



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

KAROLYNY MARTINS BALBINOT

**IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO
SOX-2, NANOG E OCT4 EM AMELOBLASTOMA**

BELÉM
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

KAROLYNY MARTINS BALBINOT

**IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO
SOX-2, NANOG E OCT4 EM AMELOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da UFPA como pré-
requisito para obtenção do Grau de Bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

BELÉM
2020

KAROLYNY MARTINS BALBINOT

**IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO
SOX-2, NANOG E OCT4 EM AMELOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da UFPA como pré-
requisito para obtenção do Grau de Bacharel em
Odontologia. Submetido à banca examinadora
constituída pelos professores:

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro
(Orientador) Faculdade de Odontologia - UFPA

Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior
Faculdade de Odontologia – UFPA

Profª. Drª. Maria Sueli da Silva Kataoka
Faculdade de Odontologia - UFPA

Julgado em: ____/____/____

Conceito: _____

BELÉM

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida, porque sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Irenilda** e **Lirio**, pelo apoio e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações, sempre se fazendo presentes independente da distância, e me incentivando a acreditar que eu seria capaz de conquistar tudo que sonhasse. Esta formação é a prova de que o esforço deles pela minha educação não foi em vão e valeu a pena.

Ao meu irmão, **Tonny**, e a minha amiga, **Sueli**, por terem compartilhado comigo todos esses anos morando longe da família em busca de uma formação.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Pinheiro**, que não apenas me orientou ao longo dos últimos 3 anos, como é também um dos meus maiores incentivadores e nunca mediu esforços para me oferecer todas as oportunidades possíveis, sempre disposto a me ajudar no que fosse preciso, minha eterna gratidão.

Aos professores, em especial **Prof. Dr. Sérgio Alves** e **Profª Drª Sueli Kataoka**, por terem me recebido de braços abertos no laboratório e por serem tão solícitos e incentivadores independente das dificuldades, são exemplos de profissionais para mim.

À minha dupla, **Yasmim**, que esteve ao meu lado durante esses cinco anos, enxugando as minhas lágrimas, sendo meu ombro amigo e tornando tudo mais leve, mesmo nos dias mais difíceis.

Às minhas amigas da faculdade, em especial a **Karina**, **Débora** e **Suelen**, por todos os trabalhos feitos juntos, materiais de clínica compartilhados e emprestados e principalmente pela amizade e parceria que sempre tivemos.

Aos meus amigos do laboratório, **Thaiana**, **Geovanni**, **Raíssa**, **Humberto** e **Gabriela** por todo os ensinamentos e por serem exemplos na pesquisa; **Vanessa**, **Taiane**, **Bianca**, **Athus** e **Douglas** por sempre se colocarem à disposição para me ajudar e tornarem a rotina mais agradável, somos mais que uma equipe de laboratório, somos uma família.

E por fim, porém não menos importantes, aos que participaram diretamente da construção desse TCC, como o **Felippe** e a **Giordanna** que me auxiliaram desde a idealização do projeto até o desenvolvimento do mesmo, e à **Rebeca** e **Luciane** que me ajudaram com a execução da imuno-histoquímica, ficando muitas vezes até tarde na faculdade, esse trabalho também é de vocês.

“Os sonhos não determinam o lugar
que você vai estar, mas produzem a força
necessária para o tirar do lugar em que está”

Augusto Cury

SUMÁRIO

CAPÍTULO ÚNICO	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA.....	13
3. RESULTADOS	15
4. DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO	23
6. CONFLITO DE INTERESSE	24
7. REFERÊNCIAS	24
ANEXO I: NORMAS PARA SUBMISSÃO NA EXPERIMENTAL CELL RESEARCH	30
ANEXO II: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	38

CAPÍTULO ÚNICO

Imunoexpressão dos marcadores de células-tronco SOX-2, NANOG E OCT4 em Ameloblastoma

Karolyny Martins Balbinot

Laboratório de Anatomia Patológica e Imuno-histoquímica. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Felippe José Almeida Loureiro

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Giordanna Pereira Chemelo

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Sérgio de Melo Alves Júnior

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Maria Sueli da Silva Kataoka

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

João de Jesus Viana Pinheiro

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Autor Correspondente:

João de Jesus Viana Pinheiro

Endereço:

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Fone: +55 91 32590335 / +55 91999850765

Email: radface@hotmail.com

RESUMO

O ameloblastoma é caracterizado por um padrão de crescimento lento, no entanto, localmente invasivo, com propensão à recorrência local. Na busca por mecanismos celulares que justifiquem tal progressão, a investigação do papel das células-tronco e sua relação com células cancerosas tem ganhado destaque na biologia tumoral, com pesquisas relacionando sua participação no crescimento, na progressão e recorrência dos tumores. Para analisar a presença das células-tronco a literatura aponta alguns biomarcadores importantes, como SOX-2, NANOG e OCT4, que são considerados reguladores críticos de autorrenovação e pluripotência embrionária capazes de mediar a iniciação, proliferação e a diferenciação tumoral. Assim, o objetivo deste estudo é analisar, utilizando imuno-histoquímica, a expressão das proteínas relacionadas com a atividade das células-tronco no ameloblastoma. As amostras de ameloblastoma apresentaram marcação estatisticamente significativa dos biomarcadores, quando comparadas com cisto dentígero e folículo dentário ($p < 0.001$), sendo observada uma correlação da área imunomarcada das proteínas OCT4 e SOX-2 nas células neoplásicas do ameloblastoma ($r = 0.4544$), assim como uma relação linear positiva entre a marcação de OCT4 e SOX-2 nas células neoplásicas do ameloblastoma ($r^2 = 0.2065$). A imunomarcação das proteínas estudadas no ameloblastoma, indicam o provável papel das células-tronco na gênese e progressão dessa neoplasia.

Palavras-chave: Ameloblastoma; Células-Tronco; Fatores de Transcrição SOX; Fatores de Transcrição de Octâmero; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Ameloblastoma is characterized by a slow growth pattern, however, locally invasive, with a propensity for local recurrence. In the search for cellular mechanisms that justify such progression, the investigation of the role of stem cells and their relationship with cancer cells has gained prominence in tumor biology, with studies relating their participation in the growth, progression and recurrence of tumors. To analyze the presence of stem cells, the literature points out some important biomarkers, such as SOX-2, NANOG and OCT4, which are considered to be critical regulators of embryonic self-renewal and pluripotency capable of mediating tumor initiation, proliferation and differentiation. Thus, the aim of this study is to analyze, using immunohistochemistry, the expression of proteins related to the activity of stem cells in ameloblastoma. Ameloblastoma samples showed statistically significant marking of biomarkers when compared with dentigerous cyst and dental follicle ($p < 0.001$), with a correlation of the immunostained area of OCT4 and SOX-2 proteins in ameloblastoma neoplastic cells ($r = 0.4544$), as well as a positive linear relationship between OCT4 and SOX-2 staining in ameloblastoma neoplastic cells ($r^2 = 0.2065$). The immunostaining of the proteins studied in ameloblastoma indicates the probable role of stem cells in the genesis and progression of this neoplasm.

Keywords: Ameloblastoma; Stem Cells; SOX Transcription Factors; Octamer Transcription Factors; Immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

O ameloblastoma (AME) é tumor odontogênico de origem epitelial (Effiom et al., 2017) e, embora classificado como um tumor benigno, é caracterizado por um padrão de crescimento localmente invasivo e com potencial para envolvimento de estruturas vitais quando ocorre na região posterior de maxila (Nastri et al., 1995; Leibovitch et al., 2006). O tratamento de escolha é a remoção cirúrgica, mas geralmente, quando técnicas conservadoras são aplicadas, pequenas ilhas de tumor não são totalmente removidas, que posteriormente resultam em recorrência em 60–80% dos casos em AME sólidos e multicísticos (Pogrel et al., 2009).

Nos últimos anos, estudos identificaram alterações moleculares nessa lesão, no entanto, esses achados ainda não esclareceram totalmente as razões de seu comportamento biológico localmente agressivo (Kumamoto et al., 2004; Henriques et al., 2009; Gomes et al., 2010). Na busca por mecanismos celulares que justifiquem tal progressão, a investigação do papel das células-tronco (CTs) e sua relação com células cancerosas (CCs) tem ganhado destaque na biologia tumoral, com pesquisas relacionando sua participação no crescimento, na angiogênese, na progressão e na recorrência tumoral (Reya et al., 2001; Silva et al., 2016).

Tanto as CTs como as CCs possuem a capacidade de se autorrenovarem, porém, nas CTs isso ocorre de maneira altamente regulada, enquanto as CCs se autorrenovam de maneira pouco controlada. Nesse sentido, os dois tipos celulares têm capacidade organogênica, mas as CTs geram tecidos normais e as CCs geram tecidos anormais (Pardal et al., 2003).

Um terceiro tipo celular são as células-tronco cancerígenas (CTCs) que segundo a American Association for Cancer Research (AACR), são células encontradas no interior do tumor que se autorrenovam e geram linhagens heterogêneas de CCs que irão compor esse tumor. Ou seja, no microambiente tumoral, existe uma pequena população de células com capacidade de se comportar como células-tronco (Sathi et al., 2011). Foi considerado que as CTCs podem ser responsáveis pela recidiva e metástase do câncer. Essas características também estão presentes nas CTs, sugerindo que moléculas comuns podem existir entre CTCs e CTs (Reya et al., 2001; Dick et al., 2008).

Para analisar a presença das CTs a literatura aponta alguns biomarcadores importantes, como SOX-2, NANOG e OCT4, que são considerados reguladores críticos de autorrenovação e pluripotência embrionária capazes de mediar a proliferação e a diferenciação tumoral (Chambers et al., 2003; Luo et al., 2013; Ren et al., 2016)

A proteína SOX-2 (gene 2 da HMG-box relacionado ao SRY) atua como um importante fator de transcrição na manutenção da capacidade de autorrenovação das células-tronco (Dalerba et al., 2007). Além disso, apresenta função pró-oncogênica em tumores, como câncer de mama, de esôfago e de pulmão (Bass et al., 2009; Wilbertz et al., 2011). Também foi relatada a alta expressão dessa proteína em carcinoma epidermoide oral (Ren et al., 2016), assim como, no AME, onde sugere-se que essa expressão está ligada à permanência do estado progenitor do epitélio do AME, e que o tumor pode ser originário de epitélios da lâmina dental que expressam SOX-2 (Juuri et al., 2013).

A NANOG (proteína homeodomínio) é outro fator de transcrição que desempenha um papel central na manutenção da pluripotência celular durante o desenvolvimento embrionário, além de estar associada à proliferação e renovação das células (Fan et al., 2017). A alta expressão de NANOG foi encontrada em pacientes com câncer renal, embora nenhuma associação tenha sido observada entre a sua expressão e as características clínico-patológicas (Yu et al., 2016). Em outros tipos de câncer, como de colorretal (Humphries et al., 2018), cervical (Gu et al., 2012) e nasofaríngeo, foi notada uma relação com o comportamento clínico (Luo et al., 2013). Analisada também no estroma de tumores odontogênicos, demonstrou expressão positiva em alguns casos de AME (Chacham et al., 2020).

A OCT4 (proteína 4 de ligação ao octâmero), conhecida por associar-se à SOX-2, também é um regulador essencial da pluripotência e da autorrenovação celular (Schulenburg et al., 2006). Ao interagir com outros fatores de transcrição, como SOX-2 e NANOG, é capaz de ativar a expressão gênica das CTs em camundongo (Pesce et al., 2001). Junto com NANOG, são consideradas reguladoras essenciais para o desenvolvimento inicial das CTs (Chambers et al., 2003). Alguns autores relatam que a expressão de OCT4 pode estar relacionada à proliferação celular e progressão tumoral, como estudado no adenocarcinoma de pulmão (Hu et al., 2020). Até o momento, apenas Monroy et al. (2018) verificaram a expressão de OCT4 nas células epiteliais do AME, relacionando-a com o desenvolvimento e diferenciação celular,

sendo um estudo inicial sobre a expressão dessa proteína em lesões de origem odontogênica.

OCT4 e SOX-2 são fundamentais para a manutenção e o desenvolvimento das CTs. Embora ambas tenham papéis independentes em diferentes tipos celulares, uma parte de suas funções nas CTs ocorre por meio da interação sinérgica entre as duas para conduzir a transcrição de genes alvos (Avilion et al., 2003), sendo NANOG um dos alvos dessa interação (Rodda et al, 2005 e Kuroda et al, 2005). Quando juntas, SOX-2, NANOG e OCT4, se ligam aos promotores de seus próprios genes, formando loops autorregulatórios interconectados. Acredita-se que essa rede de autorregulação pode fornecer vantagens para as CTs, como tempo de resposta reduzido a estímulos ambientais e maior estabilidade da expressão gênica, mantendo dessa forma o destino celular (Boyer et al., 2005). Características essas, importantes para a sobrevivência celular, estabilidade e progressão tumoral.

Foi relatado que as neoplasias odontogênicas, como o AME, se originam de CTs remanescentes da lâmina dentária (Harada et al., 2002). No entanto, a real contribuição das CTs para o mecanismo molecular envolvido na patogênese do AME ainda precisa de esclarecimento (Juuri et al., 2013; Silva et al., 2016). Pelo que nos consta, este é o primeiro trabalho a estudar essas três proteínas (SOX-2, NANOG e OCT4) conjuntamente no ameloblastoma. Nesse sentido, identificar quais tipos de células possuem as características de autorrenovação e pluripotência e os possíveis mecanismos celulares que justificam o comportamento biológico do AME, torna-se de suma importância para o desenvolvimento de melhores tratamentos e prognósticos.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental laboratorial, no qual foram utilizadas 23 amostras de AME, recuperadas dos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Estado Pará (CESUPA), somadas a 10 amostras de Cisto Dentígero (CD) e 10 amostras de Folículo dentário (FD) obtidas do Laboratório de Anatomia Patológica e Imuno-histoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os dados clínicos das amostras de AME foram adquiridos por meio dos prontuários com laudos presentes nos arquivos, coletados manualmente, e classificados histologicamente por

um patologista oral. Este estudo foi cadastrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - CEP / ICS/ UFPA (CAAE: 30647720.6.0000.0018).

Para a análise imuno-histoquímica as lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%), finalizando a hidratação em duas passagens em água destilada. Em seguida, foram imersas em H₂O₂ a 6% e metanol numa razão de 1:1 durante 30 min, para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (pH 6,0) em câmara de pressão Pascal (Dako Cytomation®, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 s, em uma temperatura de 124 °C e pressão de 13,5 psi. As ligações não específicas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) a 1% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MI, USA) em tampão fosfato-salino (PBS 1x) por 1 h. O protocolo de coloração foi otimizado para cada um dos anticorpos, por titulação, para selecionar a concentração ideal em que o tecido de controle positivo apresentasse a melhor coloração positiva e mínima coloração de fundo. Os tecidos de AME, CD e FD foram então incubados com os anticorpos Anti-SOX-2 (1:50 Sigma®), Anti-Nanog (1:150 Millipore, Burlington, MA, EUA), Anti-Oct4 (1:25 Millipore®) durante 1 h. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 30 min com o sistema de detecção Immunohistoprobe plus (Advance Biosystems, San Francisco, CA, EUA). A diaminobenzidina (DAB) – High Contrast (ScyTek, Logan, UT, EUA) foi utilizada como cromógeno durante 5 min. As lâminas foram então contracoradas com hematoxilina de Mayer (Sigma®) por 3 minutos e então montadas com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA) para permitir a visualização em microscópio de campo claro. Como controle positivo foram utilizadas amostras de carcinoma de células escamosas oral. Como controle negativo o anticorpo primário foi omitido e substituído por BSA e soro fetal bovino em tampão TRIS.

Cinco imagens de campo claro de cada amostra, foram adquiridas aleatoriamente em microscópio AxioScope (Carl Zeiss, Oberkochen, DEU) equipado com câmera CCD a cores AxiocCam HRC (Carl Zeiss®). As imagens foram obtidas com as mesmas ampliações (400x) e salvas em formato TIFF. As áreas coradas pela diaminobenzidina foram analisadas usando o “Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox” (Jie Shu, Guoping Qiu e Mohammad Ilyas, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>) do software ImageJ (software de domínio público, desenvolvido por Wayne Rasband (NIMH, NIH, Bethesda, MD,

EUA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A análise semiautomática das imagens foi então realizada por meio da detecção da coloração de DAB. O modelo para identificação de pixels marrons foi ajustado para o presente estudo. Após a detecção de cores da coloração por DAB, as imagens coloridas RGB foram convertidas em arquivos de 8 bits. Realizou-se a inversão de cores e a intensidade dos pixels, em escala cinza, foi obtida em porcentagem.

As médias de porcentagem de marcação em parênquima tumoral, dos cinco campos por amostras, foram analisadas no software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Os dados clínicos-histológicos foram então tabulados e analisados utilizando estatística descritiva. Para análise da expressão das três proteínas (SOX-2, NANOG e OCT4) comparando as amostras de ameloblastoma com as de cisto dentígero e de folículo dentário foram utilizados os testes estatísticos ANOVA (amostras com distribuição paramétrica) e Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn (amostras com distribuição não paramétrica). Para verificar a associação entre as proteínas estudadas, foi utilizado o teste de regressão linear. Para verificar correlação, foi utilizado o teste de correlação de Pearson (amostras com distribuição paramétrica). Adotou-se nível de significância $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS

Os dados clínico-histológicos dos pacientes com AME estão demonstrados na Tabela 1. Na amostra estudada a média de idade foi de 39 anos, com 61% dos indivíduos abaixo dessa média e o restante, 39%, acima. O gênero masculino mostrou-se mais prevalente, com 56% dos casos. E, a localização de maior acometimento foi a mandíbula, totalizando 91% dos casos. Em relação ao tipo histológico, foram divididos em 10 casos do tipo folicular, 08 do plexiforme, 03 acantomatoso e 02 de células granulares.

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com ameloblastoma

Caso	Gênero	Idade	Localização	Tipo histológico
1	Masculino	45	Maxila	Plexiforme
2	Feminino	31	Mandíbula	Folicular
3	Masculino	31	Mandíbula	Plexiforme
4	Feminino	27	Mandíbula	Plexiforme
5	Masculino	34	Mandíbula	Plexiforme
6	Feminino	32	Mandíbula	Folicular
7	Masculino	34	Mandíbula	Folicular
8	Feminino	55	Mandíbula	Plexiforme
9	Feminino	20	Mandíbula	Plexiforme
10	Masculino	32	Mandíbula	Plexiforme
11	Masculino	33	Mandíbula	Acantomatoso
12	Feminino	59	Mandíbula	Folicular
13	Feminino	47	Mandíbula	Acantomatoso
14	Feminino	14	Mandíbula	Folicular
15	Masculino	42	Mandíbula	Células Granulares
16	Masculino	43	Mandíbula	Células Granulares
17	Masculino	28	Mandíbula	Folicular
18	Masculino	27	Mandíbula	Acantomatoso
19	Feminino	62	Mandíbula	Folicular
20	Masculino	84	Maxila	Folicular
21	Masculino	49	Mandíbula	Folicular
22	Masculino	22	Mandíbula	Plexiforme
23	Feminino	38	Mandíbula	Folicular

As amostras de AME apresentaram maior expressão das proteínas SOX-2, NANOG e OCT4 quando comparadas com as de CD e de FD ($p < 0,001$). Não foi observada diferença estatística entre CD e FD ($p > 0,05$). (Figuras 1, 2 e 3).

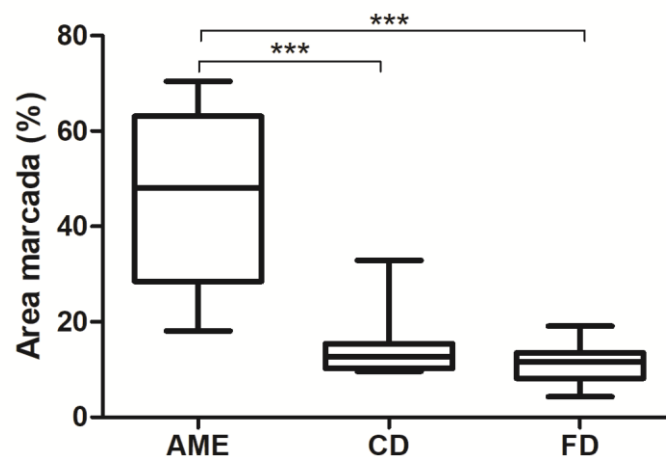


Figura 1. Comparação da imunomarcção de SOX-2 entre as amostras de ameloblastoma (AME), cisto dentígero (CD) e folículo dentário (FD). Houve maior imunomarcção de SOX-2 nas células parenquimatosas do ameloblastoma quando comparadas ao epitélio de revestimento do cisto dentígero e ao epitélio do folículo dentário. Teste estatístico: ANOVA ($***p < 0,001$).

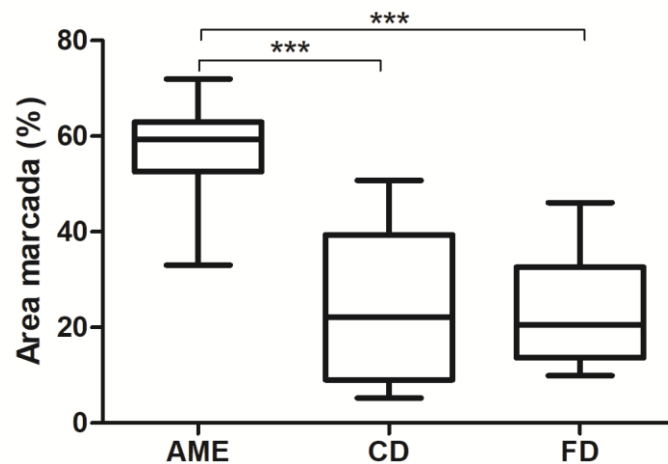


Figura 2. Comparação da imunomarcção de NANOG entre as amostras de ameloblastoma (AME), cisto dentígero (CD) e folículo dentário (FD). Houve maior imunomarcção de NANOG nas células parenquimatosas do ameloblastoma quando comparadas ao epitélio de revestimento do cisto dentígero e ao epitélio do folículo dentário. Teste estatístico: Kruskal-Wallis (** $p < 0,001$).

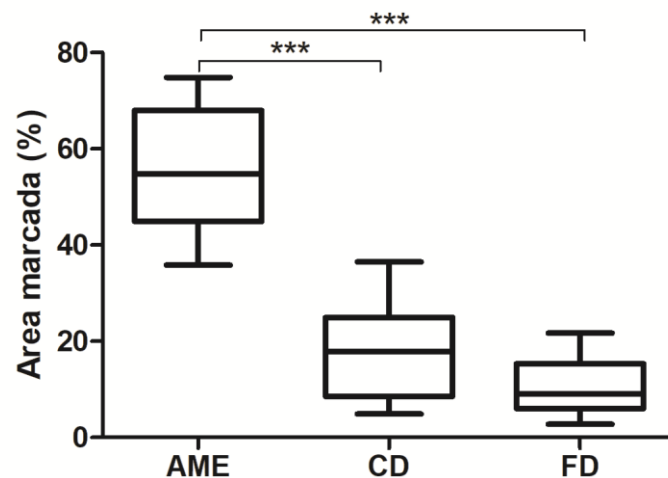


Figura 3. Comparação da imunomarcção de OCT4 entre as amostras de ameloblastoma (AME), cisto dentígero (CD) e folículo dentário (FD). Houve maior imunomarcção de OCT4 nas células parenquimatosas do ameloblastoma quando comparadas ao epitélio de revestimento do cisto dentígero e ao epitélio do folículo dentário. Teste estatístico: Kruskal-Wallis (** $p < 0,001$).

A marcação imuno-histoquímica dos fatores de transcrição, SOX-2, NANOG e OCT4 foram localizadas principalmente nos cordões e ilhas do epitélio tumoral odontogênico. A marcação de SOX-2 apresentou-se predominantemente no núcleo, enquanto NANOG e OCT4 foram verificadas no núcleo celular e difusamente no citoplasma das células do parênquima tumoral.

No epitélio cístico do CD foram observadas marcações nucleares sutis de SOX-2, OCT4 e NANOG, o mesmo ocorreu nas ilhas epiteliais do FD. NANOG foi marcada difusamente no tecido conjuntivo do FD (Figura 4).

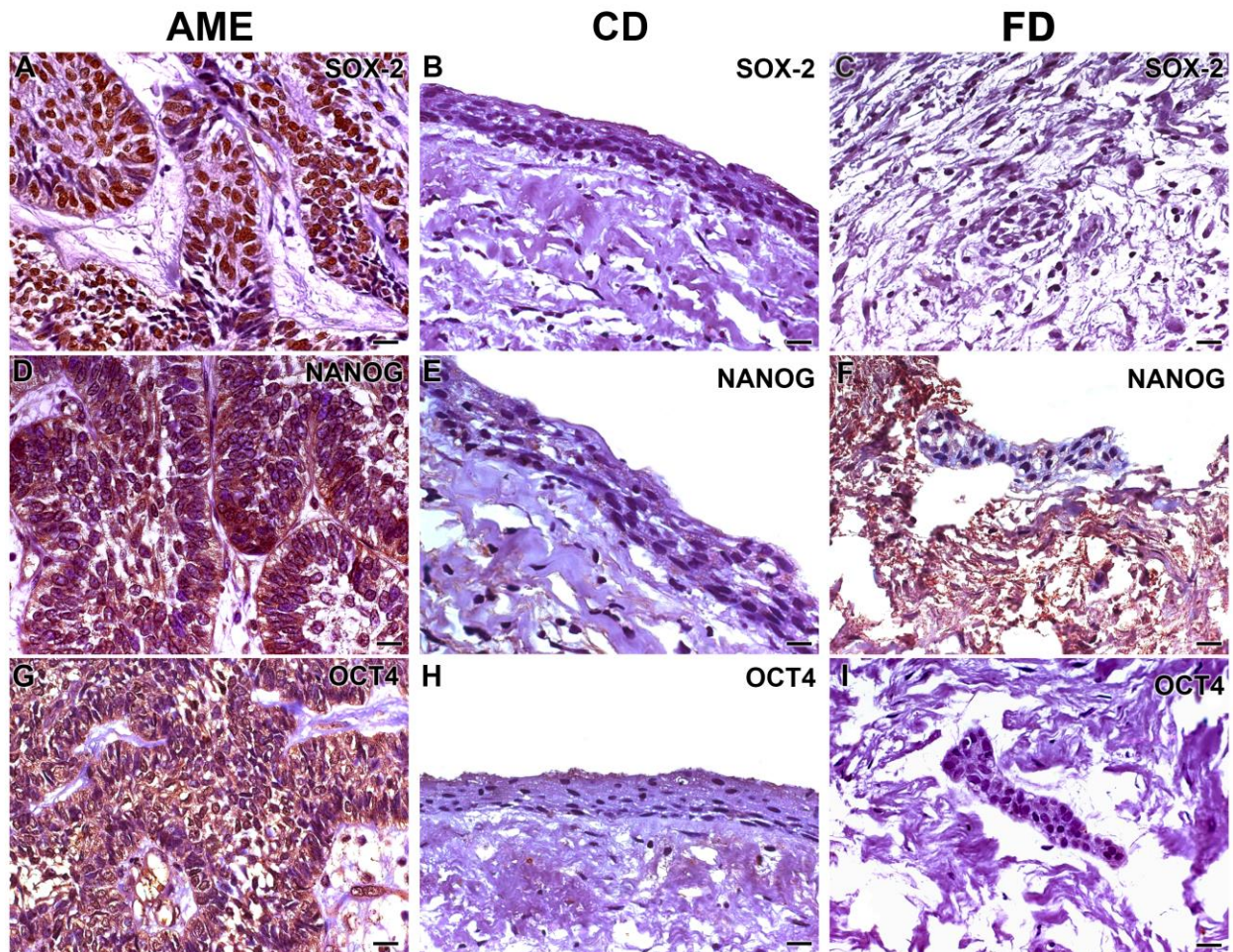


Figura 4. Imunomarcacão de SOX-2 (A, B e C), NANOG (D, E e F) e OCT4 (G, H e I) nas amostras de ameloblastoma (A, D e G), cisto dentígero (B, E e H) e folículo dentário (C, F e I). Imunomarcacão predominantemente nuclear no parênquima das células do ameloblastoma para as três proteínas (A, D e G). No epitélio do cisto dentígero, nota-se fraca imunomarcacão das três proteínas no núcleo de algumas células epiteliais (B, E e H), assim como é observado no folículo dentário (C, F e I). Há imunomarcacão difusa de NANOG no tecido conjuntivo do folículo dentário (F). AME= ameloblastoma; CD= cisto dentígero; FD= folículo dentário.

Além disso, foi observada uma correlacão da área imunomarcada pelas proteínas OCT4 e SOX-2 nas células neoplásicas do AME ($r=0.4544$) e houve uma relacão linear positiva entre a marcação de OCT4 e SOX-2 nas células neoplásicas do AME ($r^2=0.2065$). (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Correlação positiva da área imunomarcada das proteínas OCT4 e SOX2 nas células neoplásicas de ameloblastoma. Teste estatístico: Correlação de Pearson.

<i>Células Neoplásicas de Ameloblastoma</i>			
<i>Proteína 1</i>	<i>Proteína 2</i>	<i>r</i>	<i>valor de p</i>
OCT4	SOX2	0.4544	0.0294*

r: Coeficiente de Pearson

**p* < 0.05.

Tabela 3. Regressão linear mostra associação das áreas imunomarcadas das proteínas OCT4 e SOX2 nas células neoplásicas de ameloblastoma.

<i>Células Neoplásicas de Ameloblastoma</i>			
<i>Proteína 1</i>	<i>Proteína 2</i>	<i>r²</i>	<i>valor de p</i>
OCT4	SOX2	0.2065	0.0294*

R²: Coeficiente de determinação

**p* < 0.05.

4. DISCUSSÃO

O estudo em questão verificou a expressão de SOX-2, NANOG e OCT4, marcadores de célula tronco, no parênquima do AME, CD e FD. Foi observada alta expressão das proteínas estudadas no parênquima de todas as amostras de AME examinadas. Adicionalmente, verificou-se tanto a correlação como a relação linear positiva entre os fatores OCT4 e SOX-2, presentes nas células neoplásicas do AME. Observou-se também uma expressão sutil desses marcadores de células tronco no epitélio odontogênico do CD e do FD.

O AME é considerado a neoplasia mais comum de mandíbula, sendo o tumor odontogênico mais frequente (Rioux-Forker et al., 2019). Os dados clínico-histológicos das amostras estudadas, corroboram com os dados encontrados na literatura sobre a prevalência do AME sólido multicístico, onde o tumor mostra predominância da terceira à sétima década de vida, e a mandíbula é a localização de maior acometimento (Effiom et al., 2017).

A origem do AME está relacionada com a indução e reativação das estruturas odontogênicas (Dias, 2010). O processo de odontogênese, por sua vez, é regulado

por fatores de transcrição que controlam a expressão gênica, e são capazes de determinar a maneira como as células funcionam e respondem aos estímulos ambientais, assim como, mediar as interações entre as camadas dos tecidos odontogênicos (da Cunha et al., 2013).

Em nosso estudo, observou-se uma alta expressão dos fatores de transcrição, SOX-2, NANOG e OCT4, no parênquima das amostras de AME. Em contrapartida, houve uma fraca expressão desses fatores em CD, que assim como o AME também é derivado do epitélio odontogênico, mas que por sua vez possui um comportamento menos agressivo, e em FD, que não apresenta um padrão de crescimento neoplásico.

Cunha et al. (2013) realizaram análise imuno-histoquímica da expressão de fatores de transcrição das CTs (OCT4, SOX-2, NANOG e Stat-3) em germes dentários, e observaram que todos os fatores analisados estavam ativos durante a morfogênese fetal dos dentes humanos, sugerindo amplo potencial de desenvolvimento e diferenciação. Baseado nisso, esses autores concluíram que a inter-relação entre esses fatores de transcrição está relacionada com a formação de ninhos de células-tronco, que regulam a diferenciação em ameloblastos e odontoblastos. Na nossa análise imuno-histoquímica a expressão de SOX-2, NANOG e OCT4 foi observada tanto nas células da periferia como nas células centrais dos ninhos e cordões epiteliais, que podem ter relação com a ampla expressão desses fatores no desenvolvimento do AME, tendo em vista que as CTs da lâmina dental são possíveis alvos de agentes carcinogênicos (Harada et al., 2002).

A expressão de SOX-2, neste estudo, foi predominantemente nuclear, como observado em carcinoma nasofaríngeo, câncer gástrico, colorretal, de pulmão, e de mama (Luo et al., 2013; Ren et al., 2016). Além disso, a expressão nuclear de SOX-2 está intimamente associada com mau prognóstico em pacientes com carcinoma epidermoide de língua (Du et al., 2011). Juuri et al. (2013) também observaram a presença de SOX-2 no AME e relacionou-a com a proliferação e origem embrionária desse tumor. Em nosso trabalho foi observada uma maior expressão de SOX-2 no parênquima do AME em relação ao epitélio de revestimento do CD e os ninhos epiteliais do FD. Embora menor, é curiosa a expressão nuclear de SOX-2 no epitélio odontogênico do CD e FD. Estudos indicam papel essencial de SOX-2 na gênese tumoral (Boumahdi et al., 2014; Ravindran Menon et al., 2018). A deleção de SOX-2 em papiloma e em carcinoma de células escamosas de pele iniciais levaram à regressão do tumor e diminuíram a capacidade das células cancerosas de se

propagarem após o transplante para camundongos imunodeficientes, apoiando o papel essencial de SOX-2 em regular as funções na iniciação e progressão do carcinoma de células escamosas (Boumahdi et al. 2014). Foi apontado, que a expressão dessa proteína em células originárias do epitélio odontogênico da lâmina dental poderia levar ao desenvolvimento do AME (Jurri et al., 2013). Especula-se aqui se o mesmo não poderia ocorrer com o CD e com o FD, já que os epitélios dos mesmos expressam SOX-2.

Alta expressão de OCT4 foi detectada nas CTCs de próstata (Ben-Porath et al., 2008) e de mama (Hu et al., 2008) e nas células iniciadoras de tumor em um modelo de camundongo com tumor p53 - / - (Darini et al., 2012), mostrando que a expressão OCT4 tem um papel crítico na sobrevivência das células tumorais. Khan et al. (2018), não detectaram a expressão de OCT4 em 20 casos de AME sólido multicístico agressivo, afirmando em seu estudo que essa proteína poderia ser usada como um indicador útil para distinguir histologicamente o carcinoma ameloblástico do AME sólido multicístico agressivo, enquanto que no nosso estudo foi observada a alta expressão de OCT4 em 23 casos de AME sólido convencional, colocando em prova se OCT4 realmente pode funcionar como um marcador para diferenciar tumores benignos e malignos de cabeça e pescoço. Porém, não podemos deixar de levar em consideração as divergências verificadas ao realizar a comparação entre as metodologias empregadas. Em nosso estudo foi utilizado um método de calor e pressão (Câmara de Pascal) e uma diluição menor do anticorpo (1:25), enquanto que no trabalho de Khan et al (2018), o método foi apenas o de calor (microondas), e a diluição do anticorpo foi maior (1:300).

OCT4 também foi observado em componentes epiteliais e mesenquimais durante o desenvolvimento do dente e acredita-se que essa proteína participe no processo de diferenciação dos ameloblastos (Kero et al., 2014). Em nossas amostras, observamos marcações tanto nucleares como citoplasmáticas de OCT4. Segundo Monroy et al. (2018), a presença de OCT4 no núcleo está ligada à “stemness” celular, enquanto a presença de OCT4 no citoplasma é observada em células em diferenciação ou diferenciadas.

Por sua vez, NANOG, foi encontrada expressa no parênquima tumoral das amostras de AME aqui estudadas. A expressão epitelial de NANOG já foi descrita em cânceres de cabeça e pescoço, como no carcinoma de células escamosas oral (Lee et al., 2015) e no carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar associada com

estágio, grau, metástase de linfonodo e pior prognóstico (Destro et al., 2017). Sua expressão foi recentemente investigada no estroma de lesões odontogênicas, incluindo no AME, por Chacham et al. (2020), onde foi verificada a presença de células mesenquimais positivas para NANOG. No entanto, a frequência encontrada não foi capaz de distinguir lesões agressivas de lesões não agressivas, e os autores atribuíram esse resultado a possível existência de mais de um gene codificante para diferentes proteínas NANOG, sendo até o presente momento, o único estudo a observar a expressão dessa proteína no parênquima do AME.

Segundo Grubelnik et al. (2020), que estudaram a expressão de NANOG e a relacionaram com o desenvolvimento humano e a carcinogênese, essa proteína possui diferentes funções que podem resultar em uma reação citoplasmática, referente à transdução da proteína, possuindo menor influência sobre outros genes; ou uma reação nuclear, que faz referência ao NANOG ativado, influenciando na transcrição de outros genes. Tanto a marcação citoplasmática quanto a nuclear foram detectadas no presente estudo.

De modo geral, o padrão de expressão obtido de SOX-2, NANOG e OCT4 está de acordo com sua função biológica como fatores de transcrição. A literatura aponta que esses são os fatores de transcrição cruciais, capazes de permitir que as CCs obtenham propriedades semelhantes às das CTs (Yu et al., 2020). As CTCs, por sua vez, manifestam propriedades semelhantes às de CTs, a partir da reprogramação oncogênica de diferentes genes de autorrenovação, apresentando características de imortalidade, que como tal, persistem nos tumores, geralmente em ninhos, representando a fonte de expansão do crescimento e manutenção do tumor, formação de metástase e recidiva do tumor (Grubelnik et al., 2020).

Encontra-se na literatura uma dificuldade na denominação das células neoplásicas do AME que expressam essas proteínas. Parece inadequado denominá-las de CTs, vistos as várias alterações gênicas e proteômicas descritas nas células neoplásicas do AME (Gomes et al., 2010). Ainda mais equivocado seria denominá-las de CTCs. O termo células-tronco tumoral, parece ser o mais adequado, uma vez que descrevê-las como células que apresentam características de CTs (Monroy et al., 2018; Silva et al., 2020) ou células que expressam marcadores de CTs (Chacham et al., 2020), nos parece um tanto quanto vago.

Rodda et al. (2005), mostraram, usando a imunoprecipitação da cromatina, que OCT4 e SOX-2 interagem sinergicamente e se ligam à NANOG em células-tronco

embrionárias humanas e de camundongo vivo, conduzindo a expressão de genes alvos relacionados com a pluripotência. De acordo com Boyer et al. (2005), quando juntos, os fatores de transcrição, se ligam aos promotores de seus próprios genes, formando loops autorregulatórios interconectados, formando uma rede de autorregulação que é capaz de fornecer vantagens para as CTs, importantes para a sobrevivência celular, estabilidade e progressão tumoral. Em comparação com o epitélio não tumoral, observamos que os níveis de expressão de SOX-2, NANOG e OCT4 estavam aumentados no parênquima do AME, sugerindo que essas moléculas podem estar envolvidas na patogênese do AME. Vale ressaltar que na literatura não existem estudos que avaliem em conjunto a expressão desses três marcadores no parênquima dessa neoplasia.

Adicionalmente, a interação entre OCT4 e SOX-2 também é sugerida em nosso estudo, uma vez que foi verificada uma relação linear positiva, assim como uma correlação entre os dois fatores nas células neoplásicas.

A imunomarcagem nuclear de NANOG e OCT4, mesmo que sutil no CD e no FD, pode estar relacionada ao potencial de desdiferenciação das células da camada basal e suprabasal do epitélio, no caso do CD, e no caso do FD pode estar envolvida com seu potencial proliferativo. Em relação à imunomarcagem difusa de NANOG, encontrada em tecido conjuntivo nos casos de FD, pode estar relacionada às CTs mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido folicular (Kim et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, ao verificar a alta imunoexpressão dos marcadores SOX-2, NANOG e OCT4 nas células neoplásicas do AME, confirma-se a presença e provável participação dessas proteínas no desenvolvimento do AME, além de sugerir que esse tumor possua células com características de CTs que estão relacionadas com a progressão e recorrência dessa neoplasia.

A imunoexpressão das proteínas estudadas revela tendências interessantes que indicam o provável papel das CTs na origem e na progressão do AME, destacando a correlação observada entre SOX-2 e OCT4.

Os resultados deste estudo, abrem portas para elaboração de novos estudos e métodos terapêuticos, a partir dos marcadores de CTs, para o AME.

6. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

7. REFERÊNCIAS

1. Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*, 17(1), 126–140. doi: 10.1101/gad.224503
2. Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., ... Meyerson, M. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics*, 41(11), 1238–1242. doi:10.1038/ng.465
3. Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics*, 40(5), 499–507. doi: 10.1038/ng.127
4. Boumahdi, S., Driessens, G., Lapouge, G., Rorive, S., Nassar, D., Le Mercier, M., ... Blanpain, C. (2014). SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*, 511(7508), 246–250. doi: 10.1038/nature13305
5. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020
6. Chacham, M., Almoznino, G., Zlotogorski-Hurvitz, A., Buchner, A., & Vered, M. (2020). Expression of stem cell markers in stroma of odontogenic cysts and tumors. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 10.1111/jop.13102. doi: 10.1111/jop.13102
7. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1
8. da Cunha, J. M., da Costa-Neves, A., Kerkis, I., & da Silva, M. C. (2013). Pluripotent stem cell transcription factors during human odontogenesis. *Cell and tissue research*, 353(3), 435–441. doi: 10.1007/s00441-013-1658-y

9. Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine*, 58, 267–284. doi: 10.1146/annurev.med.58.062105.204854
10. Darini, C. Y., Pisani, D. F., Hofman, P., Pedeutour, F., Sudaka, I., Chomienne, C., Dani, C., & Ladoux, A. (2012). Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene*, 31(19), 2438–2449. doi: 10.1038/onc.2011.421
11. Destro Rodrigues, M. F., Sedassari, B. T., Esteves, C. M., de Andrade, N. P., Altemani, A., de Sousa, S. C., & Nunes, F. D. (2017). Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 46(2), 112–120. doi: 10.1111/jop.12449
12. Dias, C. D. (2010) Ameloblastomas: evolução clínica-histopatológica de 85 casos com ênfase em aspectos de metaplasia escamosa e queratinização e sua correlação com o epitélio odontogênico do germe dental. *Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia*; doi:10.11606/D.23.2010.tde-18082010-125340.
13. Dick J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793–4807. doi: 10.1182/blood-2008-08-077941
14. Du, L., Yang, Y., Xiao, X., Wang, C., Zhang, X., Wang, L., ... Dong, Z. (2011). Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 47(8), 709–713. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.017
15. Effiom, O. A., Ogundana, O. M., Akinshipo, A. O., & Akintoye, S. O. (2018). Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. *Oral diseases*, 24(3), 307–316. doi: 10.1111/odi.12646
16. Fan, Z., Li, M., Chen, X., Wang, J., Liang, X., Wang, H., ... Xia, J. (2017). Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis. *Scientific reports*, 7, 43008. doi:10.1038/srep43008
17. Gomes, C. C., Duarte, A. P., Diniz, M. G., & Gomez, R. S. (2010). Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 39(8), 585–591. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00908.x

18. Grubelnik, G., Boštjančič, E., Pavlič, A., Kos, M., & Zidar, N. (2020). NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 245(5), 456–464. doi: 10.1177/1535370220905560
19. Gu, T. T., Liu, S. Y., & Zheng, P. S. (2012). Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *The American journal of pathology*, 181(2), 652–661. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.008
20. Harada, H., Mitsuyasu, T., Toyono, T., & Toyoshima, K. (2002). Epithelial stem cells in teeth. *Odontology*, 90(1), 1–6. doi: 10.1007/s102660200000
21. Henriques, A.C., Cazal C., Fonsêca D.D., Bello D.M., Araújo N.N, & Castro J.F. (2009). Considerações sobre a classificação e o comportamento biológico dos tumores odontogênicos epiteliais: revisão da literatura. *Revista brasileira de cancerologia*, 55(2):175-84. Id: lil-534463
22. Hu, F., Li, C., Zheng, X., Zhang, H., Shen, Y., Zhou, L. ... Zhang, X. (2020). Lung adenocarcinoma resistance to therapy with EGFR-tyrosine kinase inhibitors is using increased expression of cancer stem cell markers SOX2, OCT4 and NANOG. *Oncology Reports*, 43, 727-735. doi:10.3892/or.2019.7454.
23. Hu, T., Liu, S., Breiter, D. R., Wang, F., Tang, Y., & Sun, S. (2008). Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer research*, 68(16), 6533–6540. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6642
24. Humphries, H. N., Wickremesekera, S. K., Marsh, R. W., Brasch, H. D., Mehrotra, S., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Characterization of Cancer Stem Cells in Colon Adenocarcinoma Metastasis to the Liver. *Frontiers in surgery*, 4, 76. doi: 10.3389/fsurg.2017.00076
25. Juuri, E., Isaksson, S., Jussila, M., Heikinheimo, K., & Thesleff, I. (2013). Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *European journal of oral sciences*, 121(6), 509–516. doi: 10.1111/eos.12095
26. Kero, D., Novakovic, J., Vukojevic, K., Petricevic, J., Kalibovic Govorko, D., Biocina-Lukenda, D., & Saraga-Babic, M. (2014). Expression of Ki-67, Oct-4, γ -tubulin and α -tubulin in human tooth development. *Archives of oral biology*, 59(11), 1119–1129. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.025

27. Khan, W., Augustine, D., Rao, R. S., Sowmya, S. V., Haragannavar, V. C., & Nambiar, S. (2018). Stem Cell Markers SOX-2 and OCT-4 Enable to Resolve the Diagnostic Dilemma between Ameloblastic Carcinoma and Aggressive Solid Multicystic Ameloblastoma. *Advanced biomedical research*, 7, 149. doi: 10.4103/abr.abr_135_18
28. Kim, H. M., Kang, Y. H., Byun, J. H., Jang, S. J., Rho, G. J., Lee, J. S., & Park, B. W. (2017). Midkine and NANOG Have Similar Immunohistochemical Expression Patterns and Contribute Equally to an Adverse Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2339. doi: 10.3390/ijms18112339
29. Kumamoto, H., Izutsu, T., Ohki, K., Takahashi, N., & Ooya, K. (2004). p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 33(5), 292–299. doi: 10.1111/j.0904-2512.2004.00044.x
30. Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., ... Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology*, 25(6), 2475–2485. doi: 10.1128/MCB.25.6.2475-2485.2005
31. Lee, H. J., Kang, Y. H., Lee, J. S., Byun, J. H., Kim, U. K., Jang, S. J., ... Park, B. W. (2015). Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC oral health*, 15(1), 153. doi: 10.1186/s12903-015-0120-9
32. Leibovitch, I., Schwarcz, R. M., Modjtahedi, S., Selva, D., & Goldberg, R. A. (2006). Orbital invasion by recurrent maxillary ameloblastoma. *Ophthalmology*, 113(7), 1227–1230. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.02.051
33. Luo, W., & Yao, K. (2013). Molecular characterization and clinical implications of spindle cells in nasopharyngeal carcinoma: a novel molecule-morphology model of tumor progression proposed. *PloS one*, 8(12), e83135. doi: 10.1371/journal.pone.0083135
34. Luo, W., Li, S., Peng, B., Ye, Y., Deng, X., & Yao, K. (2013). Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *PloS one*, 8(2), e56324. doi: 10.1371/journal.pone.0056324

35. Monroy, E., de Andrade Santos, P. P., de Sousa Lopes, M., Mosqueda-Taylor, A., Pinto, L. P., & de Souza, L. B. (2018). Oct-4 and CD44 in epithelial stem cells like of benign odontogenic lesions. *Histochemistry and cell biology*, 150(4), 371–377. doi: 10.1007/s00418-018-1692-7
36. Natri, A. L., Wiesenfeld, D., Radden, B. G., Eveson, J., & Scully, C. (1995). Maxillary ameloblastoma: a retrospective study of 13 cases. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*, 33(1), 28–32. doi: 10.1016/0266-4356(95)90082-9
37. Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(12), 895–902. doi: 10.1038/nrc1232
38. Pesce, M., & Schöler, H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 19(4), 271–278. doi: 10.1634/stemcells.19-4-271
39. Pogrel, M. A., & Montes, D. M. (2009). Is there a role for enucleation in the management of ameloblastoma? *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 38(8), 807–812. doi: 10.1016/j.ijom.2009.02.018
40. Ravindran Menon, D., Luo, Y., Arcaroli, J. J., Liu, S., KrishnanKutty, L. N., Osborne, D. G., Li, Y., ... Fujita, M. (2018). CDK1 Interacts with Sox2 and Promotes Tumor Initiation in Human Melanoma. *Cancer research*, 78(23), 6561–6574. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0330
41. Ren, Z. H., Zhang, C. P., & Ji, T. (2016). Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis. *Oncology letters*, 11(3), 1973–1979. doi: 10.3892/ol.2016.4207
42. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. doi: 10.1038/35102167
43. Rioux-Forker, D., Deziel, A. C., Williams, L. S., & Muzaffar, A. R. (2019). Odontogenic Cysts and Tumors. *Annals of plastic surgery*, 82(4), 469–477. doi: 10.1097/SAP.0000000000001738
44. Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), 24731–24737. doi: 10.1074/jbc.M502573200

45. Sathi, G. A., Tamamura, R., Tsujigiwa, H., Katase, N., Lefeuvre, M., Siar, C. H., ... Nagatsuka, H. (2011). Analysis of immunoexpression of common cancer stem cell markers in ameloblastoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), 397–402. doi: 10.3892/etm.2011.437
46. Schulenburg, A., Ulrich-Pur, H., Thurnher, D., Erovic, B., Florian, S., Sperr, W. R., ... Valent, P. (2006). Neoplastic stem cells: A novel therapeutic target in clinical oncology. *Cancer*, 107(10), 2512–2520. doi: 10.1002/cncr.22277
47. Silva, B. S., Silva, L. R., Lima, K. L., Dos Santos, A. C., Oliveira, A. C., Dezzen-Gomide, A. C., Batista, A. C., & Yamamoto-Silva, F. P. (2020). SOX2 and BCL-2 Expressions in Odontogenic Keratocyst and Ameloblastoma. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 25(2), e283–e290. doi: 10.4317/medoral.23348
48. Silva, F. P., Dias, A., Coelho, C. A., Guerra, E. N., Marques, A. E., Decurcio, D. A., A., ... Silva, B. S. (2016). Expression of CD90 and P75NTR stem cell markers in ameloblastomas: a possible role in their biological behavior. *Brazilian oral research*, 30(1), e109. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0109
49. Wilbertz, T., Wagner, P., Petersen, K., Stiedl, A. C., Scheble, V. J., Maier, S., ... Perner, S. (2011). SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(7), 944–953. doi: 10.1038/modpathol.2011.49
50. Yu, B., Cai, H., Xu, Z., Xu, T., Zou, Q., & Gu, M. (2016). Expressions of stem cell transcription factors Nanog and Oct4 in renal cell carcinoma tissues and clinical significance. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(8), 1818–1823. doi: 10.3109/21691401.2015.1105238
51. Yu, S. S., & Cirillo, N. (2020). The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *Journal of cellular physiology*, 235(1), 65–73. doi: 10.1002/jcp.28963

ANEXO I: NORMAS PARA SUBMISSÃO NA EXPERIMENTAL CELL RESEARCH

Trabalho elaborado e formatado conforme as normas do periódico científico.

Disponível em:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622826?generatepdf=true

Instructions for authors

Article structure

Introduction: State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods: Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results: Results should be clear and concise.

Discussion: This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions: The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations.* Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which

the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/experimental-cell-research>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted

article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

For reference style 1 numbered:

[5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 1a numbered without article and chapter titles:

[5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 2 Harvard:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 3 Vancouver Numbered:

[5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 4 Vancouver Name and Year:

Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 5 APA:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 6 AMA:

5. Oguro, M, Imahiro, S, Saito, S, Nakashizuka, T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities

through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication.

You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

ANEXO II: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo in vitro e in vivo sobre a associação das proteínas relacionadas à pluripotencialidade celular e o comportamento biológico do ameloblastoma.

Pesquisador: JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30647720.6.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.003.555

Apresentação do Projeto:

O ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico de origem epitelial e, embora classificado como um tumor benigno, é caracterizado por um padrão de crescimento localmente invasivo, com propensão a recorrência local e potencial para envolvimento direto de estruturas vitais, quando localizado na maxila. Nos últimos anos, vários estudos identificaram alterações moleculares nesta lesão, no entanto, não esclareceram totalmente as razões de seu comportamento biológico agressivo. Na busca por mecanismos celulares que justifiquem tal progressão, a investigação do papel das células-tronco tem ganhado cada vez mais destaque na biologia tumoral com diversas pesquisas relacionando sua participação no crescimento, na angiogênese e na invasividade do tumor, além da sua relação com os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) ser apontada como um fator importante na progressão tumoral. Para analisar a presença das células-tronco cancerígenas (CSCs), a literatura destaca biomarcadores, como SOX2, OCT4, NANOG, que possuem relação com SMAD-4 e TGF no processo de pluripotência e proliferação celular. Assim, o objetivo deste estudo é analisar, in vivo e in vitro, a expressão das proteínas interrelacionadas com as CSCs, verificando a imunexpressão dos biomarcadores, assim como, SMAD-4, TGF e alfa SMA no ameloblastoma. A metodologia utilizada será: imunohistoquímica, transfecção por shRNA, western blot, qPCR, imunofluorescência indireta, ensaio de invasão e ensaio de ferida. Consequentemente, os resultados deste estudo podem ser base de novos métodos terapêuticos

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.003.555

desta neoplasia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Verificar a expressão de proteínas Sox-2, Nanog, Oct4, TGF-, Smad4 e -actina musculoso liso.

Objetivo Secundário: - Avaliar a expressão das proteínas de interesse no tecido e em linhagem celular de ameloblastoma (AME-hTERT);- Verificar o padrão de marcação das proteínas de interesse em 25 casos de AME sólido convencional ou multicístico;- Verificar o padrão de marcação das proteínas de interesse em 10 amostras de cisto dentígero; - Verificar o padrão de marcação das proteínas de interesse em 10 amostras de folículo dentário (controle); Comparar a imunexpressão das proteínas de interesse entre as amostras de AME, cisto dentígero e folículo dentário (controle).- Silenciar o TGFR II em linhagem celular de AME-hTERT, que será denominada AME- TGFR II, usando como controle a linhagem celular AME-hTERT não silenciada; Verificar se o shRNA de TGFR II altera a expressão das proteínas de interesse e comparar com a linhagem controle;- Verificar se o shRNA de TGFR II altera a expressão gênica das proteínas de interesse e comparar com a linhagem controle;- Verificar se o shRNA de TGFR II altera a capacidade invasiva da linhagem AME- TGFR II e comparar com a linhagem não silenciada;- Verificar se o shRNA de TGFR II altera a capacidade de migração da linhagem AME- TGFR II e comparar com a linhagem controle;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por se tratar de pesquisa experimental e laboratorial, este estudo poderá oferecer riscos para o operador que trabalhará com a cultura de células. Entre esses riscos tem-se: Risco Biológico: A auto inoculação resultante da infecção do operador durante a manipulação da cultura de células. Risco químico: Intoxicação pela manipulação de líquidos, gases e corantes tóxicos. Risco físico: Exposição a baixas temperaturas pela manipulação de nitrogênio líquido, no qual as células são criopreservadas. Exposição à radiação ultravioleta da câmara do fluxo laminar e da sala de cultivo. Para que os riscos sejam minimizados, todos os procedimentos de cultivo serão executados seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos instrumentais, materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. E ainda, todas as etapas que envolvam a manipulação das células serão realizadas em capela de fluxo laminar tipo II, obedecendo todas as normas de biossegurança exigidas pela legislação vigente de acordo com a CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.			
Bairro: Guamá	CEP: 66.075-110		
UF: PA	Município: BELEM		
Telefone: (91)3201-7735	Fax: (91)3201-8028	E-mail: cepccs@ufpa.br	

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.003.555

Benefícios: Como benefício, a pesquisa acerca do ameloblastoma, que possui crescimento localmente invasivo, com propensão a recorrência local e potencial para envolvimento de estruturas vitais, poderá fornecer para a comunidade científica informações relevantes sobre o comportamento biológico deste tumor. O cultivo celular é o primeiro passo para o desenvolvimento de drogas e mecanismos ligados a diminuição dos prognósticos ruins que envolvem as neoplasias ligadas não só à cavidade oral, mas com o organismo como um todo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo encaminhado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme resolução 466/12 do CNS/MS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados contemplam os sugeridos pelo sistema CEP/CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1528934.pdf	02/04/2020 10:06:01		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_PROJETO.pdf	01/04/2020 21:03:37	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CELULAS_TRONCO_FINALIZADO.pdf	01/04/2020 17:38:12	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/04/2020 17:37:18	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	Termo_de_consentimento_coordenador_LAPI.pdf	19/03/2020 23:38:03	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	Termo_de_consentimento_coordenador_LABCULT.pdf	19/03/2020 23:37:23	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_ORIENTADOR.pdf	19/03/2020 23:36:03	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO.pdf	19/03/2020 23:35:22	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	TERMO_DE_ACEITE_DO_ORIENTAD	19/03/2020	JOÃO DE JESUS	Aceito

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.003.555

Outros	.pdf	23:34:42	VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	TCUD.pdf	19/03/2020 23:34:26	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_ISENCAO_DE_ON US_FINANCEIRO_A_UFPA.pdf	19/03/2020 23:34:03	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PE SQUISADOR.pdf	19/03/2020 23:27:06	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_consetimento_da_instituicao. JPEG	19/03/2020 23:26:35	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 02 de Maio de 2020

Assinado por:

Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br