



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

KARINA PEREIRA ROSA

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS CHAVE NA FORMAÇÃO DO
INVADOPÓDIO: CORTACTINA, MT1-MMP, TKS4 E TKS5 NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

BELÉM

2020

KARINA PEREIRA ROSA

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS CHAVE NA FORMAÇÃO DO
INVADOPÓDIO: CORTACTINA, MT1-MMP, TKS4 E TKS5 NO TUMOR
ODONTOGÊNICO 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

Coorientadora: MSc. Sâmia Cordovil de
Almeida

BELÉM

2020

KARINA PEREIRA ROSA

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS CHAVE NA FORMAÇÃO DO
INVADOPÓDIO: CORTACTINA, MT1-MMP, TKS4 E TKS5 NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

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

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Sueli da Silva Kataoka
Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior
Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

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

Prof. Dr. Fabrício Mesquita Tuji
(Suplente) Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

Julgado em: ____/____/____

Conceito: _____

BELÉM

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Maria Leonor Rosa da Silva e Antonio Borges da Silva**, aos meus tios, **Maria Leonice da Rosa Reis e José Barros dos Reis**, e à minha avó **Maria Silva da Rosa (*in memoriam*)**, por serem meus maiores incentivadores ao longo dessa vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ser meu maior refúgio e abençoar todos os meus passos, dando-me a força necessária para superar todos os obstáculos. Obrigada, **meu Pai**, por tudo e, especialmente, por esta vitória. A Ti toda honra e toda glória!

À minha Mãezinha do Céu, **Nossa Senhora de Nazaré**, por ser fonte de Amor e de Fé, por cuidar do meu coração, por sempre interceder por mim junto ao Pai e por todas as graças alcançadas.

Aos meus pais, **Antonio e Leonor**, pelo maior gesto de amor desse mundo: terem me escolhido como sua filha. Por todo amor e incentivo ao longo dessa vida, por terem me ensinado a andar, a ler e a viver, por cada vez que me levaram à escola, por cada conselho e cada minuto que partilhamos. Vocês são minha fonte de inspiração e meu porto seguro. Obrigada por sonharem os meus sonhos, por todo esforço e dedicação para que eu chegasse até aqui, por toda confiança e por sempre acreditarem em mim, pelo suporte emocional e financeiro ao longo desses anos, por se fazerem presentes em cada etapa desta caminhada, e principalmente, por terem me dado o amor mais lindo que alguém já recebeu. Sem vocês nada disso seria possível, vocês são meus maiores anjos enviados por Deus. Amo vocês com todo o meu coração. Tudo é por vocês e para vocês.

Aos meus tios, **José e Leonice**, por todo amor, por cada abraço, cada conselho, pela felicidade a cada conquista, por toda compreensão e incentivo, por sempre acreditarem em mim, por cada vez que me ligaram somente para saber se eu estava bem, por mesmo distante, sempre se fazerem presentes, por cada palavra de conforto durante a confecção deste trabalho, não tenham dúvidas de que vocês me deram forças para continuar. À minha tia, **Kátia**, por todo cuidado e amor ao longo desses 21 anos, por ter sido mãe e ter se feito presente em tantos momentos importantes. Obrigada por tudo e por tanto. Amo vocês, hoje e sempre. Esta vitória também é de vocês e para vocês.

À minha avó, **Iraci** (*in memoriam*), que sempre acreditou em mim e sonhou este sonho junto comigo, quando você se foi, tivemos que continuar construindo ele um pouco mais distante, mas nós conseguimos, hoje estamos concluindo o nosso sonho, vózinha. Obrigada por cada ensinamento, pelo abraço aconchegante, pelo amor, pelo carinho, pela risada mais gostosa do meu mundo, pelo amor infinito que sempre existiu entre nós. Você me inspirou, obrigada por tudo. Te amo, nesta vida e em todas as outras.

Aos meus irmãos: **Thales**, que é meu sangue e mais que um amigo, gratidão a Deus por ter você comigo, você é meu parceiro de vida. Obrigada por sempre acreditar em mim, por cada vez que me esperou até tarde para abrir os portões, por cada gesto pequeno que fazem a diferença no dia a dia, você é incrível. E, **Francisco**, obrigada por ter dividido seus pais comigo, por cada vez que você ajudou com a gasolina para que eu pudesse ir para faculdade, por acreditar em mim e se orgulhar com as minhas vitórias. Ao meu sobrinho, **Kauê**, que sempre me incentivou e acreditou em mim. E aos meus primos, especialmente, **Joneson e José**, por se fazerem presentes a cada momento, por fazerem das minhas conquistas a sua felicidade. Amo todos vocês. Esta conquista não seria possível sem vocês.

A um anjo que Deus me enviou, **Ana Lúcia de Farias**, que tanto me ajudou, me incentivou, sempre se fez presente em todos os momentos. Tamanha é minha gratidão por ter você comigo.

À **Faculdade de Odontologia da UFPa**, pelas oportunidades, experiências e aprendizados proporcionados. Orgulho de estar me graduando pela Maior do Norte.

Ao meu orientador, professor **João Pinheiro**, pela confiança depositada, por cada incentivo e cada conhecimento compartilhado, por toda paciência e torcida ao longo desses anos. Você é uma referência de profissional e pesquisador, e foi fundamental para que eu chegasse até aqui, obrigada por tudo.

Aos professores, por todos os ensinamentos e experiências compartilhados, por serem a base dessa graduação. Um agradecimento especial à professora **Sueli Kataoka**, por ser um exemplo de pessoa e profissional, por tudo que me ensinou, por toda dedicação e cuidado para que o laboratório seja sempre melhor e por cada ensinamento do dia a dia. Você é uma inspiração. Obrigada por tudo. E ao professor **Sérgio Melo**, por cada conhecimento compartilhado em cada encontro no dia a dia do laboratório, por ser um exemplo de profissional e por nos incentivar a ser melhores sempre.

À família do **Laboratório de Cultivo Celular e Imunohistoquímica**, que se tornou minha segunda casa. Obrigada por todo apoio, ensinamento e experiência compartilhada, por cada risada, por cada tapioquinha e café que partilhamos e pela amizade que construímos. À **Giordanna e Thaianna**, por tudo que me ensinaram, toda ajuda, por cada palavra, por sempre se fazerem presente, por todos experimentos e abraços compartilhados, vocês são fonte de inspiração e referência profissional. À **Yasmim e Karolyny**, que sempre foram minhas parceiras nessa

caminhada. Obrigada por todo apoio, pela confiança depositada, por todos os aprendizados e toda ajuda, principalmente, pela nossa amizade, vocês foram parte fundamental na realização deste sonho. Ao **Felippe e Geovanni** por dividirem suas experiências conosco, vocês nos ensinaram muito do que sabemos hoje. E à **Aline, Raíssa, Beatriz, Bianka, Vanessa, Taiane** por todos os momentos que compartilhamos.

À querida, **MSc. Sâmia Cordovil**, a quem eu não poderia deixar de agradecer por este trabalho, por todas às orientações, por cada ensinamento, toda paciência, todas as palavras de incentivo, por ser sempre tão solícita. Você é um exemplo de pessoa, referência e inspiração como profissional. Obrigada por tudo!

À minha turma, que foi essencial para que esses 5 anos fossem mais leves. Sobretudo à **Ana Flávia Costa, Yngrid Paes e Rafaela Ferreira**, por toda parceria e amizade, vocês são anjos que Deus me enviou para levar além dos muros da Faculdade, gratidão por dividir tudo isso com vocês, amo vocês. À minha dupla, **Camila Souza**, por todas as clínicas e momentos que dividimos e pela amizade construída. À minha eterna dupla, **Mauro Mota**, que mesmo depois que nos separamos sempre se fez presente e foi fundamental para a minha caminhada.

A todos os anjos em forma de amigos, especialmente ao “**1, 2, 3 – o clã**”, **Adalberto Tavares, Claudio Almeida, Davi Martins, Maira Roberta, Roberta Caroline e Rodrigo Milanez**, que são o apoio e incentivo de sempre, que estão comigo no bom e no ruim e são tantas as histórias que temos para contar. São aqueles que fizeram uma festa ao final de cada frase deste trabalho e a cada vitória, não tenho dúvidas “*I’ll be there for you*” vai ser sempre nosso lema. Minha vida é melhor por ter vocês nela. À **Rafaella Casanova e Mateus Lobato**, pela parceria de uma vida, por todo amor e carinho, por sempre acreditarem e viverem tudo isso comigo, só tenho a agradecer por tudo que já vivemos juntos. Às amigas que vão além da faculdade, **Daniel Borges, Matteus Cruz, Ramom Leite, Thayanny Kizan e Yasmim Lima**, por cada momento compartilhado, por todo apoio e por sempre acreditarem em mim, vocês são um presente da Odontologia para a vida, à **Edysa Tavares e Tauane Paixão**, presentes que o esporte na Odontologia me deu, e que sempre me deram tanta força e apoio em todos os momentos, gratidão por essa amizade que construímos, e ao **Hudson Padilha**, um amigo que sempre acreditou em mim, desde o início da graduação e sempre esteve disposto a me ajudar em todos os momentos, e foi meu companheiro de laboratório e de cantorias. Obrigada por tudo, amo vocês.

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Expressão *in vitro* das proteínas chave na formação do invadopódio: Cortactina, MT1-MMP, TKs4 e TKs5 no tumor odontogênico Ameloblastoma.

Folha de rosto	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	15
Metodologia	18
Resultados	19
Discussão	24
Conclusão	28
Agradecimentos e Conflitos de Interesse	29
Referências	30
ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	35
ANEXO II: Normas para submissão na revista Experimental Cell Research	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta de TKs4 na linhagem AME-hTERT.

Figura 2. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta de TKs5 na linhagem AME-hTERT.

Figura 3. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta de cortactina na linhagem AME-hTERT.

Figura 4. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta de MT1-MMP na linhagem AME-hTERT.

**EXPRESSÃO IN VITRO DAS PROTEÍNAS CHAVE NA FORMAÇÃO DO
INVADOPÓDIO: CORTACTINA, MT1-MMP, TKS4 E TKS5 NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

Karina Pereira Rosa

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.

Sérgio de Melo Alves Junior

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

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

e-mail: radface@hotmail.com

RESUMO

O Ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico epitelial que apresenta crescimento lento, invasividade local e altas taxas de recidiva. Estudos revelam que a invasividade do ameloblastoma está relacionada à formação de invadopódios, que são protrusões da membrana celular com atividade proteolítica pericelular. Algumas proteínas são consideradas chaves para a formação dos invadopódios: a cortactina que, quando induzida pela TKs5, modifica o citoesqueleto celular e a MT1-MMP, que induzida pela TKs4, é responsável pela degradação de MEC. Diante disso, o objetivo deste trabalho é verificar a expressão de proteínas relacionadas aos invadopódios, cortactina, TKs4, TKs5 e MT1-MMP na linhagem AME-hTERT. Para obter tais resultados, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta para verificar a expressão das proteínas supracitadas no ameloblastoma. Os resultados revelaram que a linhagem AME-hTERT expressa as proteínas relacionadas aos invadopódios, TKs4, TKs5, cortactina e MT1-MMP. A presença dessas proteínas no ameloblastoma sugere que a formação dos invadopódios esteja relacionada à invasividade local do ameloblastoma.

Palavras-chave: Ameloblastoma, invadopódios, TKs4, TKs5, cortactina, MT1-MMP.

ABSTRACT

Ameloblastoma (AME) is an epithelial odontogenic tumor that presents slow growth, local invasiveness, and high rates of recurrence. Studies show that invasiveness of AME is associated to invadopodia, which are cell-membrane protrusions with pericellular proteolytic activity. Some proteins are related to formation of invadopodia: cortactin, which is induced by TKs5, and changes the cell cytoskeleton, and MT1-MMP, which is induced by TKs4 and is responsible for ECM proteolysis. The objective of this work is to verify the expression of proteins related to invadopodia: cortactin, TKs5, TKs4 and MT1-MMP in cell line AME-hTERT. For this, immunofluorescence assays were performed, that confirm the expression of these proteins in cell line AME-hTERT. The presence of these proteins in AME favors to the idea that invadopodia are related to ameloblastoma's invasiveness.

Keywords: ameloblastoma; invadopodia; TKs4; TKs5; cortactin; MT1-MMP.

1. INTRODUÇÃO

O ameloblastoma (AME) é um dos tumores odontogênicos benignos de maior prevalência, que afeta principalmente a região posterior de mandíbula. É um tumor de origem epitelial com crescimento lento, porém é localmente invasivo e possui comportamento agressivo e altas taxas de recorrência e morbidade (Neville et al., 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017, classificou esse tumor em ameloblastoma, ameloblastoma unicístico, extraósseo ou periférico e metastático (Wright e Vered, 2017). O ameloblastoma, variante mais comumente encontrada, apresenta comportamento localmente mais agressivo e infiltrativo que a variante unicística, frequentemente invadindo a cortical óssea adjacente (Diniz et al., 2017). O tratamento pode variar de conservador até ressecção total da mandíbula dependendo do tamanho e localização da lesão (Cecim et al., 2013).

Diante da relevância clínica dessa neoplasia, é importante que os processos e proteínas ligados à invasividade e progressão tumoral sejam estudados, tendo em vista que os biomarcadores expressos em cada tumor têm refletido clinicamente no curso da doença e podem ser determinantes, principalmente, para fins de prognóstico e como parâmetros preditivos. Sabe-se que a progressão tumoral ocorre por meio da degradação e remodelação da matriz extracelular (MEC), realizada pela ação das metaloproteinases da matriz (MMPs), expressas no AME, e dentre elas destaca-se a metaloproteinase de membrana tipo-1 (MT1-MMP) (Pinheiro et al., 2011; Eddy et al, 2017). Estudos revelaram que a migração celular e degradação da MEC influencia no comportamento invasivo do ameloblastoma e que essas atividades estão relacionadas à formação de invadopódios, que são protrusões celulares a nível de membrana semelhantes a dedos que possuem atividade proteolítica pericelular, mediada por cortactina e recrutamento de MT1-MMP (Pinheiro et al., 2011; Siar et al., 2016).

Os invadopódios são protrusões celulares ricas em actina, produzidas por células neoplásicas durante a migração celular e têm se mostrado fundamentais na motilidade celular, estando presentes em vários tipos de tumores invasivos (Buschman et al., 2009; Siar et al., 2016). Essas estruturas localizam-se na superfície ventral da célula estendendo-se em direção à MEC e contêm uma

variedade de proteínas com atividade proteolítica, envolvidas na degradação da MEC e posterior invasão celular (Courtneidge et al., 2005; Hwang et al., 2011; Alblazi e Siar, 2015). Sabe-se que diferentes proteínas estão relacionadas à formação de invadopódios, entre essas moléculas, a cortactina, induzida pela proteína TKs5, e a MT1-MMP, induzida pela proteína TKs4, demonstraram ser fundamentais na formação e função dessas protrusões celulares (Ribeiro et al., 2016).

Nesse contexto, a TKs5, cujo gene é denominado SH3PXD2A, substrato da família Src denominado substrato tirosina-quinase 5 (TKs5), é uma proteína andaime com um domínio de homologia amino-terminal Phox (Px), cinco domínios SH3 e sítios de fosforilação Src17. Essa proteína está altamente relacionada com a formação de invadopódio e invasão direcionada por proteólise celular através da degradação da MEC. A TKs5 é recrutada para a membrana dos invadopódios, ligando-se seletivamente através de seu domínio PX e promovendo o recrutamento de várias proteínas, dentre elas a cortactina, que são encontradas nas estruturas pré-invadopódios (Buschman et al., 2009; Stylli et al., 2012). Enquanto a maioria dos componentes do invadopódio são amplamente expressos em todos os tipos celulares, principalmente em células tumorais, a TKs5, por sua vez, encontra-se superexpressa em células com potencial invasivo, mas não em células não neoplásicas, sugerindo que essa proteína desempenha um papel central na formação dos invadopódios (Courtneidge, 2012).

A cortactina, proteína que se liga a F-actina, é uma importante proteína multidomínio que está relacionada diretamente com a polimerização de actina, promovendo modificações no citoesqueleto celular. Essa proteína se liga ao complexo Arp 2/3, a F-actina e outras moléculas de sinalização como Src quinases e mantém o contato com as células através de seus sítios ativos de actina, como os podossomos, lamelipódios e invadopódios. A função principal da cortactina é ativar a montagem do citoesqueleto de actina através da estabilização das redes de F-actina. Na formação dos invadopódios, atua como suporte para a polimerização da mesma, mediada pelo complexo Arp 2/3, promovendo a motilidade celular. Além disso, promove secreção de proteinases da MEC, cruciais para formação dos invadopódios, e tem sido relacionada com a invasividade tumoral em tumores de

cabeça e pescoço, câncer de mama, esôfago e renal (Stylli et al., 2012; Ablazi e Siar, 2015; Siar et al., 2016; Yin et al., 2017).

Ainda relacionado às proteínas chaves na formação dos invadopódios, a TKs4, cujo gene é denominado SH3PXD2B, assim como a TKs5 é uma proteína andaime substrato de tirosina-quinase, contém um domínio de homologia amino-terminal Phox (Px), quatro domínios SH3 e domínios ricos em prolina. Essa proteína é responsável pelo recrutamento e regulação da localização, secreção e função de MT1-MMP, que diferentemente da cortactina, não é encontrada nas estruturas pré-invadopódios e tem sido encontrada em lesões com alta taxa de invasividade (Buschman et al., 2009; Courtneidge, 2012; Ribeiro et al., 2016). Estudos realizados por Courtneidge (2012) demonstraram que a TKs4 é também necessária para a formação de invadopódios induzida por Src, e que na ausência dessa proteína, várias proteínas dos invadopódios, incluindo a TKs5 se acumulam na membrana, porém a polimerização de actina e degradação da MEC não ocorrem.

A metaloproteinase de membrana tipo-1 (MT1-MMP), também conhecida como MMP-14, é uma das proteínas que regulam a função e formação de invadopódios. Esta proteína está intimamente ligada à degradação da MEC através de sua atividade proteolítica pericelular e também inicia cascatas proteolíticas ativando outras MMPs, como pró-MMP-2, -8 e -13, desempenhando um papel importante na modulação da migração celular e crescimento neoplásico. Estudos demonstram que essa proteína se acumula nos invadopódios, sendo denominada como uma das principais proteases dos invadopódios. A MT1-MMP tem um papel fundamental nos cânceres humanos e mostra correlação com estádios do tumor, invasão e metástases, além de pior prognóstico para os pacientes (Hwang et al., 2011; Shields et al., 2012; Ablazi e Siar, 2015; Castro-Castro et al., 2016; Ribeiro et al., 2016).

Levando em consideração a relevância clínica e potencial invasivo do AME e o papel desempenhado pelas proteínas supracitadas, entende-se que estudos para compreender a participação e papel das mesmas na progressão tumoral do AME são essenciais para que melhores prognósticos e tratamentos sejam alcançados. Diante disso, o objetivo deste trabalho é verificar a expressão das proteínas TKs4, TKs5, cortactina e MT1-MMP em linhagem celular de ameloblastoma.

2. METODOLOGIA

2.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado sob o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará de número 2.462.441.

2.2. AMOSTRA

Foi utilizada linhagem de células derivadas de ameloblastoma, denominada AME-hTERT, estabelecida no Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). A linhagem AME-hTERT é de propriedade do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da UFPA.

2.3. CULTIVO CELULAR

A linhagem celular AME-hTERT foi cultivada em frascos de cultivo de 25 cm², mantidas em meio DMEM-F12 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB (Gibco®), 2mM de glutamina (Sigma, San Luis, MO, USA), 3mM de bicarbonato de sódio (Sigma®), 100UI/mL de penicilina (Gibco®), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 2,5µg/mL de anfotericina B (Gibco®). As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Todos os procedimentos de cultivo foram executados seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos instrumentais, materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. E ainda, todas as etapas que envolveram a manipulação das células foram realizadas em capela de fluxo laminar tipo II, obedecendo as normas de biossegurança exigidas pela legislação vigente de acordo com a CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio de contraste de fase (Axiovert 40 C – Carl Zeiss, Jena, TH, DEU) e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

2.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para verificação da expressão de proteínas, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços. Submetidas a um processo com as

seguintes etapas: fixação em paraformaldeído a 2% por 10 minutos; lavagem em PBS (Phosphate Buffered Saline); permeabilização da membrana com solução Triton X-100 (Sigma®) a 0,5% por 15 min; lavagem com PBS; incubação com PBS/BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma®) a 1% por 30 min; incubação com os anticorpos monoclonais primários diluídos em PBS/BSA a 1%, por no mínimo 12 horas e no máximo 18 horas, em câmara úmida a 4°C.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- Anti-cortactina (1:50, Santa Cruz, Dallas, TX, USA)
- Anti-TKs4 (1:50, Sigma®)
- Anti-TKs5 (1:50, Sigma®)
- Anti-MMP14 (1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Para a detecção dos anticorpos primários foram utilizados os anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e para marcação dos núcleos, foi utilizado Hoechst 33258 (1:2000, Sigma®). Para melhor visualização do citoesqueleto, utilizamos o Alexa Fluor 568 Phalloidin (1:1000, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O anticorpo secundário e o Hoechst foram diluídos em PBS/BSA (Sigma®) e incubados por 1 hora em câmara úmida e escura em temperatura ambiente. Após isso, as lamínulas foram lavadas por 5 min com solução de PBS e 2 vezes em água destilada antes de serem montadas sobre lâminas de vidro, utilizando-se ProLong Antifade Kit (Gibco®). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Axio Scope. A1, Zeiss®) equipado com câmera fotográfica digital (AxioCam MRc - Zeiss®).

3. RESULTADOS

As células da linhagem de AME-hTERT expressaram as proteínas TKs4, TKs5, cortactina e MT1-MMP. A imunoexpressão de TKs4 foi visualizada de maneira puntiforme por todo o citoplasma e em algumas células os núcleos também foram marcados (Figura 1). A marcação de TKs5 foi observada somente no citoplasma, de forma puntiforme (Figura 2). A imunoexpressão da proteína cortactina apresentou marcação puntiforme dispersa por todo o citoplasma (Figura 3). Já a proteína MT1-MMP apresentou marcação puntiforme por todo o citoplasma e também nuclear, em algumas células (Figura 4).

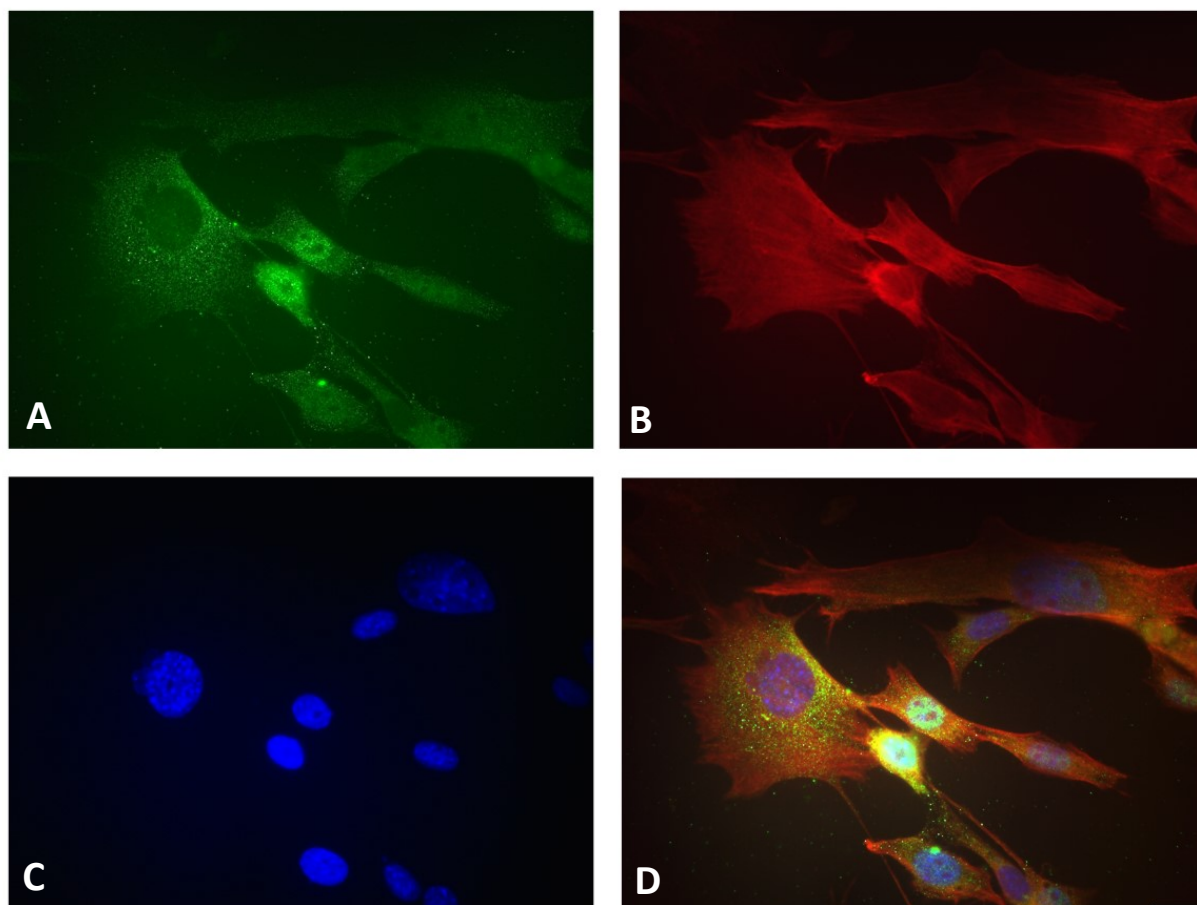


Figura 1. Fotomicrografias da imunofluorescência indireta de TKs4 na linhagem AME-hTERT: (A) A imunoexpressão da proteína TKs4 foi visualizada na linhagem, apresentando marcação puntiforme por todo o citoplasma e marcação nuclear em algumas células. (B) O citoesqueleto foi corado com Faloidina e (C) os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33258. (D) Sobreposição das fotomicrografias. Escala: 20 μ m.

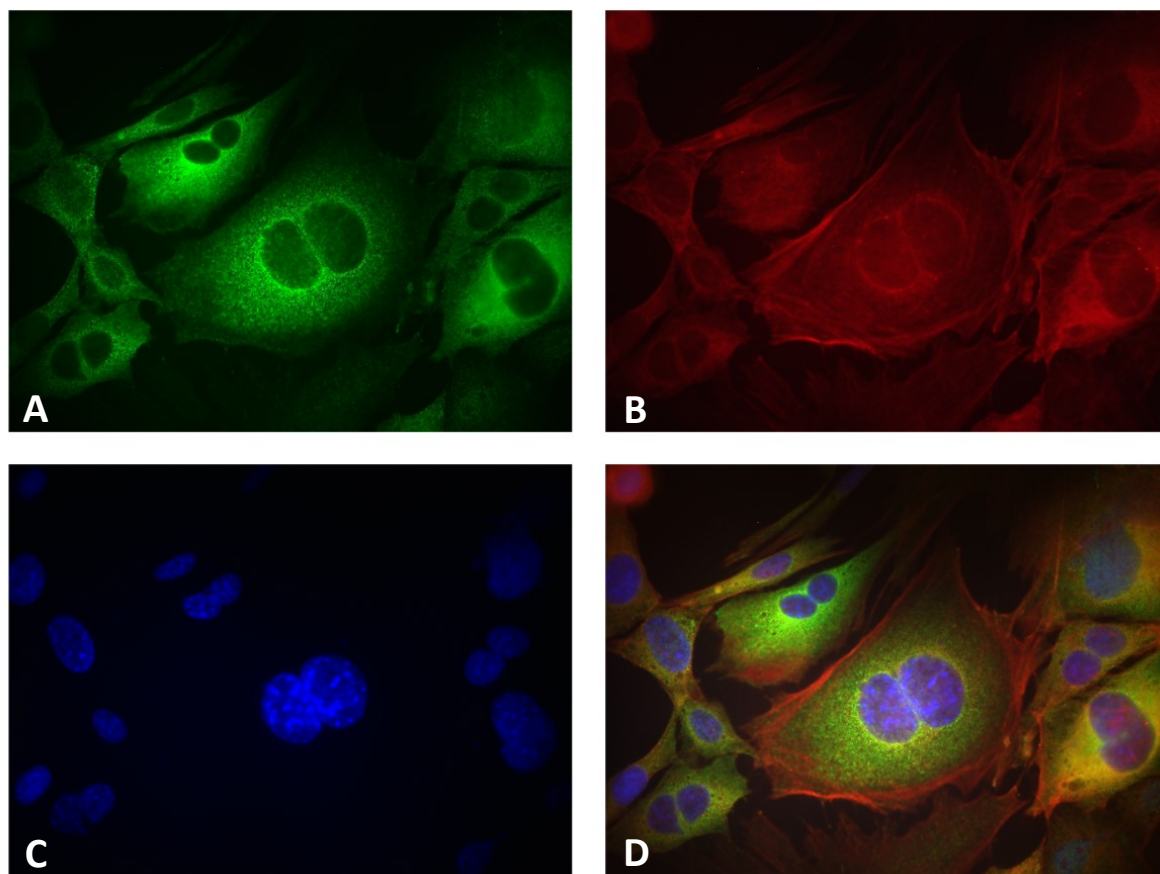


Figura 2. Fotomicrografias da imunofluorescência indireta de TKs5 na linhagem AME-hTERT: (A) A imunoexpressão da proteína TKs5 foi visualizada na linhagem, apresentando marcação puntiforme por todo o citoplasma, predominantemente perinuclear. (B) O citoesqueleto foi corado com Faloidina e (C) os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33258. (D) Sobreposição das fotomicrografias. Escala: 20 μm .

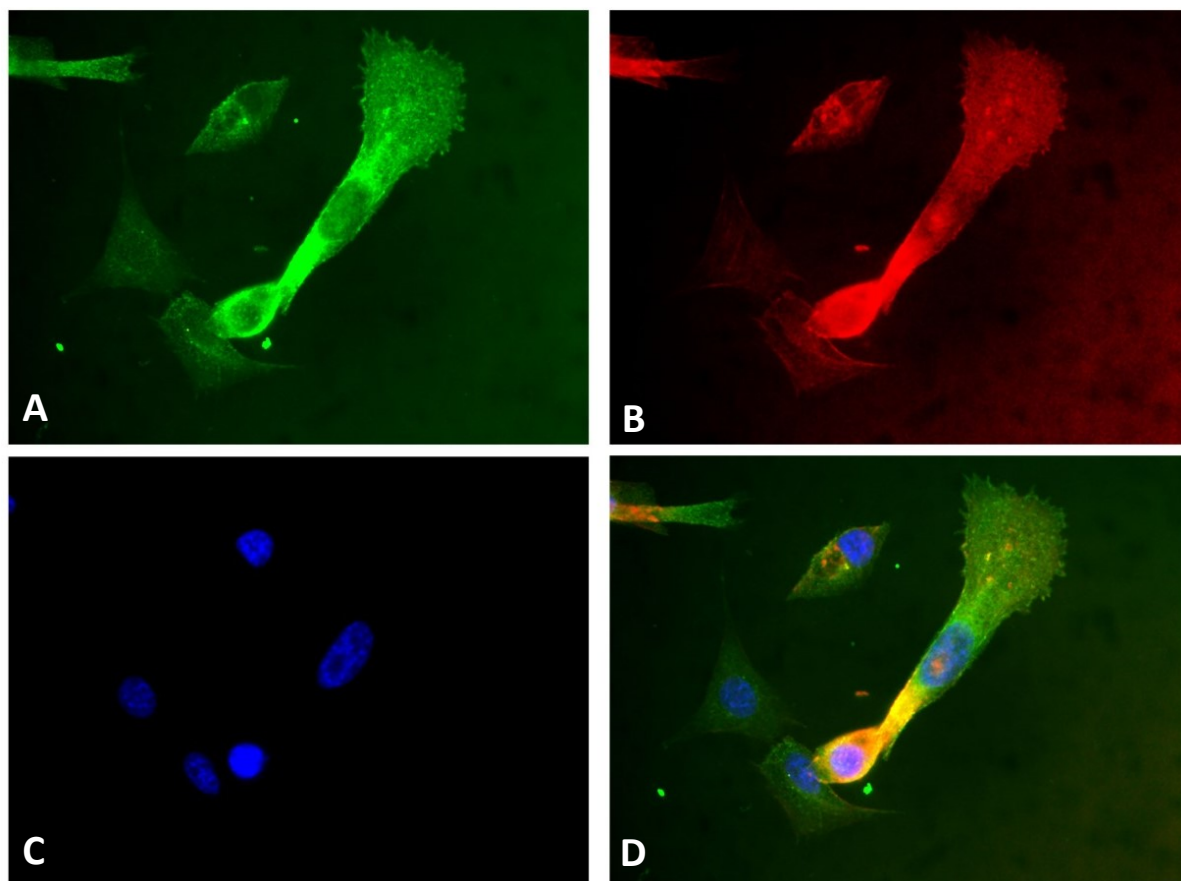


Figura 3. Fotomicrografias da imunofluorescência indireta de cortactina na linhagem AME-hTERT: (A) A imunoexpressão da proteína cortactina foi visualizada na linhagem, apresentando marcação puntiforme por todo o citoplasma. (B) O citoesqueleto foi corado com Faloidina e (C) os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33258. (D) Sobreposição das fotomicrografias. Escala: 20 μ m.

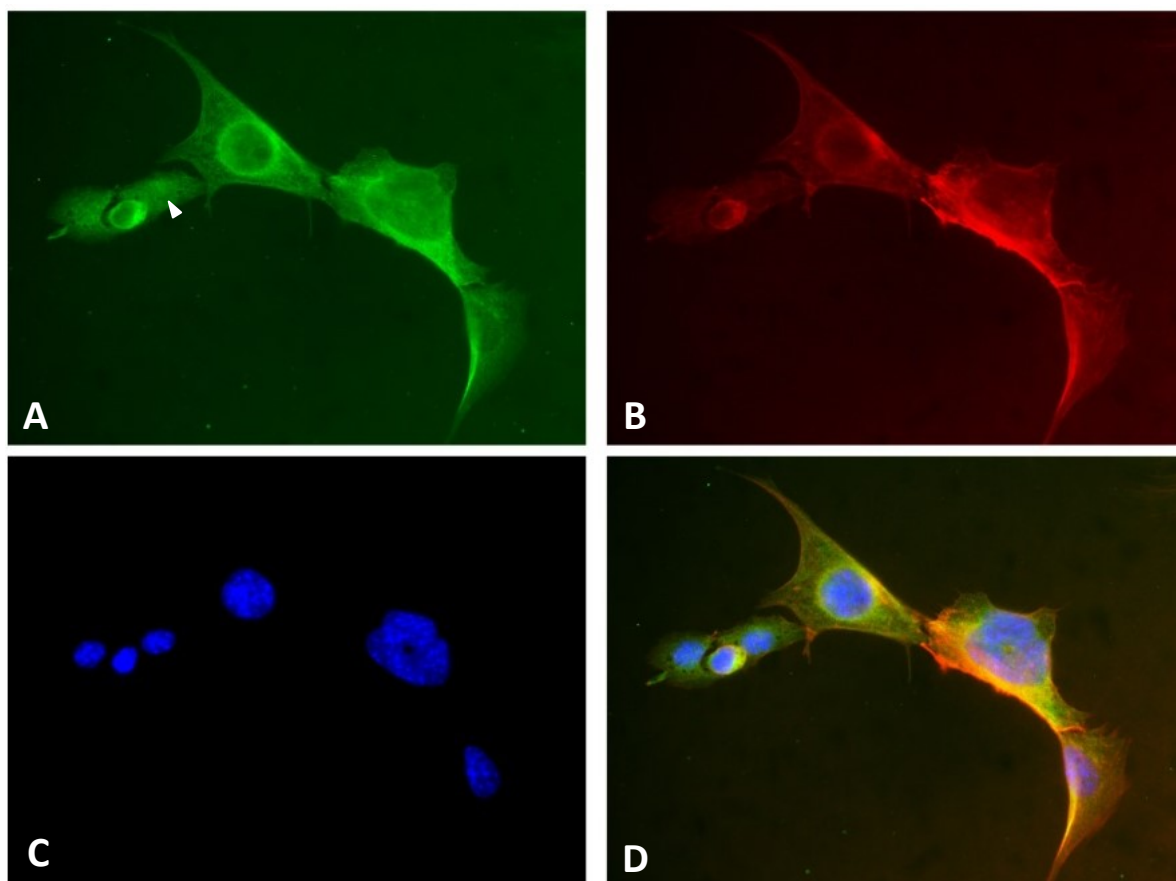


Figura 4. Fotomicrografias da imunofluorescência indireta de MT1-MMP na linhagem AME-hTERT: (A) A imunoexpressão da proteína MT1-MMP foi visualizada na linhagem, apresentando marcação puntiforme predominantemente no citoplasma. Em algumas células, observou-se marcação nuclear (ponta de seta). **(B)** O citoesqueleto foi corado com Faloidina e **(C)** os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33258. **(D)** Sobreposição das fotomicrografias. Escala: 20 μ m.

4. DISCUSSÃO

O ameloblastoma, apesar de ser considerado um tumor benigno, possui comportamento agressivo, localmente invasivo e com altas taxas de recidiva, podendo causar destruição dos ossos gnáticos (Neville et al, 2009; Costa et al., 2016). Estudos apontam que este comportamento invasivo está relacionado à formação de invadopódios, que está associado a proteínas estruturais como cortactina, TKs5 e TKs4, e possui altas concentrações de proteases, como MT1-MMP, MMP2 e MMP9 (Pinheiro et al., 2011; Leong et al., 2014; Siar et al., 2016).

Os resultados dos experimentos realizados revelaram expressão das proteínas TKs4, TKs5, cortactina e MT1-MMP na linhagem celular AME-hTERT. Essas proteínas têm sido apontadas pela literatura como proteínas chave na formação de invadopódios, estruturas dinâmicas localizadas na superfície ventral da membrana da célula, que vão em direção à MEC e possuem atividade proteolítica pericelular local. Essas estruturas são muito encontradas em células cancerígenas com alto potencial invasivo, como câncer de mama e melanomas (Courtneidge et al., 2005; Buschman et al., 2009; Courtneidge, 2012; Alblazi e Siar, 2015; Blouw et al., 2015; Siar et al., 2016). Ribeiro e colaboradores (2016) observaram no queratocisto odontogênico que a formação e a função dos invadopódios estão diretamente relacionadas à forte expressão das proteínas alvo deste trabalho.

Para entender melhor o papel de cada uma das proteínas estudadas é importante conhecer as três fases de formação do invadopódio, que ocorre após um estímulo, dentre eles fatores de crescimento, transformação oncogênica e hipóxia tumoral. Na primeira fase, denominada iniciação, observa-se a modificação estrutural do citoesqueleto, que ocorre através da interação de receptores de membrana do tipo integrina. Na segunda fase, denominada fase de montagem, ocorre a elongação dos invadopódios através de ativação dos reguladores de actina. O primeiro passo desta fase é a montagem do núcleo do invadopódio, na qual a TKs5 liga-se às proteínas chave de regulação de actina, através das quais promove o recrutamento da cortactina para a polimerização de F-actina. A terceira e última fase, denominada maturação, é definida pela estabilização da estrutura do invadopódio e presença de degradação da MEC circundante por atividade

proteolítica, realizada pelas metaloproteinases de matriz, principalmente a MT1-MMP, que é recrutada e estabilizada pela TKs4. Dessa forma, destaca-se a importância da TKs5 para o alongamento do invadopódio e ativação da cortactina, que, por sua vez, é importante para polimerização de actina, estando as duas proteínas presentes em todas as fases da formação do invadopódio. Enquanto que a TKs4 está ligada ao recrutamento de MT1-MMP, que desempenha um papel fundamental na proteólise da MEC, determinante na fase de maturação do invadopódio (Courtneidge et al., 2005; Courtneidge, 2012; Murphy e Courtneidge, 2012; Ribeiro et al., 2016; Jeannot e Besson, 2017; Chen et al., 2019).

Observou-se neste estudo que a imunomarcação de TKs4 e MT1-MMP, foi predominante no citoplasma celular e com marcação nuclear em algumas células, enquanto a marcação de TKs5 e cortactina foi observada de maneira puntiforme por todo o citoplasma.

Estudos apontam forte expressão de MT1-MMP e cortactina no citoplasma de células neoplásicas de câncer de mama, colo retal, gliomas e carcinoma oral de células escamosas, bem como revelam que a expressão destas proteínas nas glândulas salivares tem influência na formação do carcinoma adenoide cístico, e que a sua superexpressão em lesões malignas tem sido relacionada a potencial metastático e pior prognóstico (Alblazi e Siar, 2015; Wang et al., 2015; Swayampakula et al., 2017; Ren et al., 2018). O presente estudo revelou que a linhagem AME-hTERT expressa MT1-MMP, o que pode estar relacionado à invasividade local dessa neoplasia.

Adicionalmente, a literatura tem relatado que a TKs5, proteína adaptadora responsável pelo alongamento do invadopódio e fosforilação de cortactina, está fortemente expressa em células de câncer de mama, melanoma, adenocarcinoma pancreático, câncer de próstata e glioblastoma, e essa expressão têm sido relacionada à maior agressividade tumoral e pior prognóstico. Ademais, a redução da expressão de TKs5 em lesões cancerígenas resulta em diminuição da invasão e da formação de invadopódios e a indução da expressão de TKs5 em linhagem não invasiva de células cancerígenas resulta na formação de invadopódios (Courtneidge et al., 2005; Buschman et al., 2009; Ribeiro et al., 2016; Paterson e Courtneidge, 2017; Saini e Courtneidge, 2018; Chen et al., 2019). É importante ressaltar também que a TKs5, ao contrário das outras proteínas do núcleo dos invadopódios, parece

estar expressa somente nos invadopódios de lesões com potencial invasivo (Blouw et al., 2015, Chen et al., 2019).

Chen e colaboradores (2018) observaram, por meio de imunofluorescência, forte marcação citoplasmática de TKs5 em carcinomas pancreáticos. Nossos experimentos mostraram que a linhagem celular estudada também expressa TKs5. Como a TKs5 tem um papel primordial na fase inicial da formação do invadopódio, é possível que essa proteína participe da formação do invadopódio juntamente com a cortactina (Buschman et al., 2009; Courtneidge, 2012; Murphy e Courtneidge, 2012; Ribeiro et al., 2016, Siar et al., 2016).

A cortactina é proteína fundamental nas fases iniciais da formação do invadopódio, considerada marcador precoce para formação desse, além de ser considerada essencial para o recrutamento de metaloproteinases, MMP-2 e -9 e MT1-MMP, para degradação da MEC em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, estando intimamente relacionada com a invasão e migração tumoral (Castro-Castro et al., 2016; Ren et al., 2018).

O aumento da expressão de cortactina está associado ao aumento da invasão e metástase em câncer de mama, colorretal, gástrico, pulmões, hepatocelular, pancreático, de esôfago, renal, dos ovários e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e foi observado que a superexpressão da cortactina é fator de risco para transformação maligna nas lesões pré-malignas da mucosa oral (Alblazi e Siar, 2015; Wang et al., 2015; Siar et al., 2016; Ren et al., 2018; Chen et al., 2019). Além disso, essa proteína também melhora a capacidade das células na produção de invadopódios em resposta a estímulos de fatores de crescimento (Yin et al., 2017). Estudos realizados por Wang e colaboradores (2015) demonstraram a marcação citoplasmática de cortactina no glioma, além disso, esses estudos sugeriram que a inibição de cortactina reduziu a capacidade de migração dessas células, demonstrando a importância dessa proteína para a invasividade tumoral.

A TKs4, que é responsável pela regulação da localização, secreção e estabilização de MT1-MMP, desempenhando um papel importante na maturação e função dos invadopódios, assim como a TKs5, encontra-se marcadamente expressa em células invasivas cancerígenas e está associada a aumento da agressividade tumoral (Murphy e Courtneidge, 2012; Ribeiro et al., 2016). Tem sido descrita como

fortemente expressa no melanoma, câncer de mama, cólon, pulmão, próstata, melanoma e células da glia, e sua expressão está associada a um pior prognóstico para tais neoplasias (Horta et al., 2015; Iizuka et al., 2016), e bem como a Tks5 a redução da sua expressão tem sido associada à diminuição das metástases (Leong et al., 2014).

A MT1-MMP, recrutada pela Tks4, é uma metaloproteinase transmembrana que desempenha um papel importante como principal mediador na remodelação da MEC e está fortemente associada ao crescimento neoplásico. Essa proteína está ligada à malignidade de diversos tipos de tumores, incluindo carcinomas pulmonares, gástricos, do cólon, mamários, gliomas, melanomas e carcinoma oral de células escamosas (Hwang et al., 2011; Castro-Castro et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). Estudos imunohistoquímicos demonstraram que a MT1-MMP está fortemente expressa em carcinomas pancreáticos quando comparados a tecidos pancreáticos normais (Shields et al., 2012).

As MMP-2, -3, -9, -13, MT1-MMP e TIMP-1 mostraram-se expressas no núcleo de vários tipos celulares, dentre eles miócitos cardíacos, neurônios cerebrais, células epiteliais da mama, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (Mannello e Medda, 2012). Ademais, Ferrari et al. (2018) verificaram que os compartimentos endolissossômicos de armazenamento de MT1-MMP localizam-se à frente do núcleo, apresentando uma polarização centrada no centróssomo, ideal para liberação de MT1-MMP para os invadopódios na área nuclear anterior. Esses achados corroboram com os resultados de marcação nuclear de MT1-MMP obtidos neste estudo.

Desse modo, a expressão das proteínas chave na formação do invadopódio no AME reforça a possível presença dos invadopódios como estruturas celulares importante na invasividade local do ameloblastoma.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados dos experimentos realizados, conclui-se que a linhagem celular AME-hTERT expressa as proteínas relacionadas aos invadopódios, TKs4, TKs5, cortactina e MT1-MMP, o que sugere uma possível relação entre a formação e atividade dos invadopódios e a invasidade tumoral do ameloblastoma.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da UFPa e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da UFPa.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Alblazi, K.M.O., Siar, C.H., 2015. Cellular protrusions - lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes - and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6):2187-2191. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2187>
2. Blouw, B., Patel, M., Ilzuka, S., Abdullah, C., You, W.K., Huang, X., Li, J-L., Diaz, B., Stalcup., W.B., Courtneidge, S. A., 2015. The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 10(3):e0121003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121003>
3. Buschman, M.D., Bromann, P.A., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I., Courtneidge, S.A., 2009. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, 20(5):1302-11. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0949>
4. Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., Chavrier, P., 2016. Cellular and molecular mechanisms of MT1-MMP-dependent cancer cell invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32:555-576. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125227>
5. Cecim, R.L., Carmo, H.A.F., Kataoka, M.S.S., Freitas, V.M., Alves-Júnior, S.M., Pedreira, E.N., Jaeger, R.G., Pinheiro, J.J.V., 2013. Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 43:143–147. <https://doi.org/10.1111/jop.12103>
6. Chen, Y.C., Baik, M., Byers, J.T., Chen, K.T., French, S.W., Díaz, B., 2018. Experimental supporting data on TKS5 and Cortactin expression and localization in human pancreatic cancer cells and tumors. *Data in Brief*, 22:132–6. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.dib.2018.11.138>
7. Chen, Y.C., Baik, M., Byers, J.T., Chen, K.T., French, S.W., Díaz, B., 2019. TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. *Experimental and Molecular Pathology*, 106: 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.11.005>

8. Costa, N.M.M., Fialho, A.D.V., Proietti, C.C.P., Kataoka, M.S.S., Jaeger, R.G., Alves-Júnior, S.M., Pinheiro, J.J.V., 2016. Role of hypoxia-related proteins in invasion of ameloblastoma cells: crosstalk between NOTCH1, hypoxia-inducible factor 1 α , a disintegrin and metalloproteinase 12, and heparin-binding epidermal growth factor. *Histopathology*, 69(1): 99–106. <https://doi.org/10.1111/his.12922>
9. Courtneidge, S.A., Azucena, E.F., Pass, I., Seals, D.F., Tesfay, L., 2005. The SRC substrate Tks5, podosomes (invadopodia), and cancer cell invasion. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70: 167-171. <https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.014>
10. Courtneidge, S.A., 2012. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochemistry Social Transaction*, 40 (1): 129–132. <https://dx.doi.org/10.1042%2FBST20110685>
11. Diniz, M.G., Guimarães, B.V.A., Pereira, N.B., Menezes, G.H.F., Gomes, C.C., Gomez, R.S., 2017. DNA damage response activation and cell cycle dysregulation in infiltrative ameloblastomas: A proposed model for ameloblastoma tumor evolution. *Experimental and Molecular Pathology*, 102 (3): 391-395. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.04.003>
12. Eddy, R. J., Weidmann, M.D., Sharma, V.P., Condeelis, J.S., 2017. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 27(8): 595-607. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.03.003>
13. Ferrari, R., Infante, E., Chavrier, P., 2018. Nucleus-Invadopodia Duo During Cancer Invasion. *Trends in cell biology*, 29(2): 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.11.006>
14. Hwang, Y.S., Park, K.K., Chung, W.Y., 2011. Invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma: the role of epidermal growth factor receptor signalling. *Archives of Oral Biology*, 57(4): 335-43. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.08.019>
15. Horta, M.F.R., 2015 As proteínas TKs-4 e TKs-5, formadoras de invadopódios, são expressas no ameloblastoma e tumor odontogênico calcificante cístico. Tese de mestrado UFPa, Belém, Pará.
16. Iizuka, S., Abdullah, C., Buschman, M.D., Diaz, B., Courtneidge, S.A., 2016. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget*, 7(48): 78473–78486. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.12954>

17. Jeannot, P., Besson, A., 2017. Cortactin function in invadopodia. *Small GTPases*, 11(4): 256-270. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1405773>
18. Leong, H.S., Robertson, A.E., Stoletov, K., Leith, S.J., Chin, C.A., Andrew E.Chien, A.E., Hague, M.N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V.A., Postenka, C.O., Turley, E.A., Courtneidge, S.A., Chambers, A.N., Lewis, J.D., 2014. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Reports*, 8(5): 1558-1570. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050>
19. Mannello, F., Medda, V., 2012. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 47(1): 27-58. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2011.12.002>
20. Murphy, D.A.; Courtneidge, S.A. 2012. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews molecular cell biology*, 12(7): 413–426. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnm3141>
21. Neville, B.W., Damm, D.D., Allen, C.M., Bouquot, J.E., 2009. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Trad. 3a ed., Elsevier, 703 – 712.
22. Paterson, E.K., Courtneidge, S.A., 2017. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *The FEBS Journal*, 285(1): 8-27. <https://doi.org/10.1111/febs.14123>
23. Pinheiro, J.J.V., Nascimento, C.F., Freitas, V.M., Siqueira, A.S., Alves-Junior, S.M., Jaeger, R.G., 2011. Invadopodia proteins, cortactin and membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are expressed in ameloblastoma. *Histopathology*, 59(6): 1266-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03995.x>
24. Ren, X.L., Quiao, Y.D., Li, J.Y., Li, X.M., Zhang, D., Zhang, X.L., Zhu, X.H., Zhou, W.J., Shi, J., Wang, W., Liao, W.T., Ding, Y.Q., Liang, L., 2018. Cortactin recruits FMNL2 to promote actin polymerization and endosome motility in invadopodia formation. *Cancer Letters*, 419: 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.023>
25. Ribeiro, A.L.R., Costa, N.M.M., Siqueira, A.S., Silva, W.B., Kataoka, M.S.S., Jaeger, R.G., Alves-Junior, S.M., Smith, A.M., Pinheiro, J.J.V., 2016. Keratocystic odontogenic tumor overexpresses invadopodia-related proteins suggesting invadopodia formation.

Oral and maxillofacial pathology, 122(4): 500-8.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.06.004>

26. Saini, P., Courtneidge, S.A., 2018. Tks adaptor proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(1): jcs203661. <https://doi.org/10.1242/jcs.203661>
27. Siar, C.H., Rahman, Z.A.B.A., Tsujigiwa, H., Alblazi, K.M.O., Nagatsuka, H., Ng, K.H., 2016. Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma. *Oral pathology and medicine*, 45(8): 591-598. <https://doi.org/10.1111/jop.12417>
28. Shields, M.A., Dangi-Garimella, S., Redig, A.J., Munshi, H.G., 2012. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochemical Journal*, 441(2): 541-52. <https://doi.org/10.1042/BJ20111240>.
29. Stylli, S.S., Stacey, T.T.I., Kaye, A.H., Lock, P., 2012. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(3): 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.11.013>
30. Swayampakula, M., McDonald, P.C., Vallejo, M., Coyaud, E., Chafe, S.C., Westerback, A., Venkateswaran, G., Shankar, J., Gao, G., Laurent, E.M.N., Lou, Y., Bennewith, K.L., Supuran, C.T., Nabi, I.R., Raught, B., Dedhar, S., 2017. The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion. *Oncogene*, 36(45): 6244-6261. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.219>
31. Wang, L., Zhao, K., Ren, B., Zhu, M., Zhang, C., Zhao, P., Zhou, H., Chen, L., Yu, S., Yang, X., 2015. Expression of cortactin in human gliomas and its effect on migration and invasion of glioma cells. *Oncology Reports*, 34(4): 1815-24. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4156>
32. Yin, M., Ma, W., An, L., 2017. Cortactin in cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*, 8(50): 88232–88243. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.21088>
33. Wright, J.M., Vered, M., 2017. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial

Bone Tumors. Head and Neck Pathology, 11(1): 68-77. <https://doi.org/10.1007/s12105-017-0794-1>

ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão das proteínas TKS4, TKS5, MT1-MMP e cortactina relacionadas a formação de invadopódio e o processo de invasão no tumor odontogênico ameloblastoma

Pesquisador: JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80191417.8.0000.0018

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.462.441

Apresentação do Projeto:

O Ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico benigno de origem epitelial que apresenta crescimento lento, localmente invasivo e altas taxas de recorrência. O presente estudo será experimental e laboratorial e utilizará experimentos in vitro em linhagem celular anteriormente estabelecida. A partir desses experimentos, buscarão verificar a expressão de proteínas relacionadas ao processo de invasão do ameloblastoma.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a expressão de proteínas TKS4, TKS5, MT1-MMP e cortactina, relacionadas ao invadopódio e sua participação no processo de invasão do Ameloblastoma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos poderão ocorrer aos pesquisadores e para que 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.

Como benefício, a pesquisa envolvendo o Tumor Odontogênico Ameloblastoma, que possui altas taxas de prevalência e recidiva, poderá fornecer para a comunidade científica informações relevantes sobre a morfologia e comportamento deste Tumor, podendo promover o desenvolvimento de drogas e mecanismos ligados a diminuição dos prognósticos ruins que envolvem as neoplasias ligadas a cavidade oral e ao organismo como um todo.

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do 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



Continuação do Parecer: 2.462.441

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo de grande relevância para a odontologia e para a sociedade em geral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória, estão presentes e de acordo com a legislação vigente.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por apresentar todos os termos obrigatórios, por ter relevância social e estar de acordo com a Resolução 466/12, somos favoráveis à sua aprovação.

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_1002902.pdf	21/11/2017 13:06:32		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_isencao_onus_financieiro_CEP.pdf	21/11/2017 13:03:46	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_.pdf	25/09/2017 12:50:55	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_AME_CEP.pdf	23/09/2017 19:39:23	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	23/09/2017 19:35:00	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_aceite_orientador.pdf	23/09/2017 19:34:15	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_orientador.pdf	23/09/2017 19:33:55	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Consentimento_instituicao.pdf	23/09/2017 19:33:27	JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do 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



Continuação do Parecer: 2.462.441

Não

BELEM, 09 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)

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

ANEXO II: Trabalho elaborado e formatado conforme as normas do periódico científico *Experimental Cell Research*

Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/experimental-cell-research/0014-4827/guide-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 lower-case 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 plug-ins 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.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Virtual Microscope: The journal encourages authors to supplement in-article slide images with corresponding high resolution whole slide scans for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based slide viewer that enables users to view slide images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share high resolution versions of slides with their readers. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create slide scans for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed and contains conventional slide images.

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.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access

fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

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.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.