N, Goedert JJ, et al. Chlamydia pneumoniae infection and risk for lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(6): 1498–505. doi: 10.1016/j.ejca.2010.11.003.
13. Ellmerich S, Schöller M, Durantou B, Gossé F, Galluser M, Klein JP, et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*. 2000; 21(4): 753–6. doi: 10.1093/carcin/21.4.753.
14. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature*. 2019; 574(7777): 264–7. doi: 10.1038/s41586-019-1608-2.
15. Gallimidi AB, Fischman S, Revach B, Bulvik R, Maliutina A, Rubinstein AM, et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget*. 2015; 6(26): 22613–23. doi: 10.18632/oncotarget.4209.
16. Sankari SL, Gayathri K, Balachander N, Malathi L. Candida in potentially malignant oral disorders. *J Pharm Bioallied Sci*, 2015, 7(Suppl 1): S162–64. doi: 10.4103/0975-7406.155886.
17. Ramirez-Garcia A, Rementeria A, Aguirre-Urizar JM, et al. Candida albicans and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(2):181-193. doi:10.3109/1040841X.2014.913004.
18. Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2010; 31(4): 126–31. doi: 10.4103/0971-5851.76195.
19. Arzmi MH, Cirillo N, Lenzo JC, Catmull D V., O'Brien-Simpson N, Reynolds EC, et al. Monospecies and polymicrobial biofilms differentially regulate the phenotype of genotype-specific oral cancer cells. *Carcinogenesis*. 2019; 40(1): 184–93. doi: 10.1093/carcin/bgy137.
20. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, Suzuki Y, Venter JC, Telenti A, Nelson KE. The human microbiome and cancer. *Cancer Prev Res*. 2017; 10(4): 226-34. doi: 10.1158/1940-6207.
21. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123206. doi: 10.1371/journal.pone.0123206.

22. de Carvalho Dias K, Barbugli PA, de Patto F, Lordello VB, de Aquino Penteadó L, Medeiros AI, et al. Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. *BMC Microbiol.* 2017; 17: 146. doi: 10.1186/s12866-017-1031–5.
23. Joshi P, Dutta S, Chaturvedi P, Nair S. Head and neck cancers in developing countries. *Rambam Maimonides Med J.* 2014; 5(2): e0009. doi: 10.5041/RMMJ.10143.
24. Bhurgri Y, Bhurgri A, Usman A, Pervez S, Kayani N, Bashir I, et al. Epidemiological review of head and neck cancers in Karachi. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2006; 7(2): 195–200. PMID: 16839210.
25. NIH Instituto Nacional del Cáncer. Diccionario de cáncer del NCI [Internet]. [cited 2020 Mar 10]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>.
26. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993; 328(3): 184–94. doi: 10.1056/NEJM199301213280306.
27. Wang M, Xiao C, Ni P, Yu JJ, Wang XW, Sun H. Correlation of Betel quid with oral cancer from 1998 to 2017: a study based on bibliometric analysis. *Chin Med J (Engl).* 2018; 131(16): 1975–82. doi: 10.4103/0366-6999.238140.
28. Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther.* 2016; 12(2): 458–63. doi: 10.4103/0973-1482.186696.
29. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5):342-50. doi: 10.1038/nrc798.
30. Chang JS, Lo HI, Wong TY, Huang CC, Lee WT, Tsai ST, et al. Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2013; 49(10): 1010–7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.07.004.
31. Chang CC, Lee WT, Hsiao JR, Ou CY, Huang CC, Tsai ST, et al. Oral hygiene and the overall survival of head and neck cancer patients. *Cancer Med.* 2019; 8(4): 1854–64. doi: 10.1002/cam4.2059.
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
33. Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2005; 15(2): 113–20. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.08.004.
34. Philip D, Noronha V, Joshi A, Patil V, Ramaswamy A, Chougule A, et al. Molecular biology of head and neck cancers. *J Head Neck Physicians Surg.* 2016; 4(1): 16-22. doi: 10.4103/2347-8128.182856.

35. Thariat J, Milas L, Ang KK. Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 69(4): 974–84. doi: 10.1016/j.ijrobp.2007.06.076.
36. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(17): 2666–72. doi: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
37. Sheikh Ali MAL, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008; 99(8): 1589–94. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00861.x.
38. Wan X, Li X, Yang J, Lv W, Wang Q, Chen Y, et al. Genetic association between PIK3CA gene and oral squamous cell carcinoma: a case control study conducted in Chongqing, China. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(10): 13360–6. PMID: 26722541.
39. Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J. Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007; 18(1): 253–9. PMID: 17549376.
40. Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(12 I): 4029–37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0249.
41. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Muzio L Lo, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer.* 2005; 104(11): 2430–6. doi: 10.1002/cncr.21476.
42. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, et al. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 2005; 65(21): 9953–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0921.
43. Chang YS, Hsu HT, Ko YC, Yeh KT, Chang SJ, Lin CY, Chang JG. Combined mutational analysis of RAS, BRAF, PIK3CA, and TP53 genes in Taiwanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014; 118(1): 110-6. doi: 10.1016/j.oooo.2014.03.016.
44. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, et al. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest.* 1998; 102(7): 1385–92. doi: 10.1172/JCI3785.

45. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, et al. Constitutive activation of stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(8): 4227–32. doi: 10.1073/pnas.97.8.4227.
46. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Staczek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(9): 1521–40. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1521.
47. Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol*. 2012; 12. doi: 10.1186/1471-2180-12-144.
48. Murray HW, Roberts RB. *Streptococcus bovis* bacteremia and underlying gastrointestinal disease. *Arch Intern Med*. 1978; 138:1097-9. doi: 10.1001/archinte.1978.03630320037013.
49. Lee WH, Chen HM, Yang SF, Liang C, Peng CY, Lin FM, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 16540. doi: 10.1038/s41598-017-16418-x.
50. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018; 99: 883-893. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146.
51. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of oral streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018; 6(5):10. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
52. Brauncajs M, Sakowska D, Krzemiński Z. Production of hydrogen peroxide by lactobacilli colonising the human oral cavity. *Med. Dośw. Mikrobiol*. 2001; 53:331–6.
53. Yilmaz Ö, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2004; 72(7): 3743–51. doi: 10.1128/iai.72.7.3743-3751.2004.
54. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014; 10(3): e1003933. doi: 10.1371/journal.ppat.1003933.
55. Hooper SJ, Crean SJ, Fardy MJ, Lewis MAO, Spratt DA, Wade WG, et al. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *J Med Microbiol*. 2007; 56(12): 1651–9. doi: 10.1099/jmm.0.46918-0.
56. Pavlova SI, Jin L, Gasparovich SR, Tao L. Multiple alcohol dehydrogenases but no functional acetaldehyde dehydrogenase causing excessive acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Microbiol (United Kingdom)*. 2013; 159(7): 1437–46. doi: 10.1099/mic.0.066258-0.

57. Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cell Microbiol.* 2014; 16(1): 131–45. doi: 10.1111/cmi.12211.
58. Ha NH, Woo BH, Kim DJ, Ha ES, Choi J II, Kim SJ, et al. Prolonged and repetitive exposure to *Porphyromonas gingivalis* increases aggressiveness of oral cancer cells by promoting acquisition of cancer stem cell properties. *Tumor Biol.* 2015; 36(12): 9947–60. doi: 10.1007/s13277-015-3764-9.
59. Yao L, Jermanus C, Barbeta B, Choi C, Verbeke P, Ojcius DM, et al. *Porphyromonas gingivalis* infection sequesters pro-apoptotic Bad through Akt in primary gingival epithelial cells. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(2): 89–101. doi: 10.1111/j.2041-1014.2010.00569.x.
60. Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Putnins EE, et al. *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73(2): 1171–9. doi: 10.1128/IAI.73.2.1171-1179.2005.
61. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25(4):208-10. doi: 10.1016/s1130-1406(08)70050-0.
62. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.* 2008;154(11):3266-80. doi: 10.1099/mic.0.2008/022293-0.
63. Villar CC, Chukwuedum Aniemeke J, Zhao XR, Huynh-Ba G. Induction of apoptosis in oral epithelial cells by *Candida albicans*. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(6):436-48. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.
64. Bakri MM, Hussaini HM, Holmes A, Cannon RD, Rich AM. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol.* 2010; 2: 5780. doi: 10.3402/jom.v2i0.5780.
65. Dwivedi PP, Mallya S, Dongari-Bagtzoglou A. A novel immunocompetent murine model for *Candida albicans*-promoted oral epithelial dysplasia. *Med Mycol.* 2009;47(2):157-67. doi: 10.1080/13693780802165797.
66. Liao M, Cheng L, Zhou XD, Ren B. [Research progress of *Candida albicans* on malignant transformation of oral mucosal diseases]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2020;38(4):431-7. doi: 10.7518/hxkq.2020.04.014.

67. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol.* 2001; 50(11):940-6. doi: 10.1099/0022-1317-50-11-940.
68. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. *Microbiol Res.* 2017; 205:19-24. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.006.
69. Ezepechuk YV, Leung DYM, Middleton MH, Bina P, Reiser R, Norris DA. Staphylococcal toxins and protein A differentially induce cytotoxicity and release of tumor necrosis factor- α from human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996; 107(4):603-9. doi: 10.1111/1523-1747.ep12583377.
70. Kirker KR, Secor PR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, Stewart PS. Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *Wound Repair Regen.* 2009; 17(5):690-9. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00523.
71. Secor PR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, McInnerney K, Stewart PS. *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol.* 2011; 11:143. doi:10.1186/1471-2180-11-143.
72. Krejsgaard T, Willerslev-Olsen A, Lindahl LM, Bonefeld CM, Koralov SB, Geisler C, et al. Staphylococcal enterotoxins stimulate lymphoma-associated immune dysregulation. *Blood.* 2014; 124(5):761-70. doi:10.1182/blood-2014-01-551184.
73. Michaud DS, Joshipura K, Giovannucci E, Fuchs CS. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(2): 171–5. doi: 10.1093/jnci/djk021.
74. Fan X, Alekseyenko A V., Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, et al. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut.* 2018; 67(1): 120–7. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312580.
75. Peters BA, Wu J, Pei Z, Yang L, Purdue MP, Freedman ND, et al. Oral microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers. *Cancer Res.* 2017; 77(23): 6777–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1296.
76. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903–8. doi: 10.1177/00220345010800031101.
77. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkin JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10503. doi: 10.1371/journal.pone.0010503.

78. Young L, Sung J, Masters JR. Detection of mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc.* 2010; 5(5): 929–34. doi: 10.1038/nprot.2010.43.
79. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2009; 10: 17. doi: 10.1186/1471-2199-10-17.
80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
81. Ramírez-García MÁ, Márquez-González H, Barranco-Lampón G, López-Aguilar JE. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Resid [Internet].* 2014 [cited 2020 Jun 30]; 9(3): 84–94. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2014/rr143b.pdf>.
82. Solomon M, Carnelio S, Gudattu V. Molecular analysis of oral squamous cell carcinoma: a tissue microarray study. *Indian J Cancer.* 2010; 47(2): 166–72. doi: 10.4103/0019-509X.63013.
83. Yook JI, J K. Expression of p21WAF1/CIP1 is unrelated to p53 tumour suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1998; 34(3): 198–203. doi: 10.1016/s1368-8375(97)00091-2.
84. Hashmi AA, Aijaz S, Irfan M, et al. Low p27^{kip1} expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with risk factors and adverse outcomes. *Appl Cancer Res.* 2019; 39(1):5. doi: 10.1186/s41241-019-0074-3.
85. Zhou C, Ma J, Su M, Shao D, Zhao J, Zhao T, Song Z, Meng Y, Jiao P. Down-regulation of STAT3 induces the apoptosis and G1 cell cycle arrest in esophageal carcinoma ECA109 cells. *Cancer Cell Int.* 2018; 4(18):53. doi: 10.1186/s12935-018-0549-4.
86. Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Reszeć J, Koda M, Baltaziak M, et al. Correlation between Bcl-2 protein expression and some clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Polish J Pathol.* 2003; 54(1): 49–52. PMID: 12817880.
87. García-Escudero R, Segrelles C, Dueñas M, et al. Overexpression of PIK3CA in head and neck squamous cell carcinoma is associated with poor outcome and activation of the YAP pathway. *Oral Oncol.* 2018; 79: 55-63. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.02.014.
88. Jung K, Kang H, Mehra R. Targeting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancers Head Neck.* 2018; 4(3): 3. doi: 10.1186/s41199-018-0030-z.

89. Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM. Bcl2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49(2): 435–41. doi: 10.1016/s0360-3016(00)01498-x.
90. Sadaf S, Loya A, Mushtaq S, Akhter N, Hussain R, Jamshed A. Correlation of P21 expression in head and neck squamous cell carcinoma with clinicopathologic and prognostic parameters. *J Cancer Allied Spec.* 2015; 1(2): 5. doi: 10.37029/jcas.v1i2.33.

**Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)**

Araraquara, 09 de dezembro de 2020.

María Isabel Amaya Arbeláez