

Fernanda Marcello Scotti

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS NANOG, NESTIN E  $\beta$ -TUBULINA  
EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
LÁBIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia - Área de concentração em Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz

**Florianópolis  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scotti, Fernanda Marcello

Avaliação da presença de proteínas de células-tronco mesenquimais NANOG, NESTIN e B-tubulina em quelite actínica e carcinoma epidermoide de lábio / Fernanda Marcello Scotti ; orientador, Filipe Modolo Siqueira ; coorientadora, Michelle Tillmann Biz. - Florianópolis, SC, 2017.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Carcinogênese Labial. 3. Proteínas de células-tronco mesenquimais. 4. Células-tronco cancerosas. 5. Quelite actínica, Carcinoma Epidermoide de Lábio. I. Modolo Siqueira, Filipe. II. Tillmann Biz, Michelle. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Odontologia. IV. Título.

Fernanda Marcello Scotti

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS NANOG, NESTIN E  $\beta$ -  
TUBULINA EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2017.

---

Prof.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Filipe Modolo Siqueira, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Grasieli de Oliveira Ramos, Dr.<sup>a</sup>  
Membro  
Universidade do Oeste de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero, Dr.<sup>a</sup>  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Rogério de Oliveira Gondak, Dr.  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, meu namorado,  
Meus amigos e aos meus queridos professores.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por minha vida, minha família e amigos. Por permitir que eu tivesse saúde e força para superar todas as dificuldades e chegar até aqui, a conclusão da minha pós-graduação.

A esta Universidade, na qual deposito total confiança no mérito e ética presentes, que muito me orgulha, por seu corpo docente e discente que me deram a oportunidade de vivenciar esses dois anos de muito aprendizado.

Ao Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de tê-lo como meu orientador pela segunda vez; pelo suporte na elaboração da dissertação, por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos e por fazer-me acreditar no meu potencial.

À aluna de iniciação científica Verônica Mit Chagas por participar desse trabalho comigo.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero por aceitar participar da minha banca e por ter participado da minha graduação e pós-graduação de forma tão enriquecedora no meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak por aceitar fazer parte da minha banca e fazer parte da minha formação como mestre.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Grasieli de Oliveira Ramos por aceitar vir participar da minha banca como membro externo.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mabel Cordeiro por aceitar fazer parte da minha banca e por ter participado da minha graduação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz pela co-orientação no nosso trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Renata Goulart Castro por realizar a análise estatística.

Agradeço aos meus pais simplesmente por tudo que eu tenho e sou. Por estarem ao meu lado em todos os momentos, apoiarem-me e incentivarem minhas escolhas.

Agradeço ao meu namorado Gabriel por estar ao meu lado durante todos os momentos.

Aos meus amigos, obrigada a todos por fazerem parte da minha vida, em especial, minhas amigas Soraia, Cristine, Maievi.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.





## RESUMO

As células-tronco cancerosas (CTCs) foram observadas e isoladas em diversas lesões malignas com base na expressão de seus marcadores proteicos. Essas células estão associadas à iniciação e progressão tumoral, bem como, à resistência ao tratamento. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença das proteínas marcadoras de CTCs NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina, em queilite actínica (QA), carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e epitélio não neoplásico (ENN). Trinta casos de QA, trinta casos de CEL e 20 casos de ENN foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para avaliação das três proteínas. A imunomarcagem de NANOG foi significativamente mais presente em QA quando comparada com ENN (Núcleo  $p=0,007$ ; Citoplasma  $p=0,012$ ) e, na comparação entre os diferentes graus de displasia em QA, foi mais presente nos casos de alto risco (AR) segundo a classificação binária (Núcleo  $p=0,017$ ; Citoplasma  $p=0,044$ ). Já em CEL, sua expressão foi maior nos casos bem diferenciados (BD), sugerindo fortemente sua participação nas fases iniciais da carcinogênese. A expressão de NESTIN foi predominante citoplasmática e significativamente menos presente em ENN quando comparada com QA ( $p=0,001$ ) e com CEL ( $p=0,003$ ). Além disso, apresentou tendência a maior expressão em QA com displasia epitelial intensa (DEI) ou AG e CEL BD (sem significância estatística), fato que poderia sugerir a participação de NESTIN também nas fases iniciais da carcinogênese. A marcação de  $\beta$ -tubulina foi predominantemente citoplasmática e intensa em todas as lesões estudadas, sem relevância estatística. Os resultados sugerem a participação das proteínas marcadoras de CTCs NANOG e NESTIN no comportamento biológico de QA e CEL principalmente no desenvolvimento e transformação da lesão pré-maligna (QA) em maligna (CEL).

**Palavras-chave:** Imuno-histoquímica, Carcinoma de células escamosas, Queilite, Nestina, Células-tronco.



## ABSTRACT

Cancer stem cells have been observed and isolated in several malignant lesions based on the expression of their protein markers. These cells are associated with tumor initiation and progression as well as resistance to treatment. In this study we investigated the presence of cancer stem cells protein markers NANOG, NESTIN and  $\beta$ -tubulin in actinic cheilitis (AC), lip squamous cell carcinoma (LSCC) and non-neoplastic epithelium (NNE). Thirty cases of AC, thirty cases of LSCC and twenty cases of NNE were submitted to the immunohistochemical protocol to evaluate the presence of the three proteins. Immunostaining of NANOG was significantly higher in AC when compared to NNE and (Nucleus  $p=0,007$ ; Cytoplasm  $p=0,012$ ), when comparing different degrees of dysplasia in AC, it was more present in high grade cases, according to the binary classification (Nucleus  $p=0,017$ ; Cytoplasm  $p=0,044$ ). In LSCC, its expression was higher in well differentiated cases, strongly suggesting its participation in the early stages of carcinogenesis. The expression of NESTIN was predominantly cytoplasmic and significantly less present in NNE when compared to AC ( $p=0,001$ ) and LSCC ( $p=0,003$ ). In addition, there was a trend of higher expression in intense epithelial dysplasia or high grade AC and well differentiated LSCC (without statistical significance), which could suggest a participation of NESTIN also in the early stages of carcinogenesis. The labeling of  $\beta$ -tubulin was predominantly cytoplasmic and intense in all studied lesions, with no statistical relevance. The results suggest the participation of NANOG and NESTIN in the biological behavior of AC and LSCC, mainly in the development and transformation of premalignant (AC) to malignant (LSCC) lesions.

**Keywords:** Immunohistochemistry, Squamous cell carcinoma, Cheilitis, Nestin, Stem cell.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão de NANOG, NESTIN e $\beta$ -TUBULINA em mucocele, queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio (400X).....	49
---	----



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Anticorpos utilizados.....	39
---------------------------------------	----





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Expressão imuno-histoquímica para NANOG, NESTIN e $\beta$ -tubulina nas lesões estudadas.....	42
Tabela 2 - Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de displasia epitelial segundo a OMS em QA.....	43
Tabela 3 - Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de displasia epitelial segundo a classificação binária em QA.....	44
Tabela 4 - Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de diferenciação histopatológica em CEL.....	45



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QA – Queilite actínica  
AC – Actinic Cheilitis  
CEL – Carcinoma epidermoide de lábio  
LSCC – Lip Squamous Cell Carcinoma  
UV – Ultravioleta  
CEB – Carcinoma epidermoide bucal  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
DEL – Displasia epitelial leve  
DEM – Displasia epitelial moderada  
DEI – Displasia epitelial intensa  
CTH – Célula-tronco hematopoiética  
CTC – Células-tronco cancerosas  
CTM – Células-tronco mesenquimais  
BD – Bem diferenciado  
PD – Pouco diferenciado  
MD – Moderadamente diferenciado  
AR – Alto risco  
BR – Baixo risco  
LPB – Laboratório de Patologia Bucal  
TEM – Transição epitélio-mesênquima  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
HU – Hospital Universitário  
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
ENN – Epitélio não neoplásico  
HE – Hematoxilina e Eosina  
IFP – Proteína de filamento intermediário  
PBS – Tampão Fosfato Salina  
DAB – Diaminobenzidina  
TA – Temperatura ambiente  
pH – Potencial hidrogênico  
DP – Desvio-padrão



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

$\mu$  – Micro

% – Porcento

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio

$\mu\text{m}$  – Micrometro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1	QUEILITE ACTÍNICA.....	25
1.2	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO.....	26
1.3	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	28
1.4	CÉLULAS TRONCO CANCEROSAS.....	29
1.4.1	NANOG.....	29
1.4.2	NESTIN.....	30
1.4.3	$\beta$ -TUBULINA.....	31
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	35
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
	<b>APÊNDICES</b> .....	71
	APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA.....	71
	<b>ANEXOS</b> .....	75
	ANEXO A - TERMO COSUBSTANCIADO DO CEPESH.....	75
	ANEXO B - GUIA DE INFORMAÇÕES AO AUTOR.....	79





## INTRODUÇÃO

### 1.1 QUEILITE ACTÍNICA

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de crescimento celular desordenado e de transformar-se em câncer, resultante da exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Silverman *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2012). Acomete mais frequentemente o lábio inferior de homens de pele clara com idade entre sexta a sétima décadas de vida, uma vez que os danos causados pela radiação UV são acumulativos (Kaugars *et al.*, 1999; Cavalcante *et al.*, 2008). Esta lesão é semelhante à queratose actínica, doença cutânea potencialmente malignizável também relacionada à exposição crônica e excessiva à radiação UV (Neville *et al.*, 2009). No entanto, a epiderme, por possuir melanina e espessa camada de queratina, proporciona uma proteção natural contra os efeitos nocivos da radiação UV, já o lábio, por ser semimucosa, apresenta camada córnea mais delgada e menor quantidade de melanina quando comparado à pele, o que faz com que seja mais vulnerável aos efeitos nocivos da radiação UV (Vieira *et al.*, 2012).

A exposição crônica à radiação UV pode levar a alterações genótípicas e fenotípicas das células epiteliais, genericamente chamadas de atipias ou displasias epiteliais, que podem ser consideradas alterações pré-malignas por estarem associadas a um aumento de 10 a 20% do risco para desenvolvimento do carcinoma epidermoide (Dos Santos *et al.*, 2003). Dentre estas alterações, destacam-se as alterações no ciclo celular e nos mecanismos de apoptose (Ouhitit *et al.*, 2000).

O diagnóstico da QA é baseado em achados clínicos e histopatológicos. Clinicamente, a lesão caracteriza-se por atrofia e ressecamento da semimucosa labial, escurecimento ou perda da nitidez da linha mucocutânea, descamação constante e até a formação de ulcerações (Neville e Day, 2002; Markopoulos *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2008). Histologicamente é caracterizada por um epitélio de revestimento atrófico ou acantótico, hiperkeratótico e podendo apresentar graus variados de displasia epitelial. A lâmina própria mostra degeneração basofílica do colágeno induzida pela radiação UV e, comumente, observa-se um infiltrado inflamatório crônico adjacente ao epitélio displásico (Markopoulos *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2004; Neville *et al.*, 2009).

De acordo com Kaugars et al. (1999) é essencial que o grau de displasia epitelial seja determinado juntamente com o diagnóstico histopatológico da QA (Kaugars *et al.*, 1999). Segundo a classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS- 2005), as displasias epiteliais são caracterizadas tanto pelo seu aspecto citológico quanto arquitetural e, quando presentes em um epitélio alterado, podem ser classificadas em displasia leve (DEL), displasia moderada (DEM) e displasia intensa (DEI) (Barnes *et al.*, 2005; Argyris *et al.*, 2015). Além da classificação da OMS, pode ser utilizada a classificação binária, que classifica as displasias em dois grupos: alto risco (AR), quando se observa pelo menos quadro mudanças arquiteturais e cinco alterações citológicas e baixo risco (BR), quando se observa menos de quatro mudanças arquiteturais ou menos do que cinco alterações citológicas (Kujan, 2006). O tratamento da QA pode ser cirúrgico e não cirúrgico dependendo, principalmente, do grau de displasia. Os pacientes necessitam de um contínuo monitoramento clínico e de educação em relação à proteção de seus lábios dos danos provenientes da exposição à radiação UV (Kaugars *et al.*, 1999).

## 1.2 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE LÁBIO

O Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer, por meio da publicação “Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil” informa que a última estimativa mundial sobre o câncer de boca, feita para o ano de 2012, apontou cerca de 300 mil novos casos e 145 mil óbitos. Já para o Brasil, estimou-se em 2016 a ocorrência de 15.490 casos novos de câncer, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres e mostra que o câncer bucal é o quinto tipo de câncer mais prevalente entre os homens e o décimo segundo mais prevalente entre as mulheres (Instituto Nacional do Câncer, Brasil, 2015).

O carcinoma epidermoide de lábio (CEL) corresponde a 25-30% desses casos (Luna-Ortiz et al., 2004). É uma doença fortemente relacionada à exposição solar crônica e, por isso, apresenta grande relevância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação UV e elevada exposição populacional a essa radiação, tanto na área rural quanto urbana, devido principalmente à sua ocupação profissional (Prado e Passarelli, 2009; Sena et al., 2010).

Acredita-se que o CEL seja precedido pela QA e, por isso, o perfil do paciente seja parecido: normalmente homens de pele clara, com idade entre a 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> décadas de vida, sendo o lábio inferior mais acometido (Neville e Day, 2002; Luna-Ortiz *et al.*, 2004; Regezi *et al.*,

2008). As características clínicas desta enfermidade são variáveis, dependendo do estágio em que a lesão se encontra. As lesões geralmente são assintomáticas e aparece, inicialmente, sob a forma de uma úlcera crônica que não cicatriza ou como uma lesão exóftica que, ocasionalmente, possui uma natureza verrucosa (Antunes e Antunes, 2004; Silva *et al.*, 2006; Regezi *et al.*, 2008). Caracteriza-se, histologicamente, pela presença de cordões ou ilhas de células neoplásicas apresentando pleomorfismo nuclear e celular, hiper cromatismo nuclear, aumento no número de mitoses e mitoses atípicas, entre outras alterações. No estroma observa-se tecido conjuntivo denso exibindo degeneração basofílica do colágeno e infiltrado inflamatório crônico (Neville *et al.*, 2009).

Segundo a classificação histológica da OMS para os carcinomas epidermóides, esses podem ser graduados em bem diferenciados (BD), onde as células neoplásicas são muito similares ao epitélio de origem; pouco diferenciados (PD), onde o tecido neoplásico apresenta muitas alterações celulares e estruturais, tornando difícil identificação do tecido de origem; ou moderadamente diferenciados (MD), onde a neoplasia apresenta características entre esses dois extremos (Barnes *et al.*, 2005). A cirurgia, acompanhada ou não de radioterapia, continua a ser o padrão ouro de tratamento do CEL. Quando comparado com o carcinoma epidermoide intraoral, o prognóstico para o CEL é melhor (Neville e Day, 2002; Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2012).

### 1.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco são foco de diversas áreas da pesquisa biomédica. Segundo Huang *et al.* (2010), as células-tronco são pluripotentes e apresentam capacidade clonogênica, de auto-renovação, de diferenciação em tipos celulares dos tecidos em que residem e, muitas vezes, capacidade de trans-diferenciação. O potencial de trans-diferenciação (potencial de se especializar em determinados tipos celulares diferentes, independentemente da sua origem) e a capacidade de renovação e reparação de danos teciduais apresentadas pelas células-tronco, trazem-nas para o foco de interesse da biotecnologia e da clínica diária (Huang *et al.*, 2010).

Além das células-tronco hematopoiéticas (CTHs), a medula óssea também abriga um número reduzido de células-tronco mesenquimais (CTMs). Estas células são negativas para os marcadores CD14 e CD34 das CTHs e para o marcador de exclusão de CTH CD45 (Huang *et al.*, 2010). As CTMs estão presentes em diferentes tecidos do organismo

(Herrmann *et al.*, 2009). Apenas 0,001-0,01% das células mononucleares isoladas da medula óssea têm propriedades de CTM, mas a sua multipotência e a sua capacidade proliferativa *in vitro* tornaram-nas atrativas para novas abordagens terapêuticas, com o objetivo de alcançar a recuperação de tecidos danificados ou doentes (Sahlgren *et al.*, 2003).

Recentemente, estudos clínicos sugeriram que a transferência efetiva de CTM pode levar a benefícios terapêuticos em um número cada vez maior de doenças (Herrmann *et al.*, 2009). As CTM têm sido utilizadas em diversas terapias, incluindo o tratamento de hemofilia, osteogênese imperfeita, lesões de cartilagem, para acelerar a recuperação da hematopoese após quimioterapia/radioterapia, para evitar cicatrizes após infarto do miocárdio e para o tratamento de lesões neurais após acidente vascular cerebral ou trauma (Huang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Devido a aplicações terapêuticas promissoras dessas células-tronco adultas multipotentes, uma série de estudos clínicos envolvendo CTMs está atualmente em curso (Huang *et al.*, 2010).

As mesmas qualidades que tornam as células-tronco valiosas na medicina regenerativa, na engenharia tecidual e na biotecnologia também carregam riscos para o organismo do hospedeiro. As mutações que afetam o seu potencial de diferenciação combinado com a falta de controle da sua capacidade proliferativa ilimitada podem transformá-las em "células-tronco cancerosas" (CTCs) (Huang *et al.*, 2010).

#### 1.4 CÉLULAS-TROCO CANCEROSAS

Acredita-se que as células-tronco cancerosas (CTCs) desempenhem um papel crucial no processo de iniciação da neoplasia, modulação do microambiente neoplásico, apoptose e senescência celular (Reya e Clevers, 2005; Costea *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Diversos estudos atribuem às CTCs papéis fundamentais na progressão e na invasão do câncer, na resistência à quimioterapia, na recorrência após terapia e na ocorrência de metástases à distância (Zhang *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2014). Estudos recentes identificaram CTCs em um grupo heterogêneo de neoplasias, incluindo o câncer bucal, e caracterizaram-nas como um dos fatores responsáveis pela reincidência dessas lesões, mesmo depois da realização do tratamento adequado, e também pela alta morbidade e mortalidade de pacientes portadores das mesmas (Reya e Clevers, 2005; Costea *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

CTCs bucais podem surgir a partir de células-tronco epiteliais adultas, células progenitoras ou por meio da desdiferenciação de células maduras (Sinha et al., 2013). Segundo Sinha et al. (2013), as mutações nos oncogenes presentes em neoplasias malignas bucais podem conduzir ao processo de desdiferenciação seguido por auto-renovação das células em proliferação (Sinha et al., 2013). Assim, o crescimento e a propagação do câncer bucal seriam impulsionados por CTCs capazes de auto-renovação e geração de populações de células tumorais fenotipicamente diversificadas (Reya e Clevers, 2005). Populações de CTCs presentes em cânceres bucais apresentaram regulação positiva para alguns genes relacionados com células-tronco, como o NANOG, OCT 3/4, NESTIN, CK19, BMI-1, CD117 (c-kit), CD44 e CD133 (Zhang et al., 2009).

#### 1.4.1 NANOG

O NANOG é uma proteína que exerce papel de fator de transcrição e está expressa em células-tronco embrionárias e superexpressa durante o desenvolvimento neoplásico (Watanabe *et al.*, 2014). O NANOG tem se mostrado importante em vários tipos de neoplasias, entre elas, o câncer de boca (Chiou *et al.*, 2008), pois possui um papel significativo na manutenção da diferenciação e na proliferação celular, tanto em células indiferenciadas do carcinoma epidermoide bucal (CEB), como em CTCs (Watanabe *et al.*, 2014).

Watanabe et al. (2014) identificou sobre-expressão de NANOG em CEB pouco diferenciado e em células neoplásicas não diferenciadas presentes na periferia de CEB bem diferenciados (Watanabe *et al.*, 2014). A imunofluorescência mostrou que as linhagens celulares de CEB apresentaram expressão uniforme de NANOG (Watanabe *et al.*, 2014). Tais resultados indicam que o NANOG é expresso não apenas em CTCs, mas também em grande proporção de células do CEB que são indiferenciadas e com alta taxa de proliferação (Watanabe *et al.*, 2014).

A expressão de NANOG também está positivamente associada à resistência à quimioterapia (Izumiya *et al.*, 2012). Tsai et al. (2011) sugere que o aumento da expressão dos marcadores de pluripotencialidade como o NANOG esteja associado a quimiorresistência à cisplatina em pacientes com CEB (Tsai *et al.*, 2011). Dados de RT-PCR e Western blotting demonstraram que os genes "stemness" (NANOG, OCT4, BMI1 E NESTIN) foram ativados de forma significativa e resultaram em elevada expressão proteica em

células da mucosa bucal de pacientes com câncer resistente à cisplatina (Ledesma-Montes *et al.*, 2008).

Segundo Watanabe *et al.* (2014) os focos metastáticos de CEB presentes em linfonodos apresentaram expressão imuno-histoquímica extremamente elevada de NANOG, mesmo após a quimioterapia pré-operatória, indicando que as células neoplásicas NANOG-positivas sobreviveram e proliferaram (Watanabe *et al.*, 2014). Além disso, pacientes em que as células do foco primário de CEB não expressavam NANOG passaram a expressar NANOG em focos metastáticos, indicando que mesmo tumores NANOG-negativos podem conter um número pequeno de células de CEB indiferenciadas, assim como poucas CTCs (Watanabe *et al.*, 2014).

#### 1.4.2 NESTIN

NESTIN é um membro da família VI da classe de proteínas dos filamentos intermediários, primeiramente identificado como uma proteína expressa em células progenitoras do sistema nervoso central e periférico, e, posteriormente, em outros tecidos (Guérette *et al.*, 2007). NESTIN foi encontrado em células progenitoras de músculo esquelético, do coração, testículos, germe dentário, pelos, folículo capilar e vasos sanguíneos (Fröjdman *et al.*, 1997; Michalczyk e Ziman, 2005; Suzuki *et al.*, 2010).

NESTIN foi relacionada à invasão, metástase, controle de ciclo celular e apoptose em adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de pulmão através da regulação de proteínas do citoesqueleto de células-tronco (Ryuge *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2014). Também foi relacionada com o comportamento agressivo em câncer de mama, próstata e pâncreas e a sua presença é considerada um importante indicador de prognóstico independente de outros fatores clínicos e patológicos (Mangiola *et al.*, 2007). Em neuroblastomas, NESTIN interage com o DNA modulando o comportamento agressivo do tumor (Krupkova *et al.*, 2011).

O estudo de Chen *et al.* (2010) mostrou que amostras de câncer de pulmão NESTIN-positivas foram correlacionadas com pior comportamento da lesão e pior prognóstico para o paciente (Chen *et al.*, 2010). Da mesma forma, Zhong *et al.* (2014), mostraram que os pacientes portadores de carcinoma epidermoide de esôfago com células NESTIN-positivas tiveram um pior prognóstico, maior taxa de recorrência e metástase (Zhong *et al.*, 2014). Portanto, NESTIN

apresenta um importante valor prognóstico e sua regulação poderia ter aplicações terapêuticas no tratamento do câncer (Zhong et al., 2014).

### 1.4.3 $\beta$ -TUBULINA

O citoesqueleto é composto por um conjunto de filamentos intermediários, os filamentos de actina e os microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas poliméricas, onde os principais componentes são heterodímeros de  $\beta$ -tubulina. Esses dímeros são continuamente incorporados (polimerização) e liberados (despolimerização), tornando essas estruturas altamente dinâmicas, característica essencial para a função dos microtúbulos. Eles estão envolvidos na motilidade celular, transporte e manutenção da forma da célula, além disso, apresentam um papel crucial na fase de formação do fuso mitótico, que permite separar os cromossomos durante a divisão celular (Berrieman *et al.*, 2004).

A  $\beta$ -tubulina é composta por seis isotipos, os quais possuem sequências de aminoácidos similares. No entanto, regiões específicas de variabilidade foram identificadas nas sequências, incluindo a região carboxi-terminal extremo, que pode ser usada para agrupar os isotipos de  $\beta$ -tubulina em classes diferentes, classe I, II, III, IVA, IVB e VI. O isotipo de classe I é a  $\beta$ -tubulina geralmente expressa em células humanas e mais especificamente nas células dos carcinomas (Berrieman *et al.*, 2004).

A  $\beta$ -tubulina é um marcador de células mesenquimais (Huang et al., 2010). Durante a progressão neoplásica de carcinomas pode ocorrer a transição epitélio-mesênquima (TEM) (Onoue et al., 2006), um evento que confere às células epiteliais tumorais as características biológicas necessárias aos passos de invasão e metástas (Chiou *et al.*, 2010). Huang et al. (2010) afirma que o grau de diferenciação dos carcinomas epidermóides é altamente relacionado com a reorganização do citoesqueleto, conseqüentemente as diferenças na expressão da  $\beta$ -tubulina entre os graus de carcinoma epidermoide leva a crer que tal proteína seja um marcador molecular potencial ou ainda, alvo para aplicações de prognóstico, diagnóstico e tratamentos (Huang et al., 2010).

## JUSTIFICATIVA

Atualmente, decisões terapêuticas para o tratamento de câncer de boca fundamentam-se em parâmetros clínicos e patológicos, incluindo: idade do paciente, estadio TNM e o grau histológico do tumor. Contudo, esses fatores não distinguem de maneira precisa entre um tumor mais ou menos agressivo. Por isso, a identificação do perfil de CTCs presentes nessas lesões permitiria o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, contra antígenos específicos. Diante disso, o estudo de proteínas como NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina nas lesões malignas e potencialmente malignas de lábio é importante, visto que não existe na literatura indexada a análise de tais proteínas nessas doenças.



## OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de proteínas de células-tronco mesenquimias em QA e CEL diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina por meio da análise imuno-histoquímica dos marcadores celulares NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as QAs de acordo com seus graus de displasia epitelial e CEL de acordo com seus graus de diferenciação;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina em QAs, CELs e ENN, evidenciando o local e frequência desta expressão;
- Relacionar o grau de displasia epitelial das QAs com a expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares estudados;
- Relacionar o grau de diferenciação histológica dos CELs com a expressão imuno-histoquímica dos marcadores celulares estudados;
- Comparar a expressão dos marcadores celulares em estudo entre as QAs, CELs e ENN;



## ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Oral Oncology* (ANEXO B), com exceção do idioma e do formato das referências.

### TÍTULO

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NANOG, NESTIN E  $\beta$ -TUBULINA EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

### RESUMO

**Objetivo:** Investigar a presença das proteínas marcadoras de CTCs NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina, em queilite actínica (QA), carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e epitélio não neoplásico (ENN).

**Materiais e métodos:** Trinta casos de QA, trinta casos de CEL e vinte casos de ENN foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para avaliação das três proteínas.

**Resultados:** A imunomarcagem de NANOG foi significativamente mais presente em QA quando comparado com o ENN e na comparação entre os diferentes graus de displasia em QA foi mais presente nos casos de alto risco (AR) segundo a classificação binária. Já em CEL, sua expressão foi maior nos casos bem diferenciados (BD), sugerindo fortemente sua participação nas fases iniciais da carcinogênese. A expressão de NESTIN foi predominante citoplasmática e significativamente menos presente no ENN quando comparada com QA e com CEL. Além disso, apresentou tendência a maior expressão em QA com displasia epitelial intensa (DEI) ou AG e CEL BD (sem significância estatística), fato que poderia sugerir a participação de NESTIN também nas fases iniciais da carcinogênese. A marcação de  $\beta$ -tubulina foi predominantemente citoplasmática e intensa em todas as lesões estudadas, sem relevância estatística.

**Conclusão:** Os resultados sugerem a participação das proteínas marcadoras de células-tronco mesenquimais (CTMs) NANOG e NESTIN no comportamento biológico de QA e CEL principalmente no desenvolvimento e transformação da lesão pré-maligna (QA) em maligna (CEL).

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, Carcinoma Epidermoide, Queilite, Nestin, Células-tronco cancerosas.

## INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de crescimento celular desordenado e de transformar-se em câncer, resultante da exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV). Tal exposição pode levar a alterações genotípicas e fenotípicas das células epiteliais, essas conhecidas como alterações displásicas, que podem resultar em um potencial aumentado de 10 a 20% para desenvolvimento de carcinoma epidermoide (Dos Santos *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2012).

O carcinoma epidermoide de lábio (CEL) é uma doença fortemente relacionada à exposição solar crônica e, por isso, apresenta grande relevância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação UV e elevada exposição populacional a essa radiação, tanto na área rural quanto urbana, devido, principalmente, à sua ocupação profissional (Prado e Passarelli, 2009; Sena *et al.*, 2010).

Acredita-se que as células-tronco cancerosas (CTCs) desempenhem um papel crucial no processo de iniciação da neoplasia, modulação do microambiente neoplásico, apoptose e senescência celular (Reya e Clevers, 2005; Costea *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Diversos estudos atribuem às CTCs papéis fundamentais na progressão e na invasão do câncer, na resistência à quimioterapia, na recorrência após terapia e na ocorrência de metástases à distância (Zhang *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2014). Estudos recentes identificaram CTCs em um grupo heterogêneo de neoplasias, incluindo o carcinoma epidermoide bucal (CEB) e caracterizaram-nas como um dos fatores responsáveis pela reincidência dessas lesões, mesmo depois da realização do tratamento adequado e também pela alta morbidade e mortalidade de pacientes portadores das mesmas (Reya e Clevers, 2005; Costea *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

Assim, o crescimento e a propagação do CEB seriam impulsionados por CTCs capazes de auto-renovação e geração de populações de células tumorais fenotipicamente diversificadas (Reya e Clevers, 2005). Populações de CTCs presentes em CEBs apresentaram regulação positiva para alguns genes relacionados com células-tronco, como o NANOG, OCT 3/4, NESTIN, CK19, BMI-1, CD117 (c-kit), CD44 e CD133 (Zhang *et al.*, 2009).

O NANOG é uma proteína que exerce papel de fator de transcrição e está expressa em células-tronco embrionárias e superexpressa durante o desenvolvimento neoplásico (Watanabe *et al.*,

2014). Ainda, possui um papel significativo na manutenção da diferenciação e na proliferação celular, tanto em células indiferenciadas do CEB, como em CTCs (Watanabe *et al.*, 2014). Watanabe *et al.* (2014) identificou sobre-expressão de NANOG em CEBs pouco diferenciado e em células neoplásicas não diferenciadas presentes na periferia de CEBs bem diferenciados (Watanabe *et al.*, 2014).

NESTIN é um membro da família VI da classe de proteínas dos filamentos intermediários (Guérette *et al.*, 2007). Essa proteína foi relacionada à invasão, metástase, controle de ciclo celular e apoptose em adenocarcinoma ductal pancreático e adenocarcinoma de pulmão através da regulação de proteínas do citoesqueleto de células-tronco (Ryuge *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2014). Também foi relacionada com o comportamento agressivo em câncer de mama, próstata e pâncreas e a sua presença é considerada um importante indicador de prognóstico independente de outros fatores clínicos e patológicos (Mangiola *et al.*, 2007). Portanto, NESTIN apresenta um importante valor prognóstico e sua regulação poderia ter aplicações terapêuticas no tratamento do câncer (Zhong *et al.*, 2014).

A  $\beta$ -tubulina é um marcador de células mesenquimais (Huang *et al.*, 2010). Durante a progressão neoplásica de carcinomas pode ocorrer a transição epitélio-mesênquima (TEM) (Onoue *et al.*, 2006), um evento que confere às células epiteliais neoplásicas as características biológicas necessárias aos passos de invasão e metástase da progressão tumoral (Chiou *et al.*, 2010). Huang *et al.* (2010), no seu estudo, afirmam que o grau de diferenciação dos carcinomas epidermoides é altamente relacionado com a reorganização do citoesqueleto, por conseguinte, o aumento na expressão da  $\beta$ -tubulina entre os diferentes graus de carcinoma epidermoide leva a crer que estas proteínas sejam marcadores moleculares potenciais ou ainda, alvos para aplicações de prognóstico, diagnóstico e tratamentos (Huang *et al.*, 2010).

Atualmente, decisões terapêuticas para o tratamento de câncer de boca fundamentam-se em parâmetros clínicos e histopatológicos, incluindo: idade do paciente, estadió TNM e o grau histológico do tumor. Contudo, estes fatores não distinguem de maneira precisa entre um tumor mais ou menos agressivo. Por isso, a identificação do perfil de CTCs presentes nessas lesões permitiria o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, contra antígenos específicos. Assim sendo, este trabalho avaliou a presença e distribuição das proteínas de CTCs em carcinomas epidermoides de lábio (lesão maligna), em queilites actínicas (lesão potencialmente malignizável) e em epitélio não neoplásico (lesão não neoplásica) por meio da análise imuno-

histoquímica das proteínas NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina. É importante destacar que não existe na literatura indexada a análise de tais proteínas nessas doenças.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção da amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o CAAE 45349215.0.0000.0121. As amostras foram selecionadas a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC e divididas em: QA, composto por 30 casos de queilite actínica; CEL, composto por 30 casos de carcinoma epidermoide de lábio; e ENN, contendo 20 casos de biópsias oriundas de mucocele que continham revestimento epitelial, como fonte de epitélio não neoplásico. A utilização de mucoceles ocorreu devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio normal.

### Análise histológica

As lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram analisadas simultaneamente por três examinadores, em consenso, para determinação do grau de displasia epitelial nas QAs e grau de diferenciação histopatológica dos CELs, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS e pela classificação binária (Barnes *et al.*, 2005; Kujan *et al.*, 2006). As displasias epiteliais em QA foram classificadas em leves quando a presença de alterações displásicas se restringia somente ao terço inferior do epitélio; moderadas, quando estas alterações eram encontradas até o terço médio; e intensas, quando as alterações displásicas ultrapassavam o terço médio e estendiam-se ao terço superior (Barnes *et al.*, 2005). Além da classificação da OMS, foi utilizada a classificação binária que classifica a QA em dois grupos, alto risco (AR), quando se observa pelo menos quatro mudanças arquiteturais e cinco alterações citológicas e baixo risco (BR), quando se observa menos de quatro mudanças arquiteturais ou menos do que cinco alterações citológicas (Kujan, 2006). Os CEL foram classificados em bem diferenciados (BD), lesão muito similar ao seu epitélio de origem, pouco diferenciados (PD), uma lesão em que predominam células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima

ceratinização, tornando muitas vezes, difícil identificar seu tecido de origem ou moderadamente diferenciados (MD), com características entre esses dois extremos (Barnes *et al.*, 2005).

### Imuno-histoquímica

As amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método do polímero marcado-HRP. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1) e o controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário. Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro silanizadas (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Foi realizada a desparafinização e reidratação dos cortes, seguidas de imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato 0,01M a 96°C. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado pela incubação dos cortes em solução de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salina (PBS), por 40 minutos. A incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), overnight.

A seguir foi utilizado o EnVision (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário sem diluição. As lâminas então foram coradas com solução cromógena DAB (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e contra coradas com Hematoxilina de Harris. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle Positivo</b>
<b>NANOG</b>	hNANO G.2	eBioscience	1:100	<b>Carcinoma epidermoide</b>
<b>NESTIN</b>	Rat-401 (Rat401 (4D4))	eBioscience	1:50	<b>Carcinoma epidermoide</b>
<b>β-tubulina</b>	DB1B	Ingenex	1:100	<b>Pulmão</b>

Quadro 1: Anticorpos utilizados

Análise das reações de imuno-histoquímica

As lâminas tiveram sua identificação mascarada, de forma que a avaliação das reações foi realizada por um examinador às cegas e calibrado ( $Kappa > 0,8$ ) que utilizou o software NIH ImageJ 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Foram obtidas, por meio de câmera fotográfica (Cannon, A620, San Jose, CA, EUA) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), 5 imagens equidistantes do epitélio de cada caso, com magnitude de 400X.

A avaliação para o NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina deu-se pela análise quantitativa da coloração castanha no citoplasma e/ou núcleo das células epiteliais. Em cada um dos casos, independentemente do diagnóstico, foram fotografados 5 campos equidistantes do epitélio. A partir desses campos fotografados, para cada anticorpo foram contadas as células positivas (núcleo e citoplasma) e o total de células em tecido epitelial.

#### Análise estatística

Foi realizada a estatística descritiva para cada variável analisada e a comparação da expressão dessas variáveis entre os grupos analisados QA, CEL e ENN por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando o software SPSS® versão 11 (SPSS Inc., Headquarters, EUA). Foi realizada análise de variância, os resíduos não apresentaram distribuição normal (teste Shapiro-wilk), optando-se então por testes não-paramétricos. Ainda, para correlacionar a marcação das proteínas com as classificações de QA e CEL, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas  $\pm$  desvio-padrão (DP). Considerou-se valor de  $p < 0,05$  para dados com significância estatística.



## RESULTADOS

Os casos de QA exibiam revestimento epitelial ora acantótico, ora atrófico e com graus de displasia determinados de acordo com a classificação da OMS (Barnes *et al.*, 2005) e da classificação Binária (Kujan *et al.*, 2006). A lâmina própria exibiu graus variados de degeneração basofílica do colágeno e inflamação. Os casos de CEL estudados foram compostos tanto por lesões em que o parênquima ainda permanecia revestindo a mucosa, como por casos em que a úlcera estava consolidada e a maior parte do epitélio transformado encontrava-se disposto em ilhas e cordões que invadiam o tecido conjuntivo adjacente. O grau de diferenciação da lesão foi determinado de acordo com a classificação da OMS (Barnes *et al.*, 2005).

Os resultados estão apresentados nas tabelas 1, 2 3 e 4.

Tabela 1. Expressão imuno-histoquímica para NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina em QA, CEL e ENN.

<b>Proteína</b>		<b>ENN (n=20)</b>	<b>QA (n=30)</b>	<b>CEL (n=30)</b>
<b>NANOG</b>	<b>Núcleo</b>	10,09% ( $\pm 17,35$ ) <sup>a</sup>	25,37% ( $\pm 26,26$ ) <sup>a</sup>	14,67% ( $\pm 17,26$ )
	<b>Citoplasma</b>	14,48% ( $\pm 20,89$ ) <sup>a</sup>	38,72% ( $\pm 31,38$ ) <sup>a</sup>	25,56% ( $\pm 28,21$ )
<b>NESTIN</b>	<b>Citoplasma</b>	21,26 ( $\pm 28,26$ ) <sup>a,c</sup>	37,76% ( $\pm 25,64$ ) <sup>a</sup>	32,91% ( $\pm 24,74$ ) <sup>c</sup>
<b>B-TUBULINA</b>	<b>Citoplasma</b>	78,35% ( $\pm 32,37$ )	91,71% ( $\pm 9,42$ )	85,24% ( $\pm 18,16$ )

ENN: epitélio não neoplásico; QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermoide de lábio.

<sup>a</sup> Relação entre ENN e QA com  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Relação entre QA e CEL com  $p < 0,05$ .

<sup>c</sup> Relação entre ENN e CEL com  $p < 0,05$

Valores expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (%).

Tabela 2. Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de displasia epitelial segundo a OMS em QA.

<b>Proteína</b>		<b>DEL (n=9)</b>	<b>DEM (n=14)</b>	<b>DEI (n=7)</b>
<b>NANOG</b>	<b>Núcleo</b>	16,63% ( $\pm$ 30,44)	28,20% ( $\pm$ 22,58)	30,91% ( $\pm$ 28,69)
	<b>Citoplasma</b>	24,02% ( $\pm$ 30,24)	46,59% ( $\pm$ 30,48)	41,89% ( $\pm$ 32,36)
<b>NESTIN</b>	<b>Citoplasma</b>	35,07% ( $\pm$ 18,78)	30,90% ( $\pm$ 27,71)	54,96% ( $\pm$ 24,03)
<b>B-TUBULINA</b>	<b>Citoplasma</b>	96,72% ( $\pm$ 3,66)	90,77% ( $\pm$ 9,47)	87,17% ( $\pm$ 12,37)

QA: queilite actínica; DEL: displasia epitelial leve; DEM: displasia epitelial moderada; DEI: displasia epitelial intensa. Valores expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (%).

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de displasia epitelial segundo a classificação binária em QA.

<b>Proteína</b>		<b>BR (n=10)</b>	<b>AR (n=20)</b>
<b>NANOG</b>	<b>Núcleo</b>	12,94% ( $\pm 20$ ) <sup>a</sup>	31,58% ( $\pm 27,22$ ) <sup>a</sup>
	<b>Citoplasma</b>	22,85% ( $\pm 22,74$ ) <sup>a</sup>	46,66% ( $\pm 32,54$ ) <sup>a</sup>
<b>NESTIN</b>	<b>Citoplasma</b>	36,99% ( $\pm 20,08$ )	38,15% ( $\pm 27,77$ )
<b>B-TUBULINA</b>	<b>Citoplasma</b>	93,39% ( $\pm 7,75$ )	90,87% ( $\pm 10,24$ )

QA: queilite actínica; BR: baixo risco; AR: alto risco.

<sup>a</sup> Relação entre BG e AG com  $p < 0,05$ .

Valores expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (%).

Tabela 4. Expressão imuno-histoquímica de NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina de acordo com o grau de diferenciação histopatológica em CEL.

<b>Proteína</b>		<b>BD (n=11)</b>	<b>MD (n=10)</b>	<b>PD (n=9)</b>
<b>NANOG</b>	<b>Núcleo</b>	21,17% ( $\pm$ 17,22)	5,97% ( $\pm$ 9,81)	16,39% ( $\pm$ 21,09)
	<b>Citoplasma</b>	37,45% ( $\pm$ 29,40)	15,75% ( $\pm$ 29)	21,93% ( $\pm$ 22,99)
<b>NESTIN</b>	<b>Citoplasma</b>	38,97% ( $\pm$ 26,73)	27,21% ( $\pm$ 21,70)	31,84% ( $\pm$ 26,54)
<b>B-TUBULINA</b>	<b>Citoplasma</b>	84,52% ( $\pm$ 20,07)	83,37% ( $\pm$ 16,76)	88,20% ( $\pm$ 19,01)

CEL: carcinoma epidermoide de lábio; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado. Valores expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (%).

A análise da média de células com núcleos e citoplasmas positivos nos três grupos estudados pode ser observada na Tabela 1. A análise dos casos estudados para determinação do grau de displasia epitelial nas QA segundo a OMS (Barnes *et al.*, 2005) resultou em 9 casos de QA apresentando displasia epitelial leve (DEL), 14 apresentando displasia epitelial moderada (DEM) e 7 apresentando displasia epitelial intensa (DEI) (Tabela 2). Já no caso da classificação binária (Kujan *et al.*, 2006), 10 casos foram classificados como baixo grau (BG) e 20 casos como alto risco (AR) (Tabela 3).

A classificação do grau de diferenciação histopatológica dos CEL estudados, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (Barnes *et al.*, 2005), resultou em 11 casos bem diferenciados (BD), 10 casos moderadamente diferenciados (MD) e 9 casos pouco diferenciados (PD) (Tabela 4).

## NANOG

A imunomarcção epitelial para o NANOG em ENN e QA foi heterogênea, predominante em terço médio e inferior, com marcação citoplasmática e nuclear. Para os CEL, a marcação também se comportou de maneira heterogênea; estando presente, principalmente, na porção central das ilhas e áreas de invasão, com marcação predominantemente fraca (Figura 1).

Observou-se imunomarcção nuclear para o NANOG em 10,09% ( $\pm 17,35$ ) das células epiteliais das ENN, 25,37% ( $\pm 26,26$ ) das células das QAs e 14,67% ( $\pm 17,26$ ) das células neoplásicas dos CEL, tendo relevância estatística somente quando comparado MUC com QA ( $p=0,007$ ). Já a imunomarcção citoplasmática do NANOG nas células epiteliais em MUC foi de 14,48% ( $\pm 20,89$ ), em QA 38,72% ( $\pm 31,38$ ) e em CEL 25,56% (28,21), sendo relevante estatisticamente somente quando comparado QA com ENN ( $p=0,012$ ) (Tabela 1). Nos casos de CEL que mostravam áreas de QA na periferia dos cortes, observou-se que havia um decréscimo da presença e intensidade de marcação na transição da QA para o CEL.

Ao avaliar a expressão nuclear de NANOG observou-se que os casos de DEL apresentaram média de 16,63% ( $\pm 30,44$ ), seguida pelos casos de DEM, com 28,20% ( $\pm 22,58$ ), e DEI, com 30,91,89% ( $\pm 28,69$ ) (Tabela 2). Ainda, a expressão citoplasmática de NANOG nos diferentes graus de displasia de QAs de acordo com a classificação da OMS, pôde-se observar que os casos de DEL apresentaram média de 24,02%

( $\pm 30,24$ ) de células marcadas, seguido pelos casos de DEM que apresentaram 46,59% ( $\pm 30,48$ ), e DEI, com 41,89% ( $\pm 32,36$ ) (Tabela 2).

Para os diferentes graus de displasia de QA segundo a classificação binária, a expressão nuclear foi de 12,94% ( $\pm 20$ ) para BG e 31,58% ( $\pm 27,22$ ) para AG. Já na citoplasmática foi de 22,85% ( $\pm 22,74$ ) para BG e 46,66% ( $\pm 32,54$ ) para AG. Para ambos os grupos foi observado diferença estatística, tanto na marcação nuclear ( $p=0,017$ ), quanto na marcação citoplasmática ( $p=0,044$ ).

Já no caso dos diferentes graus de diferenciação histológica dos CELs observou-se que a expressão nuclear de NANOG nos diferentes graus de diferenciação histológica nos CELs observou-se que 21,17% ( $\pm 17,22$ ) dos núcleos eram positivos nos casos de CEL BD, 5,97% ( $\pm 9,81$ ) nos casos de CEL MD e 16,39% ( $\pm 21,09$ ) nos casos de CEL PD. (Tabela 4). Mostrando que houve quantitativamente maior marcação nos casos bem diferenciados. Além disso, 37,45% ( $\pm 29,40$ ) dos citoplasmas das células epiteliais eram positivas em BD, 15,75% ( $\pm 29$ ) em MD e 21,93% ( $\pm 22,99$ ) em PD (Tabela 4). Mostrando que houve quantitativamente maior marcação nos casos bem diferenciados.

## NESTIN

A imunomarcação para o NESTIN apresentou-se de maneira homogênea entre os terços do epitélio de ENN e QA, sendo predominantemente citoplasmática, e mais evidente no terço médio em QA. Em relação ao CEL, a marcação foi mais evidente nas células centrais das ilhas e cordões e menos evidente nas células basais/periféricas, principalmente nas áreas de invasão.

Observou-se imunomarcação citoplasmática para o NESTIN no ENN apresentando 21,26% ( $\pm 28,26$ ) de células positivas enquanto QA e CEL apresentaram 37,76% ( $\pm 25,64$ ) e 32,91% ( $\pm 24,74$ ), respectivamente, com relevância estatística quando comparado CEL com ENN ( $p=0,003$ ) e QA com ENN ( $p=0,001$ ) (Tabela 1).

Ao avaliar a expressão citoplasmática de NESTIN nos diferentes graus de displasia de QAs de acordo com a classificação da OMS pôde-se observar que os casos de DEL apresentaram média de 35,07% ( $\pm 18,78$ ) de células marcadas, seguidos pelos casos de displasias moderada que apresentaram 30,90% ( $\pm 27,71$ ), e DEI, com 54,96% ( $\pm 24,03$ ). Apesar da ausência de significância estatística, nota-se a predominância da marcação nuclear e citoplasmática nos casos mais severos.

Para os diferentes graus de displasia em QA segundo a classificação binária, a expressão citoplasmática foi de 36,99% ( $\pm 20,08$ ) nos casos de BG e 38,15% ( $\pm 27,77$ ) nos casos de AG.

Para os diferentes graus de diferenciação histológica dos CELs observou-se, 38,97% ( $\pm 26,73$ ) dos citoplasmas das células epiteliais eram positivas nos casos BD, 27,21% ( $\pm 21,70$ ) nos casos MD e 31,84% ( $\pm 26,54$ ) nos casos PD.

### $\beta$ -TUBULINA

A imunomarcção para a  $\beta$ -tubulina foi intensa e homogeneamente distribuída no epitélio da maioria dos casos de ENN e QA e no parênquima dos CEL, com marcação predominantemente citoplasmática.

Observou-se imunomarcção citoplasmática de  $\beta$ -tubulina no ENN com média de 78,35% ( $\pm 32,37$ ) de células positivas, em QA 91,71% ( $\pm 9,42$ ) e em CEL, 85,24% ( $\pm 18,16$ ) (Tabela 1).

Ao avaliar a expressão de  $\beta$ -tubulina nos diferentes graus de displasia de QAs de acordo com a OMS, pode-se observar que a marcação citoplasmática nos casos de DEL apresentaram média de marcação de 96,72% ( $\pm 3,66$ ) de células marcadas, os casos de DEM apresentaram 90,77% ( $\pm 9,47$ ), e os casos de DEI 87,17% ( $\pm 12,37$ ) (Tabela 2). Para os diferentes graus de displasia de QA segundo a classificação binária a marcação citoplasmática foi de 93,39% ( $\pm 7,75$ ) em BG e 90,87% ( $\pm 10,24$ ) em AG (Tabela 3).

Já no caso dos diferentes graus de diferenciação histológica dos CELs observou-se que a marcação citoplasmática foi bem expressiva, com média de marcação de 84,52% ( $\pm 20,07$ ) dos citoplasmas das células epiteliais nos casos BD, 83,37% ( $\pm 16,76$ ) nos casos MD e 88,20% ( $\pm 19,01$ ) nos casos PD. (Tabela 4).



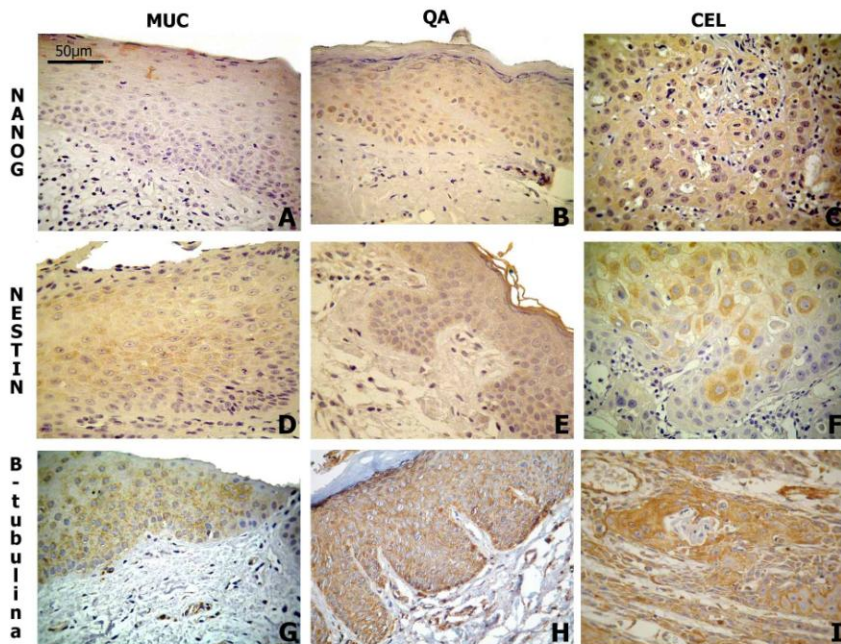


FIGURE 1: Immunohistochemical expression of NANOG, NESTIN and B-tubulin in NNT, AC, and LSCC (400x) (scale bar 50µm). A, B and C: NANOG weak to moderate staining. D: marcação fraca de NESTIN em MUC. E e F: marcação de NESTIN pouco evidente em terço inferior de QA e CEL. G, H e I: marcação intensa e homogênea de B-tubulina nas três lesões.

## DISCUSSÃO

As neoplasias são morfológicamente e funcionalmente heterogêneas quando se trata de proliferação celular ou mesmo de iniciação neoplásica. Dois modelos poderiam explicar tal heterogeneidade, o modelo estocástico e o modelo hierárquico. O modelo estocástico estabelece que um tumor é biologicamente homogêneo e o comportamento das células cancerosas é influenciado por fatores intrínsecos, como níveis de fatores de transcrição e vias de sinalização ou extrínsecos, como fatores do hospedeiro, microambiente e resposta imune. Estas influências são imprevisíveis ou aleatórias e resultam em heterogeneidade na expressão de marcadores, na entrada do ciclo celular ou na capacidade de iniciação celular. Este modelo prediz que todas as células do tumor são igualmente sensíveis a tais influências estocásticas e também que as células tumorais podem reverter de um estado para outro porque estas influências não induzem mudanças permanentes (Dick, 2008).

Em contraste, o modelo hierárquico prevê que o tumor é uma caricatura do desenvolvimento de tecido normal, onde as células-tronco mantêm a mesma hierarquia dos tecidos normais. Neste modelo, as células-tronco cancerosas (CTCs) são biologicamente distintas, mantêm-se por auto renovação, e amadurecem para gerar progênie que não possui propriedades de células-tronco (Dick, 2008).

Ambos os modelos acomodam a existência de CTCs. A diferença essencial é que, no modelo estocástico, as CTCs surgem aleatoriamente e cada célula tumoral tem o potencial de se comportar como uma CTC, que não poderia ser isolada, porque todas as células tumorais teriam o mesmo potencial para iniciação da carcinogênese; enquanto que no modelo hierárquico, há apenas um subconjunto distinto de células que tem o potencial de se comportar como CTCs (Dick, 2008).

No entanto, há evidências de que o câncer apresente uma hierarquia celular com as CTCs no ápice (Dick, 2008) e somente o modelo hierárquico poderia explicar a heterogeneidade funcional observada em neoplasias sólidas originalmente monoclonais e a recidiva tumoral após o tratamento devido à presença de uma população resistente à terapia (Clarke *et al.*, 2006; Hermann *et al.*, 2010). Na carcinogênese, as CTCs são expressas também nas fases pré-malignas e podem estar envolvidas na progressão da doença (Ravindran e Devaraj, 2015).

Fortalecendo a hipótese da participação das CTCs na carcinogênese, a sobre-expressão de marcadores específicos de células-tronco, além de marcadores neurais de células hematopoiéticas foi detectada em CEBs (Ravindran e Devaraj, 2012). Nesse trabalho estudamos pela primeira vez a expressão de proteínas relacionadas a células-tronco mesenquimais na carcinogênese labial. A marcação de NANOG foi expressiva tanto no núcleo quanto no citoplasma, enquanto que NESTIN e  $\beta$ -tubulina apresentaram expressão predominantemente citoplasmática. A QA foi a lesão que apresentou as maiores médias de células marcadas pelas três proteínas quando comparada a ENN e CEL, independentemente de significância estatística.

O NANOG é uma proteína expressa em células-tronco embrionárias e sobre-expressa durante o desenvolvimento neoplásico sendo, portanto, considerada um biomarcador de CTMs (Watanabe *et al.*, 2014). Sua superexpressão já foi descrita em CEB (Chiou *et al.*, 2008), carcinoma colorretal (Meng *et al.*, 2010), carcinoma gástrico (Matsuoka *et al.*, 2012) e carcinoma de mama (Ben-Porath *et al.*, 2008).

Estudos indicam que a presença de NANOG em CEBs esteja ligada à resistência ao tratamento quimioterápico (Tsai *et al.*, 2011; Bourguignon *et al.*, 2012), principalmente devido à presença de CTCs, que expressam altos níveis de NANOG (Izumiya *et al.*, 2012). Nesse contexto, segundo Watanabe *et al.*, é possível que as células tumorais NANOG negativas sofram morte celular durante a quimioterapia, enquanto as células tumorais indiferenciadas (normalmente localizadas na periferia das ilhas e cordões neoplásicos) e as CTCs (ambas com sobre-expressão de NANOG) sobrevivam e continuem a proliferar indicando o papel importante no NANOG na manutenção e disseminação do tumor e determinando um pior prognóstico para estes pacientes (Watanabe *et al.*, 2014).

Palla *et al.* (2015) induziram a carcinogênese química em pele de camundongos utilizando NANOG exógeno, e mostraram que a sobre-expressão dessa proteína favoreceu a transformação maligna. Além disso, a análise da expressão gênica em amostras de pele na fase pré-maligna mostrou que NANOG induziu a expressão de genes associados à transição epitélio-mesênquima (TEM), um evento importante na carcinogênese. Tais resultados forneceram evidências *in vivo* do papel oncogênico do NANOG em câncer de pele (Palla *et al.*, 2015). A TEM representa um evento celular que confere às células epiteliais tumorais as características biológicas necessárias aos passos de invasão e metástase da progressão tumoral. Estudos recentes sugeriram que a sinalização para algumas proteínas, uma delas o NANOG, regula as

capacidades iniciadoras de tumores e promove a progressão em células de câncer de pulmão através da regulação da TEM (Chiou *et al.*, 2010).

Meng *et al.* (2010) e Destro Rodrigues *et al.* (2016) também associaram a sobre-expressão de NANOG ao aumento da invasividade, à TEM e a um pior prognóstico em carcinoma epidermoide colorretal e carcinoma mucoepidermoide respectivamente (Meng *et al.*, 2010; Destro Rodrigues *et al.*, 2016)

Liang *et al.* (2008) verificaram que o NANOG está principalmente localizado no núcleo das CTCs (Liang *et al.*, 2008). Contudo, variações na distribuição intracelular foram encontradas em diferentes tipos de neoplasias. Watanabe *et al.* (2014) e Chiou *et al.* (2008), encontraram maior expressão nuclear de NANOG em células de CEBs; outros autores encontraram maior expressão citoplasmática, como Meng *et al.* (2010), em células de carcinoma colorretal (Chiou *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2014). Em células de carcinoma cervical, NANOG foi encontrado apenas no citoplasma (Ye *et al.*, 2008). Em células do carcinoma gástrico, a marcação foi encontrada tanto no núcleo, como no citoplasma (Zhang *et al.*, 2010). No presente estudo, NANOG foi expresso predominantemente no citoplasma, mas também apresentou presença marcante no núcleo.

O presente estudo mostrou maior expressão de NANOG em QA quando comparado com CEL e ENN, com diferença significativa apenas na comparação com ENN. Resultado semelhante foi encontrado por Zhang *et al.* (2010) em câncer gástrico, relacionando a superexpressão de NANOG com os estágios iniciais da carcinogênese gástrica (Zhang *et al.*, 2010). Ye *et al.* (2008) estudaram a expressão de NANOG em tecidos normais, tecidos com algum grau de displasia (leve, moderada e intensa) e carcinoma escamoso cervical, obtendo resultados que também mostraram maior expressão de NANOG em tecidos displásicos do que em tecidos normais (Ye *et al.*, 2008).

Outro resultado relevante é a maior marcação da proteína NANOG nos casos de QA com AR e de CEL BD, sugerindo pico de marcação da proteína justamente onde se acredita ocorrerem os passos iniciais da progressão da carcinogênese labial, na transformação da QA para o CEL. Estudos recentes sugeriram que a sinalização para NANOG regula as capacidades iniciadoras do câncer de pulmão (Chiou *et al.*, 2010).

O NESTIN, uma proteína de filamento intermediário (IFP) (Lendahl *et al.*, 1990), é considerada um biomarcador para identificar CTCs em neoplasias mesenquimais e epiteliais (Hockfield e Mckay, 1985; Neradil e Veselska, 2015). Evidências experimentais têm

demonstrado que a abundante expressão de NESTIN no endotélio embrionário contribui de forma significativa para a angiogênese, de forma que essa proteína poderia ser utilizada como alvo para inibir a angiogênese neoplásica (Wiese *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2012). Pesquisas laboratoriais revelaram papel potencialmente importante de NESTIN na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células neoplásicas malignas (Bieberich *et al.*, 2003; Sahlgren *et al.*, 2003). Além disso, pesquisas clínicas indicam que a expressão de NESTIN pode estar associada com o risco aumentado de alto risco de malignidade e mau prognóstico em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão de células não pequenas, câncer gástrico e carcinoma epidermoide esofágico (Dhingra *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Finalmente, segundo Matsuda *et al.* (2012) o aumento da expressão de NESTIN em células de adenocarcinoma ductal pancreático resulta em aumento da migração e invasão celular, indicando que o NESTIN é uma proteína que regula múltiplas funções celulares, incluindo migração, invasão, metástases, ciclo celular, apoptose nessa lesão através da regulação do citoesqueleto e das células progenitoras (Matsuda *et al.*, 2012).

No presente estudo, a expressão de NESTIN foi observada principalmente no citoplasma das células epiteliais, um padrão de expressão reportado em diversos estudos anteriores (Chiou *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; El Deeb e Abdelzaher, 2014; Neradil e Veselska, 2015; Ravindran e Devaraj, 2015). Na análise comparativa entre os grupos, a expressão dessa proteína foi significativamente maior na lesão pré-maligna (QA) e maligna (CEL) quando comparadas com o grupo não neoplásico (ENN). Resultado semelhante para carcinogênese intra oral foi obtido por Ravindran e Devaraj (Ravindran e Devaraj, 2015).

No entanto, no mesmo estudo de Ravindran e Devaraj (2015) foi descrita maior imunexpressão de NESTIN em CEBs quando comparado com as lesões pré-malignas (Ravindran e Devaraj, 2015), diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, onde, apesar das maiores médias de marcação em QA, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre lesões malignas e pré-malignas. Neste contexto, elevados níveis de NESTIN foram anteriormente observados em lesões pré-malignas gástricas e pancreáticas, sugerindo que as CTCs possam ter um papel na transformação maligna em ambos os órgãos (Dhingra *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2012).

Quando analisada a relação entre a presença de NESTIN e o grau de displasia em QA, os resultados obtidos foram novamente semelhantes aos de Ravindran e Devaraj (2015), com maior expressão

da proteína nos casos de QA com DEI (Ravindran e Devaraj, 2015). Já quando comparada com o grau de diferenciação dos CEL, os resultados foram diferentes de El Deeb M e Abdelzaher (2014) que correlacionaram significativamente a expressão de NESTIN com maior grau histológico do tumor (El Deeb e Abdelzaher, 2014). Por outro lado, no caso do carcinoma gástrico, não se observa correlação (Dhingra *et al.*, 2011). De forma semelhante ao resultado observado em NANOG, observou-se um pico de marcação de NESTIN em QA com DEI e CEL BD, justamente onde se acredita ocorrerem os passos iniciais da progressão da carcinogênese labial, na transformação da QA para o CEL.

A  $\beta$ -tubulina é um importante componente dos microtúbulos, estruturas envolvidas no crescimento e divisão celular, motilidade, sinalização e no desenvolvimento e manutenção da forma. A alteração no equilíbrio dos microtúbulos pode ser crucial para a função celular, incluindo o desenvolvimento do câncer (Berrieman *et al.*, 2004; Giarnieri *et al.*, 2005). Ainda, a  $\beta$ -tubulina é um marcador de células mesenquimais (Huang *et al.*, 2010).

Giarnieri *et al.* (2005), investigando a expressão de  $\beta$ -tubulina no desenvolvimento de câncer de reto, observaram que a marcação citoplasmática aumentava de acordo com o aumento do grau de displasia na fase pré-maligna, porém sem significância estatística e concluíram que essa proteína não teria papel no desenvolvimento do câncer de reto, indo ao encontro ao presente estudo, que também encontrou marcação expressiva para as displasias em QA, mas sem relevância estatística (Giarnieri *et al.*, 2005).

Da mesma forma, Dozier *et al.* (2003), utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) e Lebok *et al.* (2016), utilizando a expressão imuno-histoquímica de  $\beta$ -tubulina, ambos em amostras de câncer de mama, concluíram que não existe um papel clinicamente relevante para  $\beta$ -tubulina como um marcador prognóstico do câncer de mama e que a sobre-expressão da proteína não estava ligada a fatores prognósticos significativos, incluindo o estágio tumoral e o crescimento metastático (Dozier *et al.*, 2003; Lebok *et al.*, 2016)

Concluindo, a sobre-expressão dos biomarcadores de CTMs NANOG e NESTIN no presente estudo indica que ambas as proteínas estariam envolvidas nos mecanismos da carcinogênese labial, uma vez que a marcação imuno-histoquímica mostrou-se elevada nas lesões pré-malignas e malignas em comparação com o epitélio não neoplásico. Os mecanismos pelos quais esse envolvimento se dá devem ser mais profundamente estudados, mas tudo indica que essas proteínas estariam

interferindo no comportamento biológico das lesões estudadas contribuindo com a transformação maligna da QA em CEL e, dessa forma, fomentando a participação das CTCs no processo de carcinogênese labial. Por outro lado, a expressão da  $\beta$ -tubulina parece não ter um papel importante na carcinogênese oral; no entanto, mais estudos com essas proteínas devem ser realizados nessas lesões.

## REFERÊNCIAS

- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res**, v. 95, n. 3, p. 229-49, Jun 1987. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299675> >.
- BARNES, L. et al. **Head and Neck Tumors**. 2005.
- BEN-PORATH, I. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nat Genet**, v. 40, n. 5, p. 499-507, May 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443585> >.
- BERRIEMAN, H. K.; LIND, M. J.; CAWKWELL, L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? **Lancet Oncol**, v. 5, n. 3, p. 158-64, Mar 2004. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003198> >.
- CHEN, Z. et al. Role of the stem cell-associated intermediate filament nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e85584, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498263> >.
- \_\_\_\_\_. Expression of nestin in lymph node metastasis and lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer patients. **Hum Pathol**, v. 41, n. 5, p. 737-44, May 2010. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132963> >.
- CHIOU, S. H. et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. **Cancer Res**, v. 70, n. 24, p. 10433-44, Dec 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159654> >.
- \_\_\_\_\_. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 13, p. 4085-95, Jul 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593985> >.

COSTEA, D. E. et al. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis**, v. 12, n. 5, p. 443-54, Sep 2006. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910914> >.

DE ARAÚJO, V. C. et al. p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. **Oral Oncol**, v. 33, n. 1, p. 5-9, Jan 1997. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192545> >.

DESTRO RODRIGUES, M. F. et al. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med**, May 2016. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27131799> >.

DHINGRA, S. et al. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 8, p. 733-41, 2011. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135720> >.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4793-807, Dec 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064739> >.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003. ISSN 0303-6987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680953> >.

DOZIER, J. H. et al. Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 5, p. R157-69, 2003. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927047> >.

EL DEEB, N. M.; ABDELZAHER, E. Stem cell markers OCT4 and nestin in laryngeal squamous cell carcinoma and their relation to survivin expression. **Pathol Res Pract**, v. 210, n. 11, p. 751-8, Nov 2014. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242024> >.

GIARNIERI, E. et al. Alpha- and beta-tubulin expression in rectal cancer development. **Anticancer Res**, v. 25, n. 5, p. 3237-41, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101133> >.

GUÉRETTE, D. et al. Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. **BMC Evol Biol**, v. 7, p. 164, 2007. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854500> >.



HERMANN, P. C. et al. Cancer stem cells in solid tumors. **Semin Cancer Biol**, v. 20, n. 2, p. 77-84, Apr 2010. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371287> >.

HUANG, T. T. et al. Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **J Formos Med Assoc**, v. 109, n. 5, p. 326-37, May 2010. ISSN 0929-6646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497865> >.

IZUMIYA, M. et al. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 9, p. 3847-53, Sep 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993328> >.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, Nov 2006. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731030> >.

LEBOK, P. et al. High levels of class III  $\beta$ -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. **Oncol Lett**, v. 11, n. 3, p. 1987-1994, Mar 2016. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26998111> >.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-95, Feb 1990. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689217> >.

LI, S. et al. Clinicopathological and prognostic significance of Nestin expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clin Exp Med**, Apr 2016. ISSN 1591-9528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27099933> >.

LIANG, J. et al. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 731-9, Jun 2008. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454139> >.

MANGIOLA, A. et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 23, p. 6970-7, Dec 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056172> >.

MATSUDA, Y.; KURE, S.; ISHIWATA, T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. **Med Mol Morphol**, v. 45, n. 2, p. 59-65, Jun

2012. ISSN 1860-1499. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718289>>.

MATSUOKA, J. et al. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. **J Surg Res**, v. 174, n. 1, p. 130-5, May 2012. ISSN 1095-8673. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21227461>>.

MENG, H. M. et al. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 9, n. 4, p. 295-302, Feb 2010. ISSN 1555-8576. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026903>>.

NERADIL, J.; VESELSKA, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Sci**, v. 106, n. 7, p. 803-11, Jul 2015. ISSN 1349-7006. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940879>>.

ONOUÉ, T. et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 29, n. 5, p. 1133-8, Nov 2006. ISSN 1019-6439. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016644>>.

PALLA, A. R. et al. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. **Sci Rep**, v. 5, p. 10205, May 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988972>>.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

RAVINDRAN, G.; DEVARAJ, H. Aberrant expression of CD133 and musashi-1 in preneoplastic and neoplastic human oral squamous epithelium and their correlation with clinicopathological factors. **Head Neck**, v. 34, n. 8, p. 1129-35, Aug 2012. ISSN 1097-0347. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076906>>.

\_\_\_\_\_. Prognostic significance of neural stem cell markers, Nestin and Musashi-1, in oral squamous cell carcinoma: expression pattern of Nestin in the precancerous stages of oral squamous epithelium. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 6, p. 1251-60, Jul 2015. ISSN 1436-3771. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352468>>.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843-50, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829953>>.

SAHLGREN, C. M. et al. Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 14, p. 5090-106, Jul 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832492> >.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 384.

TSAI, L. L. et al. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 8, p. 621-8, Sep 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342274> >.

VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481658> >.

WATANABE, M. et al. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 7, n. 1, p. 35-40, Jan 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348816> >.

YE, F. et al. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi 1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 108, Apr 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419830> >.

ZHANG, J. et al. The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development. **Oncol Lett**, v. 1, n. 3, p. 457-463, May 2010. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966326> >.

ZHANG, P. et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. **Cancer Lett**, v. 277, n. 2, p. 227-34, May 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185988> >.

ZHANG, Z.; FILHO, M. S.; NÖR, J. E. The biology of head and neck cancer stem cells. **Oral Oncol**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 2012. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070916> >.

ZHONG, B. et al. Contribution of nestin positive esophageal squamous cancer cells on malignant proliferation, apoptosis, and poor prognosis. **Cancer Cell Int**, v. 14, p.

57, 2014. ISSN 1475-2867. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966803> >.

\_\_\_\_\_. Association of the intermediate filament nestin with cancer stage: a meta-analysis based on 223 positive/high nestin cases and 460 negative/low case-free controls. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22970-7, Sep 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015397> >.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A marcação para o biomarcador NANOG foi nuclear e citoplástica;
- A sobre-expressão do biomarcador de CTM NANOG em QA e CEL, quando comparado com o ENN, indica que a proteína estaria envolvida nos mecanismos da carcinogênese labial;
- Em relação aos diferentes graus de displasia em QA, a marcação de NANOG foi mais presente nos casos de alto grau segundo a classificação binária e nos casos do CEL, sua expressão foi maior nos casos bem diferenciados, sugerindo sua participação nas fases inicial da carcinogênese;
- A marcação para o NESTIN foi predominantemente citoplasmática;
- A sobre-expressão do biomarcador de CTM NENTIN em QA e CEL, quando comparado com o ENN, indica que a proteína estaria envolvida nos mecanismos da carcinogênese labial;
- Em relação aos diferentes graus de displasia em QA, a marcação de NESTIN foi mais presente nos casos com displasia intensa segundo a classificação da OMS e nos casos do CEL sua expressão foi maior nos casos bem diferenciados, sugerindo sua participação nas fases iniciais da carcinogênese;
- A marcação para a  $\beta$ -tubulina foi predominantemente citoplasmática;
- A marcação de  $\beta$ -tubulina foi intensa em todas as lesões estudadas e parece não representar um papel importante na carcinogênese labial.



## REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A. P. Lips' tumours retrospective study and literature review: a twenty-eight-year experience. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 295-300, 2004.
- ARGYRIS, P. P. et al. Recurrent ameloblastoma of the mandible with unusual granular cell component. **Int J Surg Pathol**, v. 23, n. 4, p. 298-304, Jun 2015. ISSN 1940-2465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673632> >.
- BARNES, L. et al. **Head and Neck Tumors**. 2005.
- BEN-PORATH, I. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nat Genet**, v. 40, n. 5, p. 499-507, May 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443585> >.
- BERRIEMAN, H. K.; LIND, M. J.; CAWKWELL, L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? **Lancet Oncol**, v. 5, n. 3, p. 158-64, Mar 2004. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003198> >.
- BIEBERICH, E. et al. Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. **J Cell Biol**, v. 162, n. 3, p. 469-79, Aug 2003. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885759> >.
- BOURGUIGNON, L. Y. et al. Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. **Oncogene**, v. 31, n. 2, p. 149-60, Jan 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21685938> >.
- CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 3, p. 498-503, Mar 2008. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280383> >.
- CHEN, Z. et al. Role of the stem cell-associated intermediate filament nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e85584, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498263> >.
- \_\_\_\_\_. Expression of nestin in lymph node metastasis and lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer patients. **Hum Pathol**, v. 41, n. 5, p. 737-44, May 2010.

ISSN 1532-8392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132963> >.

CHIOU, S. H. et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. **Cancer Res**, v. 70, n. 24, p. 10433-44, Dec 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159654> >.

\_\_\_\_\_. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 13, p. 4085-95, Jul 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593985> >.

CLARKE, M. F. et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 19, p. 9339-44, Oct 2006. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990346> >.

COSTEA, D. E. et al. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis**, v. 12, n. 5, p. 443-54, Sep 2006. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910914> >.

DESTRO RODRIGUES, M. F. et al. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med**, May 2016. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27131799> >.

DHINGRA, S. et al. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 8, p. 733-41, 2011. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135720> >.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4793-807, Dec 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064739> >.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003. ISSN 0303-6987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680953> >.

DOZIER, J. H. et al. Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 5, p. R157-69, 2003. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927047> >.



EL DEEB, N. M.; ABDELZAHER, E. Stem cell markers OCT4 and nestin in laryngeal squamous cell carcinoma and their relation to survivin expression. **Pathol Res Pract**, v. 210, n. 11, p. 751-8, Nov 2014. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242024> >.

FRÖJDMAN, K. et al. The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. **Differentiation**, v. 61, n. 4, p. 243-9, May 1997. ISSN 0301-4681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203347> >.

GIARNIERI, E. et al. Alpha- and beta-tubulin expression in rectal cancer development. **Anticancer Res**, v. 25, n. 5, p. 3237-41, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101133> >.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 9, p. 1116-21, Sep 2012. ISSN 1468-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21923660> >.

GUÉRETTE, D. et al. Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. **BMC Evol Biol**, v. 7, p. 164, 2007. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854500> >.

HERMANN, P. C. et al. Cancer stem cells in solid tumors. **Semin Cancer Biol**, v. 20, n. 2, p. 77-84, Apr 2010. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371287> >.

HERRMANN, H. et al. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. **J Clin Invest**, v. 119, n. 7, p. 1772-83, Jul 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587452> >.

HOCKFIELD, S.; MCKAY, R. D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. **J Neurosci**, v. 5, n. 12, p. 3310-28, Dec 1985. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4078630> >.

HUANG, T. T. et al. Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **J Formos Med Assoc**, v. 109, n. 5, p. 326-37, May 2010. ISSN 0929-6646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497865> >.

IZUMIYA, M. et al. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 9, p. 3847-53, Sep 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993328> >.

KAUGARS, G. E. et al. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 88, n. 2, p. 181-6, Aug 1999. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468463> >.

KRUPKOVA, O. et al. Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. **Tumour Biol**, v. 32, n. 4, p. 631-9, Aug 2011. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340483> >.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, Nov 2006. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731030> >.

LEBOK, P. et al. High levels of class III  $\beta$ -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. **Oncol Lett**, v. 11, n. 3, p. 1987-1994, Mar 2016. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26998111> >.

LEDESMA-MONTES, C. et al. International collaborative study on ghost cell odontogenic tumours: calcifying cystic odontogenic tumour, dentinogenic ghost cell tumour and ghost cell odontogenic carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 5, p. 302-8, May 2008. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221328> >.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-95, Feb 1990. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689217> >.

LI, S. et al. Clinicopathological and prognostic significance of Nestin expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clin Exp Med**, Apr 2016. ISSN 1591-9528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27099933> >.

LIANG, J. et al. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 731-9, Jun 2008. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454139> >.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509490> >.

MANGIOLA, A. et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 23, p. 6970-7, Dec 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056172> >.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212-216, 2004. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01004.x> >.

MATSUDA, Y.; KURE, S.; ISHIWATA, T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. **Med Mol Morphol**, v. 45, n. 2, p. 59-65, Jun 2012. ISSN 1860-1499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718289> >.

MATSUOKA, J. et al. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. **J Surg Res**, v. 174, n. 1, p. 130-5, May 2012. ISSN 1095-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21227461> >.

MENG, H. M. et al. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 9, n. 4, p. 295-302, Feb 2010. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026903> >.

MICHALCZYK, K.; ZIMAN, M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. **Histol Histopathol**, v. 20, n. 2, p. 665-71, Apr 2005. ISSN 0213-3911. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736068> >.

NERADIL, J.; VESELSKA, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Sci**, v. 106, n. 7, p. 803-11, Jul 2015. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940879> >.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3a. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, Jul-Aug 2002. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12139232](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12139232) >.

ONOUE, T. et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 29, n. 5, p. 1133-8, Nov 2006. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016644> >.

OUHTIT, A. et al. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **Am J Pathol**, v. 156, n. 1, p. 201-7, Jan 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623668> >.

PALLA, A. R. et al. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. **Sci Rep**, v. 5, p. 10205, May 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988972> >.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

RAVINDRAN, G.; DEVARAJ, H. Aberrant expression of CD133 and musashi-1 in preneoplastic and neoplastic human oral squamous epithelium and their correlation with clinicopathological factors. **Head Neck**, v. 34, n. 8, p. 1129-35, Aug 2012. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076906> >.

\_\_\_\_\_. Prognostic significance of neural stem cell markers, Nestin and Musashi-1, in oral squamous cell carcinoma: expression pattern of Nestin in the precancerous stages of oral squamous epithelium. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 6, p. 1251-60, Jul 2015. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352468> >.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia Oral: Correlações clínicopatológicas**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 420.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843-50, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829953> >.

RYUGE, S. et al. Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer. **Chest**, v. 139, n. 4, p. 862-9, Apr 2011. ISSN 1931-3543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829334> >.

SAHLGREN, C. M. et al. Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 14, p. 5090-106, Jul 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832492> >.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SILVA, F. D. et al. Prevalence of Lips Pathologies in Fishermen Of Santa catarina Island. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 51, p. 37 - 42, 2006.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 384.

SINHA, N. et al. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. **Oral Oncol**, v. 49, n. 9, p. 854-62, Sep 2013. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876628> >.

SUZUKI, S. et al. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. **J Histochem Cytochem**, v. 58, n. 8, p. 721-30, Aug 2010. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421592> >.

TSAI, L. L. et al. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 8, p. 621-8, Sep 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342274> >.

VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481658> >.

WATANABE, M. et al. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 7, n. 1, p. 35-40, Jan 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348816> >.

WIESE, C. et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 19-20, p. 2510-22, Oct 2004. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526158> >.

YE, F. et al. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi 1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 108, Apr 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419830> >.

ZHANG, J. et al. The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development. **Oncol Lett**, v. 1, n. 3, p. 457-463, May 2010. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966326> >.

ZHANG, P. et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. **Cancer Lett**, v. 277, n. 2, p. 227-34, May 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185988> >.

ZHANG, Z.; FILHO, M. S.; NÖR, J. E. The biology of head and neck cancer stem cells. **Oral Oncol**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 2012. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070916> >.

ZHONG, B. et al. Contribution of nestin positive esophageal squamous cancer cells on malignant proliferation, apoptosis, and poor prognosis. **Cancer Cell Int**, v. 14, p. 57, 2014. ISSN 1475-2867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966803> >.

\_\_\_\_\_. Association of the intermediate filament nestin with cancer stage: a meta-analysis based on 223 positive/high nestin cases and 460 negative/low case-free controls. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22970-7, Sep 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015397> >.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Metodologia Expandida

#### Delineamento de estudo

O estudo proposto é do tipo observacional descritivo, retrospectivo.

#### Aspectos éticos e legais

O projeto já foi submetido e aprovado pelo CEPESH da UFSC, CAAE 45349215.0.0000.0121, número do parecer 1.147.642.

#### Local da realização do estudo

O estudo foi realizado no do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### Amostra

Para a presente pesquisa, optou-se por uma amostra de conveniência do acervo do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (Registro CONEP B-051).

#### Seleção da amostra

A seleção da amostra foi feita a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB/UFSC). Foram selecionados 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 20 casos de ENN de pacientes com idade superior a 18 anos que tiveram estes diagnósticos a partir do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (Registro CONEP B-051).

#### Critérios de inclusão

- Casos de pacientes que tinham idade superior a 18 anos e diagnóstico de queilite actínica, carcinoma epidermoide de lábio e mucocele poderão participar da amostra.

- Para compor a amostra, o caso arquivado estava devidamente armazenado em forma de laudo e lesão emblocada em parafina, além de exibir material suficiente para o desenvolvimento da pesquisa.

### Critérios de exclusão

- Casos de pacientes que não tinham idade superior a 18 anos ou não tenham diagnóstico de queilite actínica ou carcinoma epidermoide de lábio ou mucocele foram excluídos.

- Os casos arquivados que não estavam devidamente armazenados em forma de laudo e lesão emblocada em parafina ou que não exibiram material suficiente para o desenvolvimento da pesquisa foram excluídos.

- Os casos de epitélio não neoplásico oriundos de fragmentos de mucocele com componente inflamatório exuberante e/ou alterações epiteliais significativas foram excluídos da amostra.

### Procedimentos laboratoriais

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle Positivo</b>
<b>NANOG</b>	hNANO G.2	eBioscience	1:100	Carcinoma epidermoide
<b>NESTIN</b>	Rat-401 (Rat401 (4D4))	eBioscience	1:50	Carcinoma epidermoide
<b>B-TUBULINA</b>	DB1B	Ingenex	1:100	Pulmão

Quadro 1: Anticorpos utilizados

As amostras foram submetidas à reação de imuno-histoquímica pelo método da estreptoavidina-biotina-peroxidase, para avaliação dos marcadores celulares NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina, utilizando-se anticorpos primários específicos para esses antígenos. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos. O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Das amostras previamente fixadas em formol e emblocadas em parafina, foram obtidos cortes teciduais de 3 $\mu$ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro tratadas com solução de 3-



aminopropyltriethoxylene (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) e levados à estufa a 60°C por 15 minutos.

Em seguida os cortes sofreram desparafinização em xilol e foram reidratados em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando pelo etanol absoluto (I, II e III), seguida pelo etanol 95% e etanol 85%. As lâminas foram posteriormente lavadas em água destilada por dez minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 6% em metanol, por 40 minutos. Seguiu-se com a lavagem em água corrente por dez minutos e depois a passagem em água destilada.

Para a recuperação dos sítios antigênicos foi realizado o tratamento dos cortes teciduais com tampão citrato 0,01M pH 6,0 em banho-maria a 96°C por 40 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com leite em pó desnatado (5% em solução tampão Phosphate-buffered saline - PBS), à temperatura ambiente, por 50 minutos, seguida de lavagem com água destilada até a remoção total do leite e três incubações de cinco minutos cada, com PBS.

A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários NANOG, NESTIN e  $\beta$ -tubulina, a 4°C, overnight. Após o tempo de incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos a lavagens em PBS e então incubados com o anticorpo secundário contido no Kit EnVision (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA). A revelação da reação ocorreu com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA). Após lavagem em água corrente por dez minutos, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, pelo tempo de dois minutos e novamente lavados em água corrente para a remoção do excesso do corante. Controles positivos foram incluídos em cada reação. Como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos da sequência da reação. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha).

#### Avaliação da imunoreatividade

As lâminas tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura das imagens e a análise da imunoreatividade foi feita por um examinador às cegas quanto ao grupo a que cada lâmina pertence. Foram capturados cinco campos de cada lâmina, em aumento de 400x por meio de microscópio óptico binocular (AxioStar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de

imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, USA), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens. A localização dos campos foi padronizada de maneira que se localizavam de forma equidistante um do outro. Para avaliação foi empregado o software para análise de imagens digitalizadas ImageJ versão 1.41o (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Os núcleos e citoplasmas corados em marrom (células positivas) e em azul (células negativas) foram contados por meio do software e a média dos cinco campos de cada lâmina foi calculada. A avaliação da imunorreatividade foi realizada por um examinador previamente calibrado e os valores foram registrados em uma planilha previamente elaborada no Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Corporation).

Com isso foi determinada a proporção das células positivas para cada amostra, expressa em porcentagem. Estes valores foram submetidos a uma análise estatística para comparação entre os grupos.

#### Calibração do examinador

examinador responsável pela análise imuno-histoquímica foi submetido a uma calibração, analisando 10 lâminas (cinco de cada grupo), três vezes, com intervalos de uma semana. Os resultados foram comparados para determinação do índice Kappa, considerando adequado um valor acima de 0,8.

#### Análise dos dados

Foi realizada a estatística descritiva para cada variável analisada, e a comparação da expressão dessas variáveis entre os grupos analisados QA, CEL e ENN por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando o software SPSS<sup>®</sup> versão 11 (SPSS Inc., Headquarters, EUA). Foi realizada análise de variância, os resíduos não apresentaram distribuição normal, optou-se então por testes não paramétricos. Ainda, para correlacionar a marcação das proteínas com as classificações de QA e CEL, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas ou área corada  $\pm$  desvio-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de  $p < 0,05$  para dados com significância estatística.

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP/SH

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio.

**Pesquisador:** Filipe Modolo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45349215.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.147.642

**Data da Relatoria:** 13/07/2015

##### Apresentação do Projeto:

Acredita-se que as células-tronco cancerígenas (CTCs) desempenhem um papel crucial no processo de iniciação da neoplasia, modulação do microambiente neoplásico, apoptose e senescência celular. Diversos estudos atribuem as CTCs papéis fundamentais na progressão e na invasão do câncer, na resistência à quimioterapia, na recorrência após terapia e na ocorrência de metástases a distância. Além disso, estudos recentes identificaram CTCs em um grupo heterogêneo de neoplasias, incluindo o câncer bucal, e caracterizaram-nas como um dos fatores responsáveis pela reincidência dessas lesões mesmo depois da realização do tratamento adequado e também pela alta morbidade e mortalidade de pacientes portadores de tais doenças. Para tal avaliação será realizada a análise imuno-histoquímica dos anticorpos anti-Nanog, Nestin e OCT3/4, marcadores clássicos de células-tronco consagrados pela literatura, em 30 casos de queilite actínica, 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio e 20 casos de mucocele. As lâminas serão avaliadas quanto a presença e a localização da marcação.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Investigar a presença das CTCs em 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 30 casos de MUC diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina por meio da análise imuno-histoquímica

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R. Desembargador Vitor Lima,  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** oep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.147.542

dos marcadores celulares Nanog, Nestin e OCT3/4.

Objetivo Secundário:

- Levantar 30 casos de QA, 30 casos de CEL e 30 casos de MUC diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC);- Classificar as QAs de acordo com seus graus de displasia epitelial;- Classificar os CELs de acordo com seus graus de diferenciação;- Avaliar a expressão imunohistoquímica do marcador celular Nanog, em QAs, CELs e MUC, evidenciando o local e frequência desta expressão;- Avaliar a expressão imunohistoquímica do marcador celular Nestin, em QAs, CELs e MUC, evidenciando o local e frequência desta expressão;- Avaliar a expressão imunohistoquímica do marcador celular OCT 3/4, em QAs, CELs e MUC, evidenciando o local e frequência desta expressão;- Comparar a expressão dos marcadores celulares em estudo entre as QAs, CELs e MLNs.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante da biópsia da lesão, previamente realizada, e armazenado nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. Assim, não haverá nova intervenção cirúrgica no paciente e o mesmo não será submetido a desconfortos locais ou riscos cirúrgicos. Porém, como haverá acesso aos dados do paciente, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra. Os pesquisadores garantem ressarcimento de possíveis despesas decorrentes da participação na pesquisa e indenização diante de eventuais danos.

Benefícios:

Acredita-se que as células-tronco cancerígenas (CTCs) desempenhem um papel crucial no processo de iniciação da neoplasia, modulação do microambiente neoplásico, apoptose e senescência celular. Diversos estudos atribuem às CTCs papéis fundamentais na progressão e na invasão do câncer, na resistência à quimioterapia, na recorrência após terapia e na ocorrência de metástases a distância. Além disso, estudos recentes identificaram CTCs em um grupo heterogêneo de neoplasias, incluindo o câncer bucal, e caracterizaram-nas como um dos fatores responsáveis pela reincidência dessas lesões mesmo depois da realização do tratamento adequado e também pela alta morbidade e mortalidade de pacientes portadores de tais doenças. Portanto, a detecção de tais células nas lesões a serem estudadas pode contribuir para o desenvolvimento futuro de novos alvos terapêuticos/terapias no combate ao câncer de lábio. No entanto, os sujeitos da pesquisa não terão nenhum benefício imediato.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-8094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.147.642

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é importante porque implica em proporcionar conhecimentos comportamentais da doença, que por sua vez facilitará o desenvolvimento e aprimoramento de terapias

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de Apresentação Obrigatória atendem ao previsto na RES CNS/466/12.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Por atender ao sugerido pela relatoria somos por sua aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 13 de Julho de 2015

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio.

**Pesquisador:** Filipe Modolo

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 45349215.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.556.931

**Apresentação do Projeto:**

Emenda apresentada ao estudo "Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio."

O projeto já foi apreciado e aprovado.

**Objetivo da Pesquisa:**

O projeto já foi apreciado e aprovado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto já foi apreciado e aprovado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

ESTA EMENDA ESTÁ SENDO SUBMETIDA AO CEP SH DA UFSC DEVIDO À NECESSIDADE DA INCLUSÃO NO PROJETO DO ESTUDO DA PROTEÍNA BETA-TUBULINA NAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PRESENTES NO CÂNCER. ALÉM DISSO, O EMBASAMENTO TEÓRICO DO PROJETO FOI MELHORADO.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A emenda apresentada foi apresentada com todos os requerimentos atendidos pelo sistema CEP-CONEP.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

## ANEXO B – Guia de Informações ao Autor

**ORAL ONCOLOGY**

A Journal Related to Head &amp; Neck Oncology

**AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

• <b>Description</b>	<b>p.1</b>
• <b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
• <b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
• <b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
• <b>Guide for Authors</b>	<b>p.5</b>



ISSN: 1368-8375

**DESCRIPTION**

*Oral Oncology* is an international interdisciplinary journal which publishes high quality original research, clinical trials and review articles, editorials, and commentaries relating to the etiopathogenesis, epidemiology, prevention, clinical features, diagnosis, treatment and management of patients with **neoplasms** in the **head** and **neck**.

*Oral Oncology* is of interest to head and neck surgeons, radiation and medical oncologists, maxillo-facial surgeons, oto-rhino-laryngologists, plastic surgeons, pathologists, scientists, oral medical specialists, special care dentists, dental care professionals, general dental practitioners, public health physicians, palliative care physicians, nurses, radiologists, radiographers, dietitians, occupational therapists, speech and language therapists, nutritionists, clinical and health psychologists and counselors, professionals in end of life care, as well as others interested in these fields.

Basic, translational, or clinical Research or Review papers of high quality and that make a contribution to new knowledge are invited on the following aspects of neoplasms arising in the head and neck (including lip, tongue, oral cavity, oropharynx, salivary glands, sinuses, nose, nasopharynx, larynx, skull base, thyroid, and craniofacial region, and the related hard and soft tissues and lymph nodes):

- **Etiopathogenesis:** natural history of cancer and pre-cancer; basic pathology, metastatic mechanisms; genetic changes; cellular and molecular changes; microorganisms; growth factors, adhesion and other molecules
- **Epidemiology;** risk factors; biomarkers; protective factors; geographic factors; prevention; screening and intervention
- Clinical features; **orofacial** effects of neoplasms at both local and distant sites; tumor staging and grading
- **Diagnosis; detection of cancer** and pre-cancer; cellular and molecular markers for diagnosis; advances in **imaging** and other functional diagnostic modalities for cancer and pre-cancer
- **Management and Prognosis;** clinical, cellular and molecular markers for prognosis; **treatment** options including surgical, lasers, photodynamic therapy, cryosurgery, micro-vascular and other forms of surgery, medical, radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, biological and gene therapy advances; molecular targets and new therapeutics (new cytotoxic and molecular-targeted therapies); multimodality treatment; advances in reconstruction and rehabilitation, including flaps and grafts, alloplasty, bone and connective tissue biology; multidisciplinary teamwork in cancer care and **oral health care**.
- Quality of life Issues; issues of consent; psychosocial aspects; patient and health professional information; patient involvement; psychological interventions, improving outcomes; the prevention,

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### **Human and animal rights**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

### **Conflict of interest**

By means of a "Conflict of interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, please state "None declared". This document should be found as a separate page within the manuscript and placed directly below the title page.

Role of the Funding Source

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).



## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of paper*

Oral Oncology accepts the following article types for publication:

#### **Editorial:**

Authors who are considering submitting an editorial should contact the Editor-in-Chief with a brief outline of the proposed contribution before submission. Editorials are welcome on any topic; however, they may also be related to work previously published in Oral Oncology. **Editorials have no abstract and no keywords, and are usually restricted to 1500 words, up to 10 references and up to 2 tables or figures if not agreed otherwise with the Editor-in-Chief.** The Editor-in-Chief can be contacted at [ooncology@elsevier.com](mailto:ooncology@elsevier.com).

#### **Original Research Articles:**

Original research articles present results of original epidemiology and public health, basic, clinical and/or translational (basic research with clinical applications) research. This article focuses on new data collected by the author(s) during the course of a epidemiology and public health research; basic investigation; clinical trial; or translational research, although other studies may be cited for support. Original research articles, which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as original full-length research papers. The article should contain the following sections: Title Page, Abstract, Conflict of Interest Statement, Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, Discussion, and Conclusion. **Mechanics: Research articles should contain an abstract, a list of up to 10 keywords and have a limit of 3,500 words, 7 figures and/or tables, and 60 references.**

#### **Review Articles:**

Review articles that are topical and a critical assessment of any aspect of head and neck are welcome. Review articles collate, describe, and evaluate prior publications of important head and neck subjects, accompanied by critical analysis leading to rational conclusions. These Reviews should contain very little, if any, original data from an author's own study; however, such data can be used to support the overall thesis of the article. We also accept targeted mini-reviews that cover specific topics or therapies as well as meta-analyses. **Mechanics: Review articles should contain a short abstract stating the goal of the review, an introduction, discussion, and conclusion. Review articles can contain up to 5,000 words, 7 figures and/or tables, and 120 references.**

#### **Perspectives:**

Perspectives are more focused than reviews and seek to review a topic from a particular view or opinion. Perspectives should review a particular field to identify outstanding issues and/or challenges and propose new hypotheses or directions. A Perspective may highlight emerging science, controversial opinions, or issues within the field and seek to address these controversies. They may be accepted from a single individual or a team. **Mechanics: Perspectives should contain a short abstract stating the goal of the review, an introduction, discussion, and conclusion. Perspective articles are limited to 2000 words, 3 figures and/or tables, and 45 references.**

#### **Letters to the Editor:**

Letters to the Editor relating to published work in Oral Oncology or other topics of interest including unpublished original research are welcome. If accepted Letters are published online only. **Mechanics: Letters should not exceed 1,000 words in length and can contain up to 2 figures and/or tables.**

After reading the Guide for Authors, please visit our online submission system to submit your manuscript: <http://ees.elsevier.com/oo>.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

#### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

## Article structure

### Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

### 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 detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should 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.

## 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. 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. **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.
- **Word Count.** Please include a word count on your Title Page. Your word count should exclude the abstract, keywords, references, tables and figures.

## Abstract

A concise and factual abstract of no more than 250 words is required. The abstract must be **structured for original research articles and articles reporting the results of clinical trials**. The abstract should be divided by subheadings as follows: Objectives, Materials and Methods, Results and Conclusion.

The abstract **should not be structured for review articles**. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

### *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 and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for Original Research Articles, Review Articles, and Perspectives. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and 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).

See: <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as Oral Cancer, or Head and Neck cancer.

### *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.

### *Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

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*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Illustration services*

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. 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.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### **Figure Captions, Tables, Figures and Schemes**

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

## **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 and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *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.