

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Glênio Fernandes de Moraes

**Efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica de seus receptores-alvo e  
ativação de suas efetoras GTPases Rho em carcinoma epidermoide oral *in vitro***

Uberaba

2023

Glênio Fernandes de Moraes

**Efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica de seus receptores-alvo e  
ativação de suas efetoras GTPases Rho em carcinoma epidermoide oral *in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Uberaba

2023

**Catálogo na fonte:**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M82e | <p>Moraes, Glênio Fernandes de<br/>    Efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica dos seus<br/>receptores alvo e ativação de suas efectoras GTPases Rho em carcinoma<br/>epidermoide oral / Glênio Fernandes de Moraes. – 2023.<br/>    68 f.: il., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal<br/>do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023<br/>Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema</p> <p>1. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. 2. Inibidores de<br/>proteína tirosina quinase. 3. Proteínas rho de ligação ao GTP. I. Crema,<br/>Virgínia Oliveira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 617.51-006</p> |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Glênio Fernandes de Moraes

**Efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica de seus receptores-alvo e  
ativação de suas efetoras GTPases Rho em carcinoma epidermoide oral *in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Uberaba 05 de Julho de 2023

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Nanci Mendes Pinheiro  
Centro Universitário - UNIFACTHUS

---

Profa. Dra. Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema - Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**DEDICATÓRIA**

---

Dedico aos meus pais, Fenelon (*in memorian*) e Maria Rosa, e à minha esposa Patrícia, pelo incentivo e apoio no decorrer dessa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço,

À minha orientadora, Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema, por ter me permitido entrar e conhecer o mundo fantástico da vida científica. Serei sempre grato por ter me proporcionado crescer de forma tão significativa no âmbito profissional e pessoal.

Aos Professores Roseane Lopes da Silva Grecco, Fernanda Bernadelli de Vito, Hélio Moraes Souza pela importante colaboração para execução dos experimentos deste estudo.

À Professora Mara Rubia Marques e ao Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos (LabCel) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela utilização do microscópio confocal.

Aos Técnicos Raphael Ferreira Almeida e ao Douglas Cobo Micheli, pelo apoio e disponibilidade durante todos os momentos em que necessitei.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela convivência sempre produtiva, pelo incentivo e pelos ensinamentos nas disciplinas.

Aos meus pais Maria Rosa Moraes Silva e Fenelon Fernandes Silva (*in memoriam*), por estarem sempre presentes em todos os momentos mais importantes da minha vida. Obrigado pelo incentivo sempre! Ao meu irmão Reinaldo Fernandes Moraes, pelos momentos de descontração, palavras amigas e paciência.

À minha amada esposa Patrícia Helena Zanier Gomes, pelo amor, carinho e paciência. Obrigado pelo apoio incondicional em todos os momentos. Sem você, eu jamais teria conseguido!

Ao meu filho Guilherme Zanier Fernandes que, mesmo nos momentos de minha ausência, me entendeu e me apoiou fielmente.

À minha querida UFTM que, desde a minha graduação, proporcionou experiências e aprendizados únicos. Obrigado às pessoas que, ao cruzarem o meu caminho, contribuíram para o meu aprendizado e formação, tornando possível a conquista deste tão sonhado objetivo em minha vida.

## **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Processo APQ-02333-186)
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

“O segredo do sucesso é a constância de um  
propósito.”

Benjamin Disraeli



O carcinoma epidermoide oral representa a maioria das lesões malignas da região de cabeça e pescoço. O comportamento de suas células é regulado pela ligação de moléculas extracelulares aos receptores da membrana celular, que iniciam vias de transdução de sinal. O TKI-258 é um inibidor tirosina-quinase que bloqueia os receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs), derivados de plaquetas (PDGFRs) e endoteliais vasculares (VEGFRs), o que o torna atraente para o tratamento dessa neoplasia. Este estudo visou avaliar o efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica de seus receptores-alvo, a ativação de suas efetoras GTPases Rho e a organização da citoqueratina e da vimentina em carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 a 5 µM foram cultivadas por 24 horas para realização dos ensaios: expressão gênica de *FGFR3b*, *VEGFR1*, *PDGFRα* e *PDGFRβ*; imunofluorescência para RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 em culturas tridimensionais; imunofluorescência para citoqueratina e vimentina. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As células tratadas com TKI-258 apresentaram uma tendência de diminuição da expressão gênica de *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFRα* e *PDGFRβ*. As GTPases RhoA e RhoB foram vistas externamente ao córtex de actina (forma ativa) em células-controle e tratadas com TKI-258. A GTPase Rac1 não foi vista externamente ao córtex de actina em células controle, mas estavam presentes nas células tratadas com TKI-258. Cdc42 ativa não foi vista nas células controle e tratadas. O percentual de células tratadas positivas reduziu para citoqueratina e foi similar para vimentina. Os resultados obtidos demonstraram que a inibição das vias de transdução de sinal com o tratamento com TKI-258 em células de carcinoma epidermoide oral *in vitro* leva a uma tendência de diminuição da expressão gênica de *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFRα*, e *PDGFRβ*; no entanto, mantém as GTPases RhoA, RhoB e Rac1 na sua forma ativa. Além disso, reduz a quantidade de células positivas para a citoqueratina, enquanto a vimentina não é afetada.

**Palavras-chave:** GTPase Cdc42; GTPase Rac1; GTPase RhoA; GTPase RhoB; câncer oral

**ABSTRACT**

---

Oral squamous cell carcinoma represents the majority of malignant lesions of the head and neck region. The behavior of their cells is regulated by the binding of extracellular molecules to cell membrane receptors, which initiate signal transduction pathways. TKI-258 is a tyrosine kinase inhibitor that blocks the receptors of growth factors: fibroblasts (FGFRs), platelet derivatives (PDGFRs) and vascular endothelials (VEGFRs), which makes it attractive for the treatment of this neoplasm. This study aimed to evaluate the effect of TKI-258 treatment on the gene expression of its target receptors, the activation of its Rho GTPases effectors and the organization of cytokeratin and vimentin in oral squamous cell carcinoma in vitro. SCC-4 cells controlled and treated with TKI-258 at 5  $\mu$ M were cultured for 24 hours for the following assays: gene expression of *FGFR3b*, *VEGFR1*, *PDGFR $\alpha$*  and *PDGFR $\beta$* ; immunofluorescence for RhoA, RhoB, Rac1 and Cdc42 in three-dimensional cultures; immunofluorescence to cytokeratin and vimentin. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The cells treated with TKI-258 showed a tendency to decrease gene expression of FGFR3b, VEGFR-1, PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$ . The RhoA and RhoB GTPases were seen externally to the actin cortex (active form) in control cells and treated with TKI-258. Rac1 was seen externally to the actin cortex (active form) in cells treated with TKI-258, but not in control cells. Cdc42 was not seen in control cells and treated with TKI-258. The percentage of positive treated cells decreased to cytokeratin and was similar for vimentin. The results showed that inhibition of signal transduction pathways with treatment with TKI-258 in oral squamous cell cells in vitro leads to a trend of decreased gene expression of *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFR $\alpha$* , and *PDGFR $\beta$* . However, it keeps the RhoA, RhoB and Rac1 GTPases in their active form. Also, it reduces the amount of cells positive for cytokeratin, while vimentin is not affected.

**Keywords:** Cdc42 GTPase; Rac1 GTPase; RhoA GTPase; RhoB GTPase; oral cancer



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Citoesqueleto e seus componentes.....                                                                                                                           | 27 |
| <b>Figura 2.</b> Receptores tirosina-quinase.....                                                                                                                                | 29 |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismos de ação dos inibidores tirosina-quinase em células tumorais.....                                                                                     | 30 |
| <b>Figura 4.</b> Inibição do múltiplos receptores-tirosina quinase pelo TKI 258.....                                                                                             | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Regulação das Rho GTPases.....                                                                                                                                  | 32 |
| <b>Figura 6.</b> Efeito do TKI-258 sobre a expressão gênica dos receptores: FGFR3b, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ e VEGFR-1 em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral..... | 46 |
| <b>Figura 7.</b> Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase RhoA em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel <sup>®</sup> .....             | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase RhoB em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel <sup>®</sup> .....             | 48 |
| <b>Figura 9.</b> Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase Rac1 em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel <sup>®</sup> .....             | 49 |
| <b>Figura 10.</b> Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase Cdc42 em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel <sup>®</sup> .....           | 50 |
| <b>Figura 11.</b> Efeito do TKI-258 sobre o percentual de células positivas para citoqueratina em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.....                               | 51 |
| <b>Figura 12.</b> Efeito do TKI-258 sobre o percentual de células positivas para vimentina em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.....                                   | 52 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

ANOVA - Análise de variância  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
ATP - Adenosina trifosfato  
BrdU - *5-bromo-2'-deoxyuridine*  
BSA - *Albumin solution from bovine serum*  
DAPI - *4',6-diamidino-2-fenilindole*  
DMEM F-12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*  
DMSO - *Dimethylsulfoxide*  
DPBS - *Dulbecco's salina tamponada fosfatada*  
FGFs - Fatores de crescimento de fibroblastos  
FGFRs - Receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos  
FGFR1 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1  
FGFR2 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2  
FGFR3 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3  
FGFR4 - Receptor do fator de crescimento de fibroblasto 4  
GAPs - Proteínas ativadoras de GTPases  
GDIs- Inibidores de dissociação de nucleotídeos guanina  
GEFs – Fatores de troca dos nucleotídeos de guanina  
GPCRs - Receptores acoplados à proteína G  
PDGFs - Fatores de crescimento derivados de plaquetas  
PDGF A - Fator de crescimento derivado de plaquetas A  
PDGF B - Fator de crescimento derivado de plaquetas B  
PDGF C - Fator de crescimento derivado de plaquetas C  
PDGF D - Fator de crescimento derivado de plaquetas D  
PDGFRs - Receptores dos fatores de crescimento derivados de plaquetas  
PDGFR $\alpha$  - Receptor do fator de crescimento derivados de plaquetas  $\alpha$   
PDGFR $\beta$  - Receptor do fator de crescimento derivados de plaquetas  $\beta$   
PI3K - Proteína fosfoinosítídeo 3-quinase  
PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bi-fosfato  
PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato  
PLK1 - Quinase tipo polo 1  
PTEN - Fosfatase e homólogo de tensinas  
RTKs - Receptores tirosina-quinases  
SFB - Soro fetal bovino

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

VEGFs - Fatores de crescimento endoteliais vasculares

VEGFA - Fator de crescimento endotelial vascular A

VEGFB - Fator de crescimento endotelial vascular B

VEGFC - Fator de crescimento endotelial vascular C

VEGFD - Fator de crescimento endotelial vascular D

VEGFE - Fator de crescimento vascular endotelial E

VEGFRs- Receptores dos fatores de crescimento endoteliais vasculares

VEGFR 1 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1

VEGFR 2 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

VEGFR 3 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3

Vps34- Proteína vacuolar 34

## SUMÁRIO

---

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                        | <b>20</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                                            | <b>22</b> |
| 2.1. Mucosa oral.....                                                                                                                            | 23        |
| 2.2. Carcinoma epidermoide oral .....                                                                                                            | 24        |
| 2.3. Citoesqueleto e carcinoma epidermoide oral .....                                                                                            | 26        |
| 2.4. TKI-258.....                                                                                                                                | 28        |
| 2.5. GTPases Rho e carcinoma epidermoide oral .....                                                                                              | 32        |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                                                                     | <b>34</b> |
| <b>4. HIPÓTESE .....</b>                                                                                                                         | <b>36</b> |
| <b>5. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                        | <b>38</b> |
| 5.1. Objetivo geral.....                                                                                                                         | 39        |
| 5.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                  | 39        |
| <b>6. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                | <b>40</b> |
| 6.1. Casuística .....                                                                                                                            | 41        |
| 6.2. Avaliação do efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica dos receptores: FGFR3b, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ e VEGFR-1 .....   | 41        |
| 6.3. Avaliação do efeito do TKI-258 sobre a ativação de GTPases Rho em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel® ..... | 42        |
| 6.4. Ensaio de citodiferenciação .....                                                                                                           | 43        |
| 6.5. Análise Estatística .....                                                                                                                   | 44        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                        | <b>45</b> |
| <b>8. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                        | <b>53</b> |
| <b>9. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                        | <b>58</b> |
| <b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                       | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

---

O carcinoma epidermoide oral se origina no epitélio de revestimento da mucosa oral, sendo considerado o sexto tipo de neoplasia maligna mais prevalente no mundo (BINMADI; BASILE, 2011; LÓPEZ-CEDRÚN; ANDRÉS DE LLANO, 2015) e representa estatisticamente a maioria das lesões malignas da região de cabeça e pescoço (THOMSON, 2018). Acomete preferencialmente o sexo masculino, sofrendo importante influência de fatores ambientais mutagênicos (INCA, 2022). A língua é o sítio mais frequente, com cerca de 20% a 40% dos casos, seguido pelo assoalho da boca, região ventral-lateral da língua e o palato mole (BROUMAND; LOZANO; GOMEZ, 2006).

O carcinoma surge em decorrência de mutações espontâneas do DNA dos queratinócitos, mas passíveis a sofrer influência de diversos fatores externos mutagênicos, levando a progressão de uma célula normal para células pré-malignas ou potencialmente malignas, originando o carcinoma epidermoide oral (SCULLY; BAGAN, 2009). A célula adquire um potencial de migração e invasão, podendo atingir estruturas a distância, por via hematogênica, linfática ou mesmo por contiguidade, formando metástases (ALBINI; NOONAN, 2010). Esse comportamento das células é regulado pela ligação de moléculas extracelulares aos receptores da membrana celular, ativando uma ou mais vias de sinalização intracelular, levando à ativação de proteínas efetoras (BELOV; MOHAMMADI, 2013; DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014).

Os inibidores tirosina-quinases são pequenas moléculas hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana celular e competirem pelo sítio da adenosina trifosfato (ATP) no domínio intracelular do receptor tirosina-quinase, impedindo a autofosforilação e a ativação desse receptor e, conseqüentemente, a transdução do sinal e a ativação de suas efetoras GTPases Rho (GOTINK; VERHEUL, 2010).

O TKI-258 é um inibidor tirosina-quinase que bloqueia três diferentes famílias de receptores de fatores de crescimento: receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs), receptores de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFRs) e receptores de fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGFRs) (PORTA et al., 2015). No carcinoma epidermoide oral, há uma amplificação e/ou superexpressão de FGFRs (XIE et al., 2016), PDGFRs (CIERPIKOWSKI et al., 2018) e VEGFRs (TROELTZSCH et al., 2015), o que os torna alvos atraentes para o tratamento dessa neoplasia.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1. Mucosa oral

A cavidade bucal é a porta natural de entrada de alimentos para o organismo e a abertura do sistema digestório. É constituída por uma cavidade virtual, o Vestíbulo (região das gengivas e arcadas dentárias), e uma cavidade real, a cavidade oral propriamente dita. Tem funções básicas e essenciais, como a mastigação, fonação e deglutição (AZEVEDO et al., 2016) . Localiza-se anatomicamente no terço inferior da face e comunica-se com o exterior pela abertura oral e com a parte oral da faringe (orofaringe) através de uma abertura ampla denominada istmo da garganta ou das fauces. Tem como limites anterior e lateralmente os lábios e bochechas; posteriormente o istmo da garganta; superiormente o palato e inferiormente o assoalho da boca, onde encontramos a língua (MADEIRA; LEITE; RIZZOLO, 2016). A mucosa oral é constituída por epitélio estratificado pavimentoso, podendo ser classificado em queratinizado, não queratinizado e paraqueratinizado. O tecido conjuntivo que forma a lâmina própria é composto por fibras colágenas, fibroblastos, células de defesa, vasos sanguíneos e nervos. Os dois tecidos interagem por meio das papilas conjuntivas da lâmina própria e as cristas epiteliais que se formam no epitélio sobrejacente (SPERBER, 2018).

A divisão da mucosa em três grandes grupos está relacionada ao tipo de epitélio que reveste o tecido conjuntivo subjacente. Nas regiões nas quais são maiores os impactos sofridos pela mastigação, a mucosa deve ser mais firme e resistente e, portanto, recoberta por um epitélio que pode variar entre o paraqueratinizado e o queratinizado. Nas áreas nas quais a demanda mastigatória não é tão grande, o epitélio de revestimento é normalmente bastante fino e composto por células não queratinizadas. A região lingual distingue-se das demais áreas da cavidade bucal por apresentar uma grande quantidade de botões gustativos e, por esta razão, a região do dorso da língua é classificada como mucosa especializada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

## 2.2. Carcinoma epidermoide oral

O carcinoma epidermoide é o tipo principal das neoplasias do lábio e da cavidade oral, representando mais de 95% dos casos. As características histopatológicas incluem a invasão progressiva em profundidade (que se correlaciona com o risco de metástase ganglionar no carcinoma de língua), bordas infiltrativas, tumores pouco diferenciados e invasão perineural e linfovascular. A língua é o sítio mais frequentemente acometido, seguido pelo palato mole e assoalho da boca (DE MORAIS et al., 2017). Mundialmente, é considerado o sexto tipo de câncer mais comum, correspondendo a aproximadamente 6% dos casos, e está associado a altas taxas de mortalidade (ECONOMOPOULOU et al., 2016). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) declara que para cada ano do triênio 2020/2022 foram diagnosticados no Brasil 15.190 novos casos de câncer de boca e orofaringe, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2019; INCA, 2022).

A fisiopatologia do carcinoma epidermoide oral é complexa e multifatorial. O tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco. O número de casos em fumantes chega a ser de duas a três vezes maior que entre não fumantes. Evidências demonstram haver sinergismo entre tabagismo e etilismo, o que potencializa o risco (PORTER et al., 2018). Em relação a bebidas alcoólicas, evidências mostram que o acetaldeído, o principal e mais tóxico metabólito do álcool, interrompe a síntese e o reparo do DNA e, portanto, pode favorecer a carcinogênese. Além disso, maior exposição ao etanol também induz o estresse oxidativo por meio do aumento da produção de oxigênio com potencial reativo e genotóxico. Sugere-se, ainda, que o álcool possa funcionar como um solvente, favorecendo a penetração celular de carcinógenos dietéticos ou ambientais (por exemplo, tabaco) ou interferindo nos mecanismos de reparo do DNA. Pessoas que consomem bebidas alcoólicas em altas quantidades também podem ter dietas carentes de nutrientes essenciais, como o folato, tornando os tecidos-alvo mais suscetíveis aos efeitos carcinogênicos do álcool. O excesso de gordura corporal (definido pelo IMC, circunferência de cintura e relação cintura/quadril elevados) aumenta o risco de desenvolver câncer de boca. Os mecanismos específicos para descrever essa relação ainda não estão esclarecidos. No entanto, o excesso de gordura corporal está associado a alterações metabólicas e endócrinas, como hiperinsulinemia e níveis elevados de estrogênio. A insulina e o estrogênio estimulam a multiplicação celular e inibem a apoptose, levando à proliferação celular aumentada. Além disso, a obesidade também estimula a resposta inflamatória, favorecendo a carcinogênese (INCA, 2018; INCA, 2022). Outro fator determinante para o

desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral é a idade, visto que essa neoplasia é mais frequente em indivíduos a partir dos 50 anos (MORO et al., 2018; TANDON et al., 2017). A maior incidência é observada entre a quinta e sexta década de vida (NAZIR et al., 2016). Além disso, a idade também desempenha um papel crucial na sobrevida, uma vez que pacientes mais jovens apresentam uma melhor taxa de sobrevivência em relação aos pacientes mais velhos (MAHMOOD et al., 2018).

O diagnóstico do câncer oral pode ser realizado pelo exame clínico, seguido pela biópsia da lesão ou por exame de imagem. O estadiamento baseia-se principalmente na oroscopia, na palpação dos linfonodos cervicais e nos exames de imagem, para avaliar a extensão do tumor para tecidos profundos, acometimento de estruturas locais, presença de linfonodos metastáticos e metástases a distância. A forma internacionalmente aceita para o estadiamento das lesões segue a classificação TNM (tumor-node-metastasis) da American Joint Committee on Cancer (CSERNI et al., 2018).

Geralmente, tumores em estágio inicial são tratados com cirurgia ou radioterapia; já os tumores em estágios mais avançados requerem uma combinação entre cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (MACHIELS et al., 2014). Apesar dos avanços, o carcinoma epidermoide oral ainda é um câncer agressivo, com propensão para gerar metástases e associado a um grande número de mortes (THOMSON, 2018). Sendo assim, há a necessidade do desenvolvimento de fármacos que bloqueiem as vias de sinalização envolvidas na carcinogênese dessa neoplasia (YING et al., 2006).

### 2.3. Citoesqueleto e carcinoma epidermoide oral

O citoesqueleto é uma rede complexa de fibras proteicas localizada no citoplasma das células, que participa dos processos de plasticidade, transporte e sinalização celular, além de ser o principal determinante da morfologia celular (BRAY; GILBERT, 1981). Ele é constituído por microtúbulos, filamentos de actina (microfilamentos) e filamentos intermediários. O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica, sendo mantida por interações fracas, o que permite que se decomponha em uma região da célula e reestruture em outra. Por serem constituídos por subunidades pequenas, o seu processo de associação e distribuição ocorre de maneira rápida (HALL, 2009) (Figura 1).

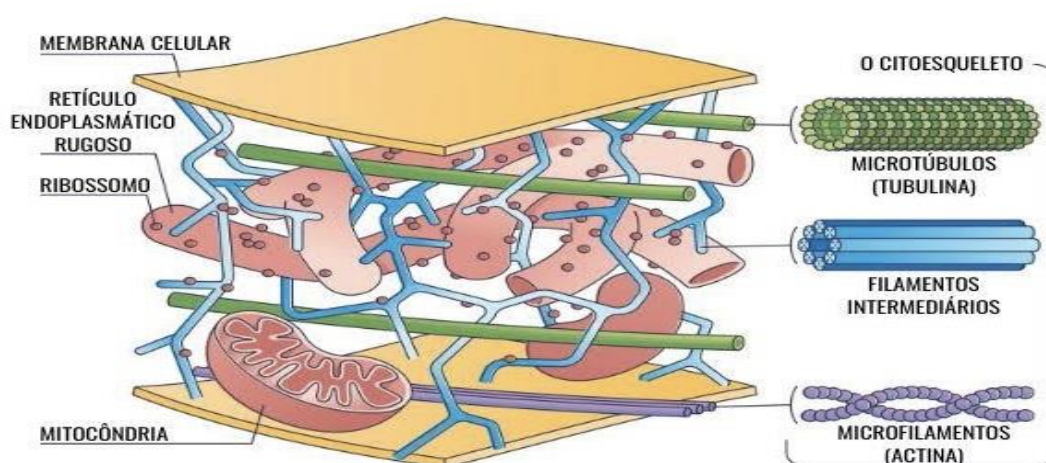
Os microtúbulos são constituídos por moléculas da proteína  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina e formam tubos ocos de 25 nm de diâmetro. Estão presentes no citoplasma e em prolongamentos celulares como cílios e flagelos. Entre as suas funções, podemos citar a manutenção da célula, formação do fuso mitótico, formação e movimentação dos cílios e flagelos e o movimento das organelas e dos cromossomos durante o processo de mitose (EITZEN, 2003).

Os filamentos de actina também são chamados de microfilamentos e são constituídos por actina formando espirais que medem cerca de 7 nm de diâmetro. Dentre as funções, destacamos a manutenção, bem como a alteração da forma e da movimentação da célula e, no citoplasma, contração e divisão celular (MENG; MOROISHI; GUAN, 2016).

Os filamentos intermediários apresentam diâmetro entre 8 e 12 nm e são constituídos por mais de 50 tipos diferentes de proteínas, como a queratina, vimentina e desmina. Esses filamentos são menos dinâmicos que os demais e estão relacionados com a manutenção da forma da célula, formação da lâmina nuclear e ancoragem de diversas organelas no citoplasma (GOLDSTEIN; THERIOT, 2001).

As mais notáveis alterações morfológicas que ocorrem no citoplasma de uma célula neoplásica envolvem o citoesqueleto. Enquanto uma célula normalmente contém uma organizada rede de microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, o citoesqueleto da célula neoplásica é desorganizado e com redução de conteúdos dessas organelas. Muitas mudanças morfológicas também são observadas na superfície da célula, incluindo o aparecimento (ou desaparecimento) de componentes específicos. Algumas células neoplásicas possuem novas proteínas de superfícies, conhecidas por antígenos associados a tumores, que

induzem a formação de anticorpos específicos contra as células. Porém, quando as ações desses anticorpos se tornam insuficientes, as células cancerosas crescem em número e se tornam tumorais. Essas mudanças nas superfícies das células neoplásicas alteram a adesividade para com outras células teciduais bem como com substratos não celulares (proteínas de adesão). Assim, a perda da adesividade permite que as células cancerosas se destaquem da massa tumoral e migrem para outros tecidos e órgãos do corpo, cujo processo é conhecido por metástase (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014).



**Figura 1. Citoesqueleto e seus componentes.** Microtúbulos, filamentos intermediários e os microfilamentos. Fonte: Adaptado (SAKURRA, 2006).

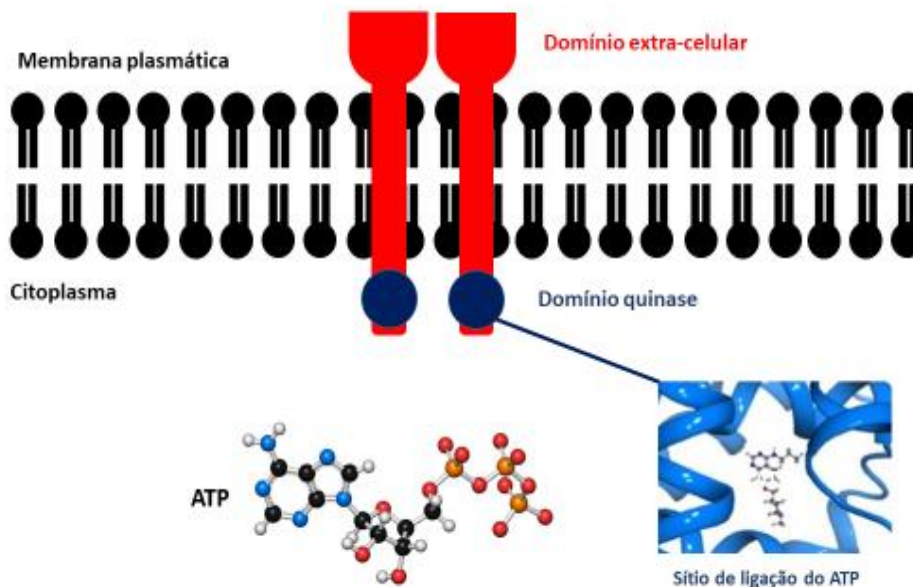
## 2.4. TKI-258

Das diversas reações celulares que modulam as funções fisiológicas, uma delas é a transferência de um grupo fosfato para uma determinada proteína, mediada por enzimas denominadas quinases. As proteínas-quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr). A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas e algumas delas estão associadas à indução da carcinogênese (BHULLAR et al., 2018).

As tirosinas-quinases atuam em vias de sinalização iniciadas através dos seus receptores, que são um grande e heterogêneo grupo localizados na membrana celular que respondem principalmente a mediadores proteicos como, por exemplo, os fatores de crescimento. Esses receptores possuem um domínio extracelular ou N-terminal, no qual se liga um ligante, um domínio transmembrana e um domínio intracelular ou C-terminal que possui atividade tirosina-quinase (HU; LIU; JIANG, 2015).

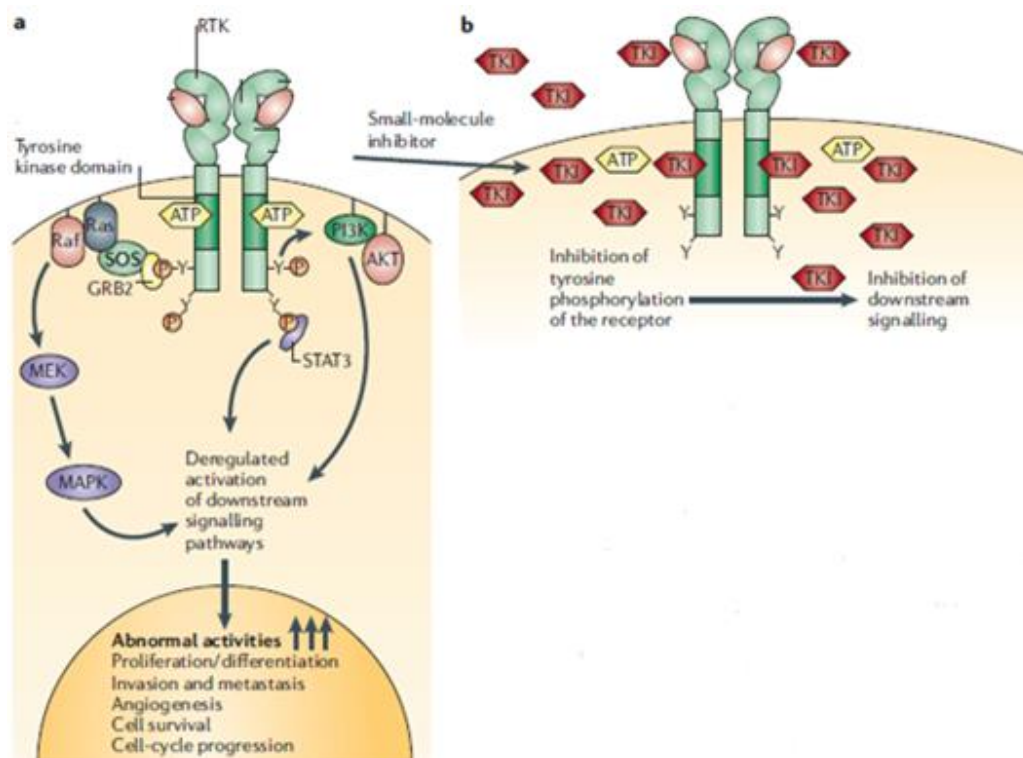
Quando um ligante como os fatores de crescimento é reconhecido pelo domínio extracelular, ocorre uma mudança conformacional que resulta na dimerização do receptor e autofosforilação do domínio intracelular. Desta forma, a tirosina fosforilada é um local de ligação e ativação para proteínas intracelulares que propagam os sinais da superfície até o núcleo. A fosforilação intracelular inicia uma cascata de reações citoplasmáticas que resultam em respostas celular (ARORA; SCHOLAR, 2005) (Figura 2).

Os receptores tirosina-quinases regulam vias de sinalização envolvidas em processos celulares importantes como proliferação e migração celular, sobrevivência e angiogênese. Porém, esses receptores podem sofrer mutações e ficar desregulados e, assim, desencadear doenças, como o câncer, nas quais geralmente ocorre a amplificação e/ou superexpressão desses receptores com mutações (HU; LIU; JIANG, 2015).



**Figura 2. Receptor tirosina quinase.** Domínio extra-celular e o domínio quinase, onde é feita a transferência do grupo fosfato, para início da cascata da sinalização intracelular. Fonte: Do autor, 2023.

Os receptores tirosina-quinases estão amplificados em carcinoma epidermoide oral (OIKAWA et al., 2017) e superexpressos em carcinoma de cabeça e pescoço (ELFERINK; RESTO, 2011). Sendo assim, o reconhecimento dos mecanismos envolvidos na desregulação desses receptores conduziu a terapêutica com os inibidores tirosina-quinases (GOTINK; VERHEUL, 2010). Os inibidores tirosina-quinases são pequenas moléculas hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana celular e competirem pelo sítio do ATP no domínio intracelular ou C-terminal dos receptores tirosina-quinases (IMAI; TAKAOKA, 2006). Eles agem diretamente no local de ligação do ATP por meio de pontes de hidrogênio e indiretamente através de um sítio alostérico impossibilitando a associação do ATP. Consequentemente, a tirosina-quinase não consegue transferir fosfato para o resíduo tirosina e não ocorre a autofosforilação e ativação do receptor (GOTINK; VERHEUL, 2010) (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismos de ação dos inibidores tirosina quinases em células tumorais.** a) Após a ativação do receptor tirosina quinase (RKT) pela ligação do ligante no domínio extracelular ou N-terminal, as vias de sinalização intracelulares Ras-Raf-MEK-MAPK e PI3K-AKT são ativadas, assim como as proteínas STAT1, STAT3 e STAT5. Os efeitos coordenados destas vias de sinalização intracelulares levam à indução de respostas celulares incluindo proliferação, diferenciação, motilidade, adesão e angiogênese. A desregulação da sinalização mediada pelos RKTs em células tumorais leva à proliferação, invasão, metástases e neovascularização exacerbadas. b) Inibidores tirosina quinase (TKIs) atuam como análogos do ATP e inibem a sinalização do RKT por meio da competição pela ligação do ATP no domínio intracelular e através de um sítio alostérico impossibilitando a associação do ATP. Como resultado, a ativação de várias vias de sinalização é bloqueada. Cada TKI apresenta uma seletividade diferente para RTK, e alguns são multi-seletivos, o que pode fornecer uma vantagem terapêutica. Adaptado de IMAI e TAKAOKA, 2006.

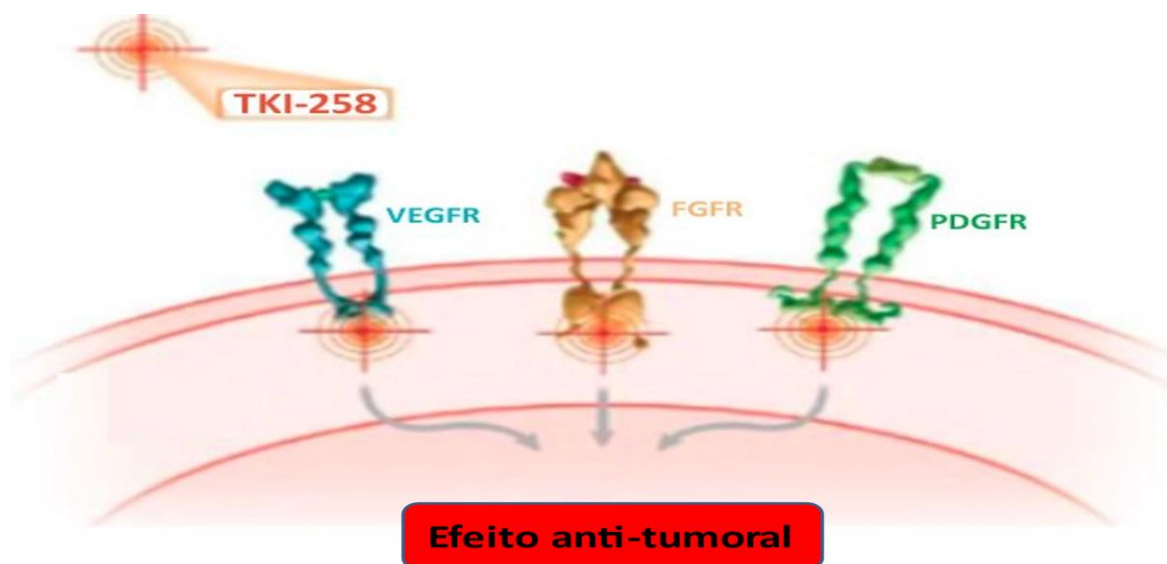
O TKI-258 é um inibidor tirosina-quinase que possui atividade inibitória sobre os FGFRs, PDGFRs e VEGFRs (RENHOWE et al., 2009). Os dados *in vivo* e *in vitro* indicam que o TKI-258 bloqueou a sinalização dos FGFRs, PDGFRs, VEGFRs em câncer urotelial (QING et al., 2009), câncer de mama avançado (ANDRÉ et al., 2013) e câncer pancreático (ZANG et al., 2015), através do comprometimento do crescimento tumoral (HÄNZE et al., 2013).

Atualmente são conhecidas 18 proteínas que constituem a família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Elas podem se ligar em quatro tipos de FGFRs: FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 (HUI et al., 2018). A via de sinalização FGF-FGFR regula vários processos fisiológicos. Um deles é a proliferação celular, entretanto a amplificação e/ou superexpressão desses receptores pode desencadear o câncer, visto que eles estão desregulados em aproximadamente 7% dos tumores sólidos (GHEDINI et al., 2018).

A família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) é composta por quatro isoformas: PDGFA, PDGFB, PDGFC e PDGFD, que se ligam aos PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  (DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014). Em condições fisiológicas, estes receptores estão envolvidos principalmente na regulação da embriogênese, entretanto, durante a carcinogênese, desencadeiam o aumento da proliferação celular (HELDIN; LENNARTSSON; WESTERMARK, 2018).

Os fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGFs) – VEGFA, VEGFB, VEGFC e VEGFD – são encontrados em mamíferos e podem se ligar em três membros dos VEGFRs, VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (KARAMAN; LEPPÄNEN; ALITALO, 2018). Possivelmente devido ao papel importante na regulação da angiogênese, tanto fisiológica quanto patológica, essa via de sinalização está relacionada a um rápido crescimento tumoral (SHIMIZU et al., 2018).

Desta forma, devido à inibição múltipla destas três famílias de receptores tirosina-quinases, o TKI-258 possui um efeito antitumoral promissor, tanto diretamente através do bloqueio das vias de sinalização FGFs/FGFRs e PDGFs/PDGRs, quanto por sua atividade antiangiogênica por meio da inibição de VEGFs/VEGFRs (SANG et al., 2005) (Figura 4).

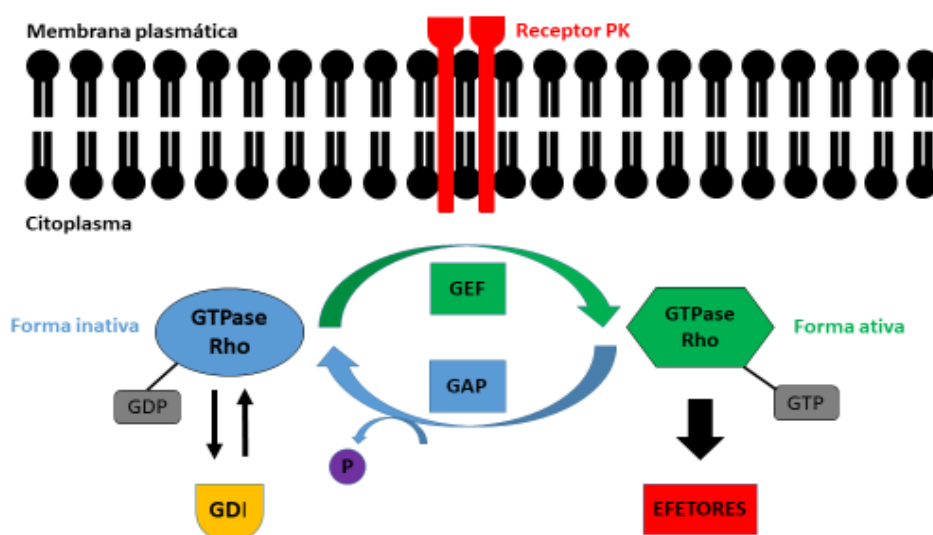


**Figura 4. Inibição múltipla dos receptores tirosina-quinases pelo TKI-258.** A inibição dos receptores VEGFR, FGFR e PDGFR apresentam um importante efeito antitumoral. Fonte: Adaptado de IMAI e TAOKA, 2006.

## 2.5. GTPases Rho e carcinoma epidermoide oral

As GTPases Rho são pequenas proteínas de sinalização, correspondendo a uma das cinco subfamílias da superfamília Ras: Arf, Ras, Rab, Ran e Rho. O gene *Rho* foi identificado em 1985 em espécie do gênero *Aplysia* e, logo depois, foram encontrados 18 genes que as codificam no genoma humano (ROJAS et al., 2012). Elas contribuem para vários processos celulares, incluindo a organização dos citoesqueletos de actina, regulação da expressão gênica, progressão do ciclo celular, morfogênese, polaridade e migração celular (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). Além disso, as Rho GTPases também desempenham um papel importante em processos patológicos, incluindo progressão do câncer, inflamação e reparo de feridas (AZNAR et al., 2004).

As subfamílias Rac, RhoA, RhoB e Cdc 42 atuam como interruptores moleculares, alternando entre uma forma ativa ligada ao GTP e uma forma inativa ligada ao GDP, e as principais proteínas que regulam essa atividade, são os fatores de troca dos nucleotídeos (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e os inibidores da dissociação de nucleotídeos de guanina (GDIs) (VEGA; RIDLEY, 2008) (Figura 5).



**Figura 5. Regulação das Rho GTPases.** GEFs catalisam a troca de GDP para GTP, enquanto as GAPs estimulam a inativação, através da hidrólise de GTP a GDP. GDIs se ligam a essas proteínas em seu estado inativo e as sequestram no citosol, impedindo sua ligação com moléculas efetoras. Fonte: Do autor, 2023.

Estudos mostram que RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 evidenciadas em carcinomas de cabeça e pescoço, tanto em culturas primárias, quanto em linhagens celulares, participam do controle do citoesqueleto de actina, regulando adesão celular, polaridade e motilidade, e encontram superexpressas. Outras análises revelaram que Rac1, em células de carcinoma de cabeça e pescoço, pode ser ativada através do um receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) sendo então independente de sinalização celular. Estes resultados sugerem que a inibição de Rac1 ou de seus efetores podem viabilizar novas terapêuticas para prevenção de metástase (ADNANE et al., 2002; PATEL et al., 2007). A GTPase RhoB parecer ser suprimida pelo gene *mIR-21* levando ao aumento de migração e invasão celular e a diminuição da apoptose (VEGA; RIDLEY, 2008).

A ativação das GTPases por meio dos GEFs é geralmente mediada pela sinalização dos RTKs e dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que, no câncer, também são superexpressos (ROSSMAN; DER; SONDEK, 2005). As proteínas GTPases Rho estão envolvidas em diversos estágios da tumorigênese por estarem superativadas e o envolvimento de muitos fatores de crescimento oriundos do microambiente tumoral também interferem na ativação das proteínas Rho, como o ácido lisofosfatídico (LPA) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (SAHAI; MARSHALL, 2003).

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

O carcinoma epidermoide oral é um tipo de lesão maligna de cabeça e pescoço e cursa com altas taxas de morbidade e mortalidade (ECONOMOPOULOU et al., 2016; THOMSON, 2018). Os protocolos atuais para o tratamento desse câncer incluem intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. Porém, esses métodos causam numerosos efeitos adversos e o prognóstico depende da ressecabilidade do tumor (MONTERO; PATEL, 2015), bem como da presença e extensão de metástases linfonodais (BLATT et al., 2017) e os métodos invasivos podem ser desfigurantes e dificultar funções importantes como a nutrição, a fonação e a respiração (PARÉ; JOLY, 2017). Além disso, a resistência das células cancerígenas aos tratamentos disponíveis é um grande dificultador no tratamento do câncer (SARASWATHY; GONG, 2013). Sendo assim, a busca contínua por novos tratamentos para o câncer é claramente necessária.

O TKI-258, que têm propensão para bloquear alvos múltiplos, é uma terapêutica promissora para carcinoma epidermoide oral. A caracterização das proteínas envolvidas na via de sinalização inibida pelo inibidor de receptores tirosina-quinases TKI-258 é de grande importância antes que possam ser realizadas pesquisas clínicas. Deste modo, o estudo da expressão gênica das isoformas FGFR3b, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  e VEGFR-1; a identificação do estado funcional das GTPases RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 envolvidas nessas vias de sinalização; e a alteração da citodiferenciação poderão levar a um grande avanço do conhecimento sobre o TKI-258, tendo em vista que essas vias de transdução de sinal desempenham um papel importante na tumorigênese do carcinoma epidermoide oral.

#### **4. HIPÓTESE**

---

A inibição da autofosforilação de FGFRs, VEGFRs e PDGFRs com o tratamento com TKI-258 em células da linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral leva à: diminuição da expressão gênica das isoformas *FGFR3b*, *PDGFR $\alpha$* , *PDGFR $\beta$*  e *VEGFR-1*; ativação das GTPases RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42; alteração da citodiferenciação, diminuindo a citoqueratina e aumentando a vimentina.

## 5. OBJETIVOS

---

### 5.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica de seus receptores-alvo, a ativação de suas efetoras GTPases Rho e a citodiferenciação em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

### 5.2. Objetivos específicos

- Comparar a expressão gênica dos receptores *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFR $\alpha$*  e *PDGFR $\beta$*  em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M por 24 horas.
- Verificar se o tratamento com TKI-258 a 5  $\mu$ M por 24 horas ativa as GTPases RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 em células SCC-4.
- Analisar a imunoexpressão de citoqueratina e vimentina as células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M por 24 horas.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 6.1. Casuística

Foram utilizadas células da linhagem de carcinoma epidermoide oral humano: SCC-4 (American Type Culture Collection - ATCC®). Por se tratar de estudo com linhagens de células comercialmente disponíveis, o uso das células SCC-4 não necessita da aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

As células SCC-4 foram cultivadas em: Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM-F12), soro fetal bovino (SFB) 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 400 ng/mL de hidrocortisona em incubadora úmida com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais, quando as células atingiram cerca de 70% de confluência.

### 6.2. Avaliação do efeito do tratamento TKI-258 sobre a expressão gênica dos receptores: FGFR3b, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ e VEGFR-1

Após 24 horas de tratamento com TKI-258 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) a 5 µM, foi adicionado Trizol<sup>®</sup> para isolamento do RNA total. As amostras foram homogeneizadas e mantidas a temperatura ambiente (TA) por cinco minutos. Foi adicionado clorofórmio, feita homogeneização, centrifugação e coleta da fase aquosa. Foi adicionado isopropanol e as amostras foram, então, centrifugadas. O sobrenadante foi removido e os pellets lavados com etanol 75%. Foi realizada nova centrifugação e os microtubos foram mantidos abertos para que os pellets de RNA secassem à TA. O RNA obtido em cada microtubo foi diluído na proporção de 1:30 e incubados em banho-maria a 55°-60°C. A quantificação das amostras foi realizada através do NanoDrop Lite.

A transcrição reversa foi feita após a preparação do mix do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription: 10X RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor e Nuclease-free H<sub>2</sub>O. Ao mix foram adicionadas as amostras de RNA e o “High Capacity cDNA Reverse Transcription”. A transcrição reversa foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler. A quantificação do cDNA de cada amostra foi feita através do NanoDrop Lite. As amostras de cDNA transcritas foram diluídas em H<sub>2</sub>O RNase free na concentração de 100 ng/µL.

Foram adicionados à placa Optical 96-Well Fast Plate: TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay mix 20X (Tabela 1), GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix e 100 ng/µL de cDNA das amostras por poço. Para

os poços brancos, foram adicionados apenas TaqMan® Gene Expression Assay mix 20X, GoTaq® qPCR Master Mix.

As placas foram seladas com MicroAmp™ Optical Adhesive Film, brevemente centrifugadas, e foi realizada a reação de qPCR em termociclador 7500 Real Time PCR System. O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi utilizado para calcular os níveis relativos de expressão gênica. Foram utilizados os genes de referência 18S e GAPDH para normalizar os resultados.

Tabela 1. TaqMan® Gene Expression Assay utilizados neste estudo.

| Assay ID      | Gene          |
|---------------|---------------|
| Hs99999901_s1 | <i>18S</i>    |
| Hs03929097_g1 | <i>GAPDH</i>  |
| Hs00997397_m1 | <i>FGFR3b</i> |
| Hs01052937_m1 | <i>VEGFR1</i> |
| Hs00998026_m1 | <i>PDGFRα</i> |
| Hs01019589_m1 | <i>PDGFRβ</i> |

### 6.3. Avaliação do efeito do TKI-258 sobre a ativação de GTPases Rho em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®

Cerca de  $1 \times 10^4$  células SCC-4, controle e tratadas por poço, foram ressuspensas em Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) 1:2 DMEM-F12/SFB10%. Os géis foram aplicados, conforme instruções do fabricante ( $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ), sobre lamínulas em placa de seis poços. As células-controle e tratadas TKI-258 a  $5 \mu\text{M}$  e ácido lisofosfatídico (LPA) a  $100 \mu\text{M}$  foram incubadas por 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5%  $\text{CO}_2$ /95% ar a  $37^\circ\text{C}$ .

Após o período de tratamento, as células foram: lavadas com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D-PBS (KCl 2,67 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 mM, NaCl 138 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8,1 mM), por cinco minutos; fixadas com paraformaldeído 4% por uma hora; permeabilizadas D-PBS/Triton X-100 0,2% por cinco minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com albumin solution from bovine serum (BSA) 3% por 20 minutos. Foi feita a incubação com os anticorpos primários coelho antiRhoA, antiRhoB, antiRac1 e antiCdc 42 na diluição de 1:50 em D-PBS/BSA 0,1% por 16 h e a incubação com anticorpo secundário anticoelho marcado com Alexa 488 diluído 1:1000 em D-PBS/BSA 0,1% por duas horas. O citoesqueleto de actina foi evidenciado com rodamina conjugada à faloidina, 1:100 D-PBS por 30 minutos. Os núcleos foram evidenciados com DAPI 1:500 por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com glicerol carbonato.

Para avaliação da ativação de GTPases Rho, as reações de imunofluorescência foram analisadas qualitativamente em toda a extensão das lamínulas por microscopia confocal de varredura a laser (Leica TCS SP8 DMI8, Wetzlar, LD, Alemanha) com objetiva de imersão em óleo HC PL APO 63x/1.40 utilizando: laser Diodo 405 em 410 nm para a evidênciação dos núcleos marcados com DAPI; laser Argônio em 488 nm para a evidênciação do citoesqueleto de actina com rodamina conjugada à faloidina e laser DPSS 561 em 561 nm para a imunomarcação das GTPases Rho. Cada imagem tridimensional foi construída a partir de 50 fatias capturadas ao longo do eixo Z nos três canais de fluorescência utilizando o *software* LasX (Leica, Wetzlar, LD, Alemanha).

#### **6.4. Ensaio de citodiferenciação**

Cerca de  $1 \times 10^4$  células SCC-4 por poço foram semeadas em lamínulas em placas de seis poços e mantidas em incubadora úmida com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>/95% de ar a 37°C. Após 24 horas, as células-controle receberam apenas meio, enquanto as células tratadas receberam meio com TKI-258 na concentração de 1, 5 e 10 µM. As placas foram mantidas por 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C.

As reações de imunofluorescência foram realizadas conforme descrito anteriormente, utilizando os anticorpos primários camundongo anticitoqueratina e antivimentina e anticorpo secundário cabra anticamundongo marcado com Alexa 488.

Para a morfometria, as reações de imunofluorescência para citoqueratina e vimentina foram analisadas, quantitativamente, em cinco campos aleatórios, de modo duplo cego, utilizando objetiva de 40x em microscópio de fluorescência AXIO Vert A1 (Zeiss, Götting, Lower Saxonu, Alemanha).

## 6.5. Análise Estatística

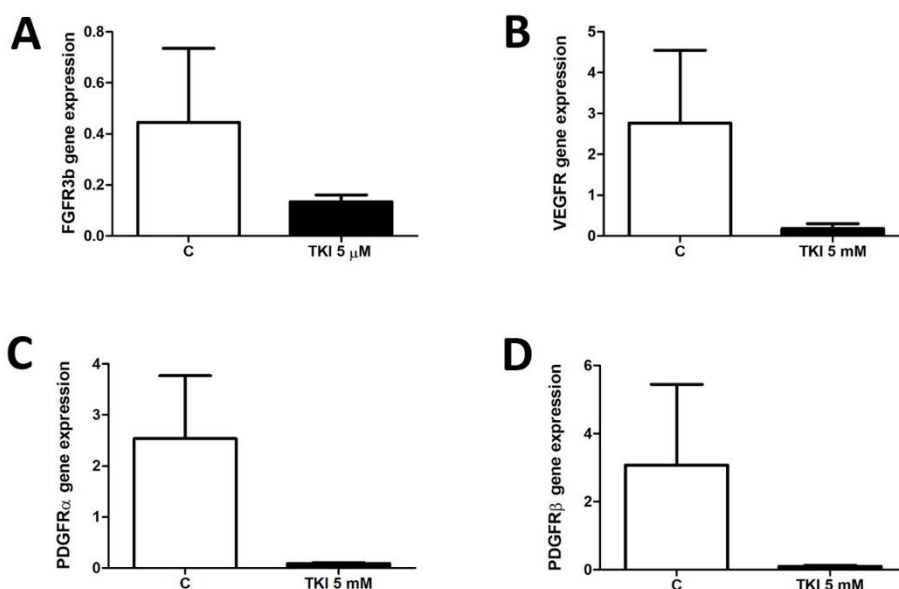
Os resultados foram analisados com o programa SPSS 20.0® e com o programa Graphpad Prism®. Para análise dos resultados de expressão gênica, foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov e Teste Mann-Whitney. Para a análise da diferenciação, foram utilizados os testes Shapiro-Wilk, teste de homogeneidade de variâncias de Levene, Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunnett C. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **7. RESULTADOS**

---

*Efeito do TKI-258 sobre a expressão gênica de: FGFR3b, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  e VEGFR-1*

Embora não tenha sido estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), as células SCC-4 tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M por 24 horas apresentaram uma tendência de diminuição da expressão gênica dos receptores-alvo desse inibidor tirosina-quinase. As células tratadas com TKI-258 apresentaram três vezes menos *FGFR3b*, quatro vezes menos *VEGFR-1*, 22 vezes menos *PDGFR $\alpha$*  e 16 vezes menos *PDGFR $\beta$* , quando comparadas às células-controle (Figura 6).



**Figura 6.** Efeito do TKI-258 sobre a expressão gênica dos receptores: *FGFR3b*, *PDGFR $\alpha$* , *PDGFR $\beta$*  e *VEGFR-1* em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

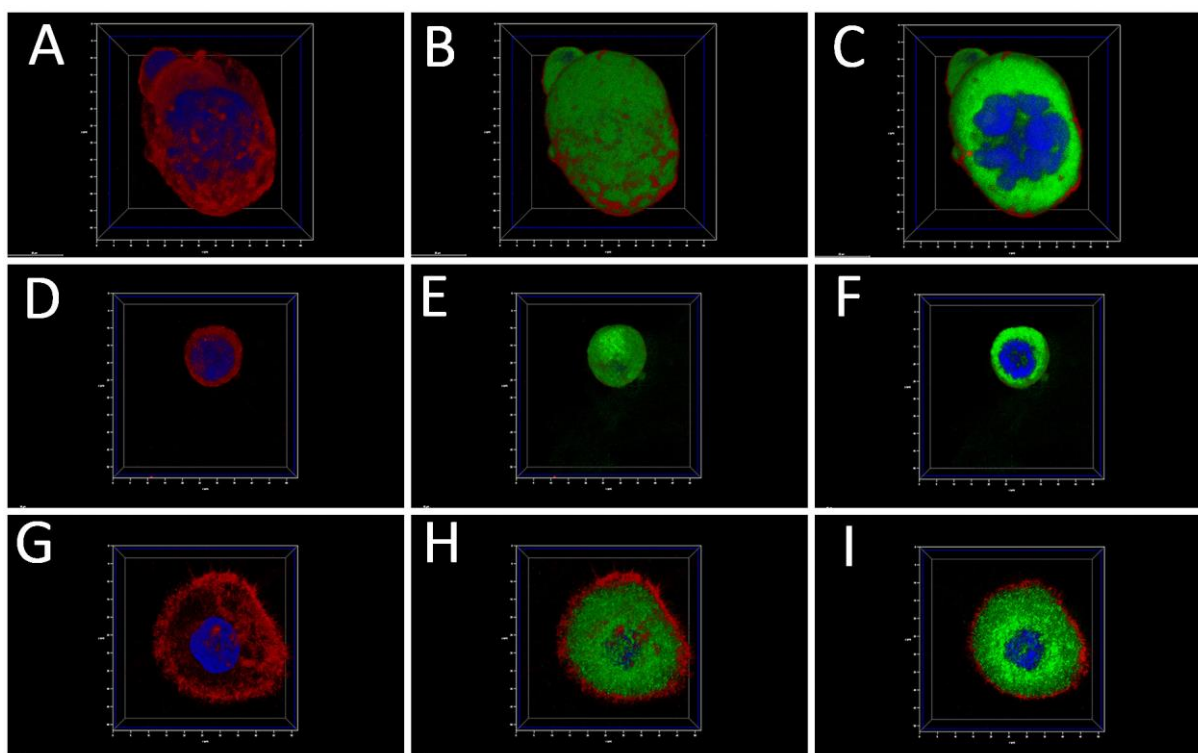
Células SCC-4 controle (C) e tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M (T) por 24 horas. Análise quantitativa da expressão gênica de *FGFR3b* (A), *PDGFR $\alpha$*  (B), *PDGFR $\beta$*  (C) e *VEGFR-1* (D). Teste Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .

*Efeito do TKI-258 sobre a ativação de GTPases Rho em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®*

A avaliação das imagens tridimensionais das células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, cultivadas em Matrigel® por 24h, permitiram avaliar a localização das proteínas GTPases Rho na porção de membrana (forma ativa) e na porção citoplasmática (forma inativa) de células-controle e tratadas com o inibidor tirosina-quinase TKI-258 na concentração de 5  $\mu$ M e com LPA a 100  $\mu$ M, conhecido por ativar as GTPases Rho.

*TKI-258 ativa a GTPase RhoA em culturas tridimensionais de células SCC-4*

As células do grupo controle apresentaram o córtex de actina bem desenvolvido (Figura 7A). RhoA ativa foi vista externamente ao córtex de actina (Figura 7B). Na secção realizada ao nível do núcleo, RhoA apareceu dispersa em todo o citoplasma (Figura 7C). As células tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M apresentaram o córtex de actina pouco desenvolvido e uma redução no tamanho evidente (Figura 7D). A GTPase RhoA ativa foi vista recobrindo todo o córtex de actina (Figura 7E). Na secção, a distribuição de RhoA foi homogênea no citoplasma (Figura 7F). As células tratadas com LPA 100  $\mu$ M apresentaram o córtex de actina muito desenvolvido e inúmeros filopódios (Figura 7G). Como esperado, RhoA ativa foi vista na fração de membrana, mas não foi observada nos filopódios (Figura 7H). Na secção, a distribuição da GTPase RhoA foi observada em todo o citoplasma, especialmente na região perinuclear (Figura 7I).

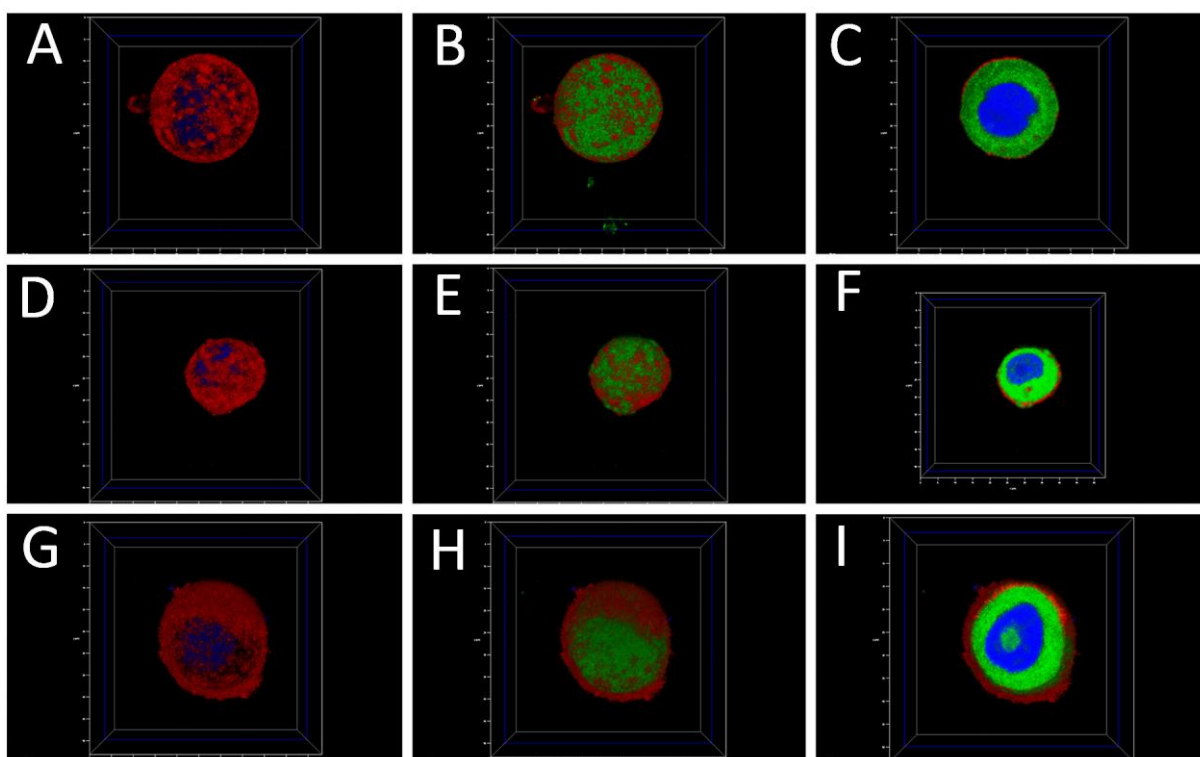


**Figura 7. Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase RhoA em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®.**

Imagens tridimensionais construídas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Análise do citoesqueleto de actina evidenciado com rodamina conjugada à faloidina (vermelho), imunomarcação da proteína GTPase RhoA (verde), e núcleos evidenciados com DAPI (azul). Células SCC-4 controle (A, B e C) e tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M (D, E, F) e com LPA 100  $\mu$ M por 24 horas.

*TKI-258 ativa a GTPase RhoB em culturas tridimensionais de células SCC-4*

O citoesqueleto de actina das células SCC-4, controle e tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M e LPA 100  $\mu$ M, foi observado conforme descrito anteriormente (Figura 8 A, D e G). A proteína GTPase RhoB na forma ativa foi vista recobrindo parcialmente o córtex de actina (Figura 8B). Na secção realizada ao nível do núcleo, a GTPase RhoB apareceu distribuída homogeneamente no citoplasma das células SCC-4 (Figura 8C). Em células tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M, a GTPase RhoB ativa foi observada externamente ao córtex de actina (Figura 8E). Na secção realizada ao nível do núcleo, a GTPase RhoB foi vista através de todo o citoplasma (Figura 8F). Conforme esperado, as células tratadas com LPA a 100  $\mu$ M apresentaram a GTPase RhoB na fração de membrana (Figura 8H). Na secção, a GTPase RhoB foi observada em todo o citoplasma e na região do nucléolo (Figura 8I).

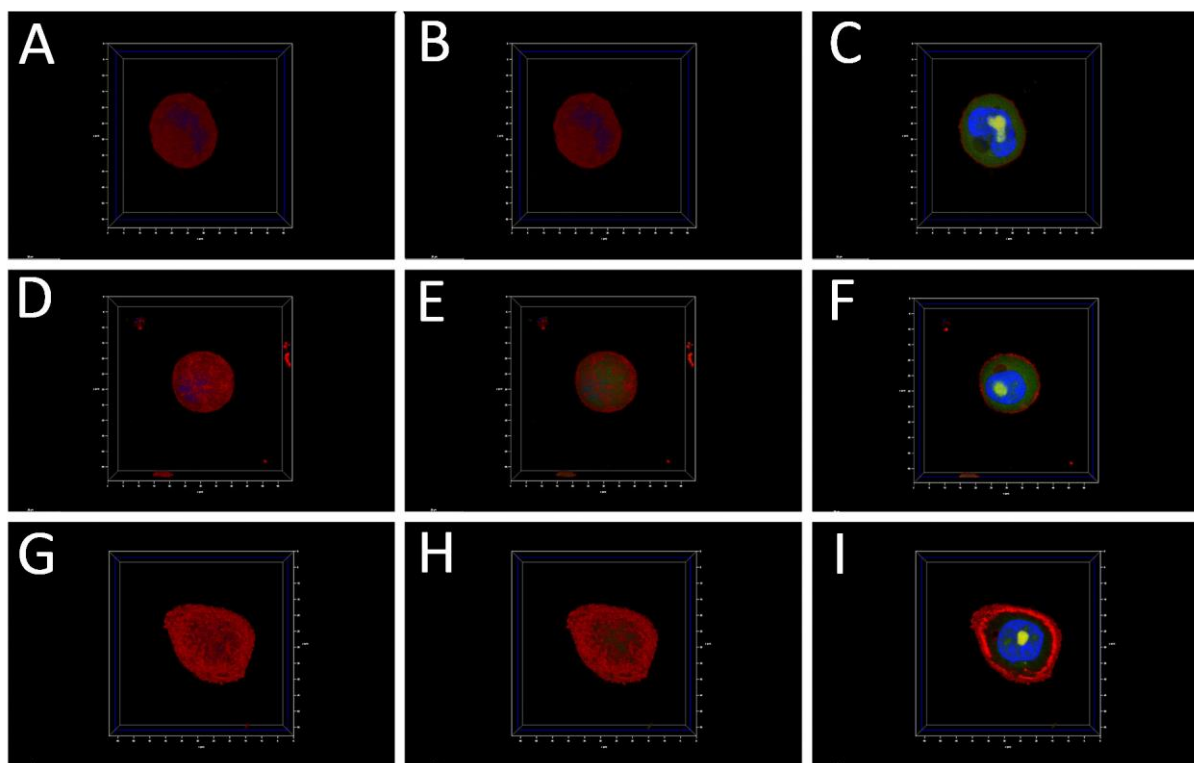


**Figura 8. Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase RhoB em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®.**

Imagens tridimensionais construídas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Análise do citoesqueleto de actina evidenciado com rodamina conjugada à faloidina (vermelho), imunomarcação da proteína GTPase RhoB (verde), e núcleos evidenciados com DAPI (azul). Células SCC-4 controle (A, B e C) e tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M (D, E, F) e com LPA 100  $\mu$ M por 24 horas.

*TKI-258 ativa a GTPase Rac1 em culturas tridimensionais de células SCC-4*

O citoesqueleto de actina das células SCC-4, controle e tratadas com: TKI-258 a 5  $\mu$ M e LPA 100  $\mu$ M, foi observado conforme descrito anteriormente (Figura 9 A, D e G). Nas células-controle, não foi vista a proteína GTPase Rac1 na forma ativa (Figura 9B) e, na secção realizada ao nível do núcleo, a GTPase Rac1 apareceu distribuída homogeneamente no citoplasma e, também, no nucléolo (Figura 9C). Em células tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M, a GTPase Rac1 ativa foi observada externamente ao córtex de actina (Figura 9E) e, na secção realizada ao nível do núcleo, a GTPase Rac1 foi vista através de todo o citoplasma e no nucléolo (Figura 9F). As células tratadas com LPA a 100  $\mu$ M não apresentaram a Rac1 na fração de membrana (Figura 9H) e, na secção, Rac1 apareceu dispersa no citoplasma e no nucléolo (Figura 9I).

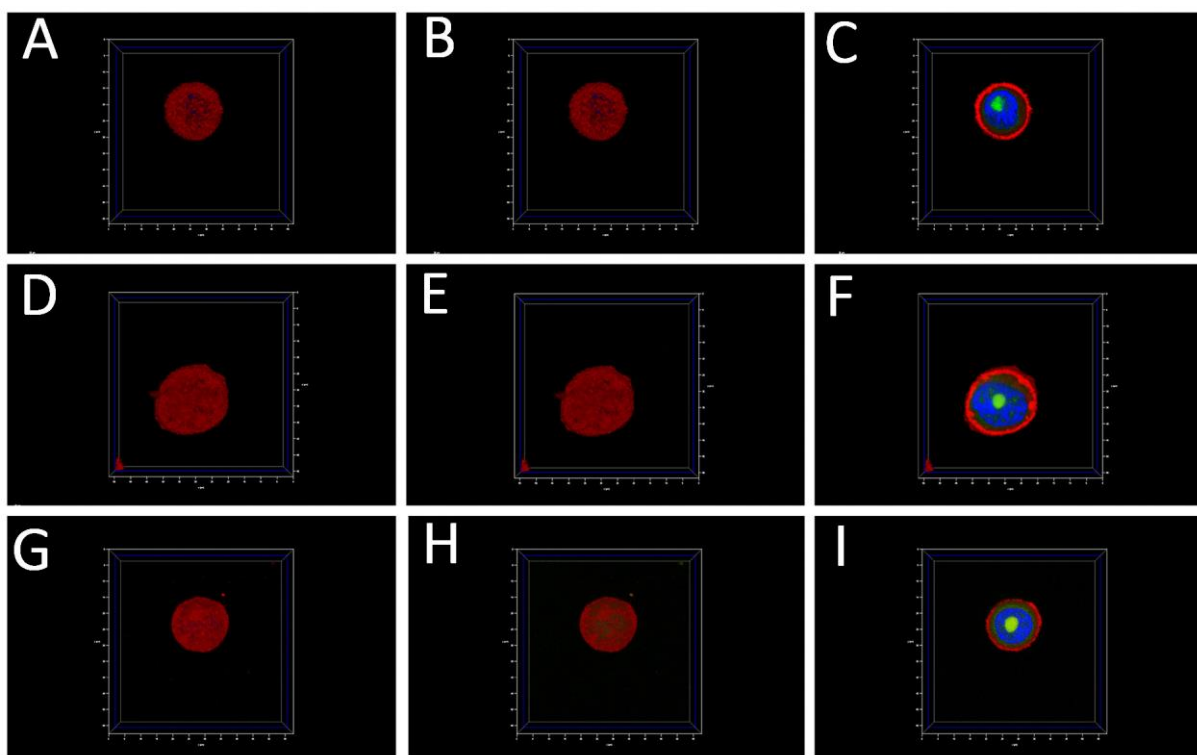


**Figura 9. Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase Rac1 em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®.**

Imagens tridimensionais construídas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Análise do citoesqueleto de actina evidenciado com rodamina conjugada à faloidina (vermelho), imunomarcação da proteína GTPase Rac1 (verde), e núcleos evidenciados com DAPI (azul). Células SCC-4 controle (A, B e C) e tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M (D, E, F) e com LPA 100  $\mu$ M por 24 horas.

*TKI-258 ativa a GTPase Cdc42 em culturas tridimensionais de células SCC-4*

O citoesqueleto de actina das células SCC-4, controle e tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M e LPA 100  $\mu$ M, foi observado conforme descrito anteriormente (Figura 10 A, D e G). Não foi observada a presença de Cdc42 na região externa do córtex de actina em células-controle (Figura 10B); no entanto, na secção realizada ao nível do núcleo, foi vista no citosol, assim como no nucléolo (Figura 10C). Em células tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M, a GTPase Cdc42 ativa, também, não foi observada externamente ao córtex de actina (Figura 10E) e, na secção realizada ao nível do núcleo, a GTPase Cdc42 foi vista através de todo o citoplasma e no nucléolo (Figura 10F). As células tratadas com LPA a 100  $\mu$ M apresentaram pequena quantidade de Cdc42 na região de membrana (Figura 10H) e, na secção, Cdc42 apareceu fracamente marcada no citoplasma e no nucléolo (Figura 10I).



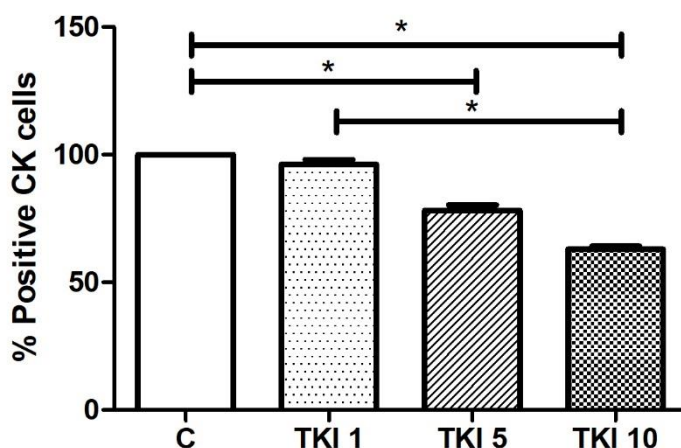
**Figura 10.** Efeito do TKI-258 sobre a ativação da proteína GTPase Cdc42 em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral cultivadas em Matrigel®.

Imagens tridimensionais construídas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Análise do citoesqueleto de actina evidenciado com rodamina conjugada à faloidina (vermelho), imunomarcação da proteína GTPase Cdc42 (verde), e núcleos evidenciados com DAPI (azul). Células SCC-4 controle (A, B e C) e tratadas com TKI-258 5  $\mu$ M (D, E, F) e com LPA 100  $\mu$ M por 24 horas.

### *Efeito do TKI-258 sobre a citodiferenciação de células SCC-4*

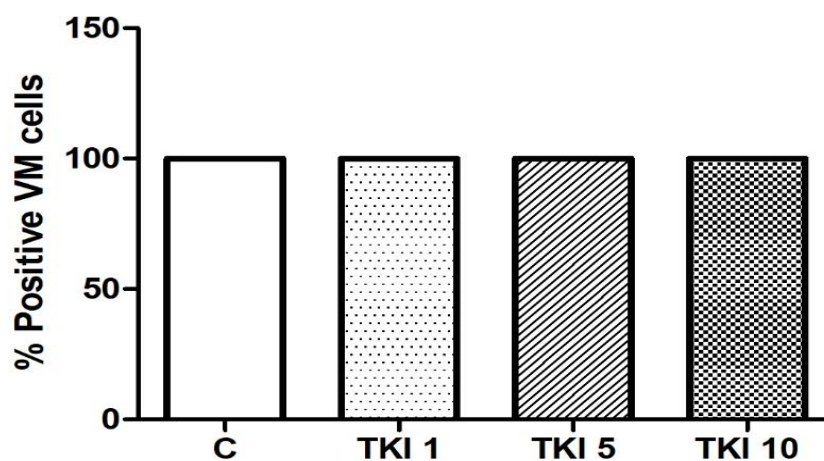
Conforme esperado, cem por cento das células SCC-4 controle imunoexpressaram citoqueratina. As células tratadas com TKI-258, por 24 horas, apresentaram redução gradativa do percentual de células positivas para citoqueratina de modo dose dependente [ $X(3) = 10,16$ ,  $p < 0,05$ ] nas concentrações 1  $\mu\text{M}$  ( $96,17 \pm 3,34\%$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $78,17 \pm 3,77\%$ ) e 10  $\mu\text{M}$  ( $62,98 \pm 2,02\%$ ) (Figura 11).

Surpreendentemente, todas as células SCC-4 controle ( $100 \pm 0\%$ ) e todas as células tratadas com TKI-258 nas concentrações 1  $\mu\text{M}$  ( $100 \pm 0\%$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $100 \pm 0\%$ ) e 10  $\mu\text{M}$  ( $100 \pm 0\%$ ), por 24 horas, expressaram vimentina.



**Figura 11. Efeito do TKI-258 sobre o percentual de células positivas para citoqueratina em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.**

Células SCC-4 controle (C) e tratadas com TKI-258: 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  (TKI 1, TKI 5 e TKI 10, respectivamente) por 24 horas. Teste Kruskal-Wallis seguido de Pós teste de Dunnett C. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 12. Efeito do TKI-258 sobre o percentual de células positivas para vimentina em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.**

Células SCC-4 controle (C) e tratadas com TKI-258: 1, 5 e 10  $\mu$ M (TKI 1, TKI 5 e TKI 10, respectivamente) por 24 horas. Teste Kruskal-Wallis seguido de Pós teste de Dunnett C. \*  $p < 0,05$ .

**8. DISCUSSÃO**

---

Este estudo demonstrou que a inibição das vias de transdução de sinal com o tratamento com TKI-258 em células de carcinoma epidermoide oral *in vitro* leva a uma tendência de diminuição da expressão gênica de FGFR3b, VEGFR-1, PDGFR $\alpha$ , e PDGFR $\beta$ . No entanto, mantém as GTPases RhoA, RhoB e Rac nas suas formas ativas. Além disso, afeta a citodiferenciação, reduzindo a quantidade de células positivas para a citoqueratina, enquanto a vimentina não é afetada. Previamente, foi reportado que o TKI-258 afeta processos biológicos envolvidos com a tumorigênese em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado, como inibição da migração e invasão celular (CARNEIRO et al., 2017), redução da proliferação celular (SILVEIRA et al., 2020) e, também, aumento da taxa de apoptose (CARNEIRO et al., 2021).

O carcinoma epidermoide oral é extremamente invasivo e sua capacidade de migração e invasão, através de vasos sanguíneos ou linfáticos gerando metástases, é regulada por receptores de membrana (ALBINI; NOONAN, 2010; BELOV; MOHAMMADI, 2013; DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). A proliferação celular, aumentada durante a carcinogênese, também parece decorrer do aumento da atividade de receptores de membrana, do tipo tirosina-quinase. Dessa forma, a inibição desses receptores tem sido investigada como forma de tratamento das neoplasias, reduzindo a proliferação, a migração e a invasão celular e inibidores como o TKI-258 apresentam tais efeitos (CARNEIRO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2020). O TKI-258 tem sido estudado na terapia de diversos tipos de tumor, geralmente associado a outros quimioterápicos, com efeitos adversos relativamente brandos sendo, os mais prevalentes, náuseas, diarreia, fadiga e redução de apetite (YOON; CHOI; LEE, 2018).

Estudos mostram, através de ensaios tridimensionais, que o TKI-258 exerce um efeito inibitório sobre a motilidade celular, afetando a organização dos filamentos de actina, a migração celular e a invasão celular em carcinoma epidermoide oral (CARNEIRO et al., 2017) e em outros tipos de câncer (ZANG et al., 2015) e possivelmente esses processos são regulados por vias que envolvem os receptores FGFRs, PDGFRs e/ou VEGFRs. O TKI-25 age por meio da inibição direta de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs) e fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFs), demonstrando um efeito antimetastático (HUYNH et al., 2012).

O receptor FGFR parece ter um importante papel oncogênico em diversos tipos de câncer relacionado à proliferação celular e metástase e estudos demonstram uma alteração da expressão de FGFRs em diversos tipos de carcinoma, incluindo o epidermoide oral, com

aumento de FGFR1 ou de FGFR2 (XIE et al., 2016). O aumento da expressão de FGFR3, porém, tem sido mais estudado, uma vez que esse subtipo de receptor parece particularmente superexpresso em diversos tipos de tumores (MILOWSKY et al., 2014; PIRO et al., 2016; SCHÄFER et al., 2016; SCHEID et al., 2015).

Neste sentido, os receptores do tipo FGFR se tornam um alvo importante a ser inibido no tratamento do câncer, em especial do FGFR3. Nos experimentos aqui apresentados foi possível perceber uma redução na expressão gênica de FGFR3 em células SCC-4 tratadas com TKI-258, embora não significativa. A atividade do TKI-258 inibindo o receptor FGFR3 tem sido descrita em diversos estudos, de pré-clínicos a clínicos, envolvendo diversos tipos de câncer (ANDRÉ et al., 2013; HÄNZE et al., 2013).

A vascularização do tumor é um ponto importante para o desenvolvimento e progressão da doença. Dentre várias citocinas que modulam os processos angiogênicos, o fator de crescimento vascular (VEGF) tem sido considerado uma proteína angiogênica fundamental, produzida pelo tumor, para promover angiogênese (LEEK et al., 2000; STÎNGĂ et al., 2011).

O receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR) está diretamente envolvido com o crescimento tumoral no carcinoma epidermoide oral e um aumento na expressão de VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2 se associa a um aumento de invasão, de metástase e a um pior prognóstico (ARAKI-MAEDA et al., 2022; MONTEIRO et al., 2018). O VEGFR-2 foi sugerido como sendo um potencial marcador para células de carcinoma epidermoide oral (EDIRISINGHE et al., 2023). Dessa forma, a redução da atividade ou da expressão dos receptores VEGFRs pode contribuir para uma atividade antineoplásica (LIU et al., 2019).

Quando foi analisada a expressão gênica dos receptores VEGFR do tipo 2 nas células SCC-4, observamos que o tratamento com TKI-258 levou a uma redução dessa expressão, embora não significativa. A redução da expressão de VEGFR-2 gerada pelo TKI-258 já foi descrita por diversos autores, em vários tipos de tumor (GARCÍA-QUIROZ et al., 2021). Estudos clínicos demonstram que o tratamento com TKI-258 pode aumentar os níveis de VEGF165, VEGF-A, PIGF e IL-8 e reduzir os níveis séricos de VEGFR2, evidenciando que ele inibe a sinalização do VEGF em pacientes (YOON; CHOI; LEE, 2018).

Estudos clínicos de fase 1 e 2 demonstram que pacientes portadores de melanoma submetidos ao tratamento com TKI-258 tiveram um aumento nos níveis plasmáticos de FGF23

e de VEGF, com redução do VEGFR-2, evidenciando, desta forma, a inibição dos receptores de FGF (FGFR) e de VEGF (VEGFR) causadas pelo TKI-258 (KIM et al., 2011).

O receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) também tem um papel relevante na tumorigênese. A superexpressão de PDGF- $\beta$  e seu receptor PDGFR- $\beta$  tem sido associada à promoção de crescimento tumoral e à angiogênese, o que leva a piores prognósticos, mas também ressalta a importância desta via como um alvo terapêutico (CRAWFORD et al., 2021). Nos resultados aqui apresentados, notamos uma tendência na redução da expressão gênica de PDGFR com o tratamento com TKI-258, e outros estudos demonstraram que o TKI realmente reduz o PDGFR (CARNEIRO et al., 2017; HÄNZE et al., 2013). A dose de cinco micromolar de TKI-258 demonstrou efeitos inibitórios na fosforilação de PDGFR- $\beta$ , VEGFR-2 e FGFR-1 também em células de carcinoma hepatocelular (CHEN et al., 2012).

O conhecimento da expressão gênica dos FGFR3b, VEGFR-1, PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  em células SCC-4 tratadas com TKI-258 é importante porque sua ativação e/ou de integrinas e/ou de receptores acoplados a proteínas G leva ao estímulo de uma ou mais vias de transdução de sinal, que estimulam as proteínas GTPases Rho, resultando em diferentes respostas celulares envolvidas na tumorigênese. A família Rho das GTPases (de *Ras-Homology*) regulam vias de transdução de sinal envolvidas na morfogênese e citodiferenciação, migração, proliferação, polarização celular, apoptose, adesão célula-célula e célula-MEC (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). As isoformas RhoA e RhoB possuem semelhanças em sua regulação e diferenças funcionais; RhoA é promotora do crescimento tumoral, enquanto RhoB tem sido descrita como um gene supressor de tumor (HALL, 2012). Estudos destacaram um novo aspecto da cooperação entre Rho e Cdc42 para o controle da contratilidade da actomiosina, pois mostrou que as células do carcinoma usaram a contratilidade da actomiosina impulsionada por Cdc42 e MRCK para seguir os rastros que foram gerados pela contratilidade Rho/ROCK dependente de actomiosina (SADOK; MARSHALL, 2014).

As GTPases Rho ciclam entre uma forma ativa ligada ao GTP e uma forma inativa ligada ao GDP, sendo reguladas por *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs) os quais estimulam a troca do GDP pelo GTP (forma ativa) e por *GTPase-activating proteins* (GAPs) que catalizam a hidrólise do GTP (forma inativa) que forma complexos com *GDP-dissociation inhibitors* (GDIs) no citosol, enquanto as proteínas ativadas interagem com várias proteínas efetoras na fração de membrana (TAKAI; SASAKI; MATOZAKI, 2001). Desse modo, este estudo avaliou o estado de atividade por meio de imagens tridimensionais reconstruídas com

50 secções capturadas ao longo do eixo Z por análise de microscopia confocal de varredura das células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, que foram cultivadas em Matrigel<sup>®</sup>, permitindo avaliar a localização das proteínas GTPases Rho na porção de membrana (forma ativa) e na porção citoplasmática (forma inativa).

Previamente, foi demonstrado que o tratamento com TKI-258 afeta a expressão gênica, levando ao aumento de RhoA RNAm e à diminuição de RhoB RNAm em células SCC-4 (CARNEIRO et al., 2021), o que não esclarece sobre o estado funcional dessas proteínas. Este estudo demonstrou que as GTPases RhoA e RhoB aparecem na forma ativa em células SCC-4 controle, tratadas com TKI-258 e tratadas com LPA, em culturas tridimensionais de Matrigel<sup>®</sup>. No entanto, a ativação das GTPases RhoA e RhoB pode ter ocorrido devido ao Matrigel<sup>®</sup> e/ou ao LPA que ativam vias de transdução de sinal que envolvem as GTPases Rho. O Matrigel<sup>®</sup> contém quantidades variáveis de laminina-1, EGF, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), TGF $\beta$  e, possivelmente, outros fatores de crescimento (VUKICEVIC et al., 1992). O LPA interage com seu receptor acoplado à proteína G, está presente em grande quantidade no soro e é conhecido por estimular diretamente várias proteínas Rho (RADEFF-HUANG et al., 2004). Já a GTPase Cdc 42 não foi identificada nas suas formas ativa, tanto no grupo controle, quanto no grupo no grupo tratado com o TKI-258, apenas no grupo tratado com LPA, apareceu em pequena quantidade em sua forma ativa.

Anteriormente, foi relatado que o tratamento com TKI-258 na mesma concentração em células SCC-4 pelo mesmo período utilizado neste estudo leva à alteração morfológica, fazendo com que as células se tornem arredondadas (CARNEIRO et al., 2017), na migração do tipo ameboide (SAHAI; MARSHALL, 2003). Neste padrão de migração celular, ocorrem alterações na adesão entre células e a matriz extracelular devido a um estado de desdiferenciação celular (GANDALOVIČOVÁ et al., 2016). Este estudo demonstrou que as células tratadas com TKI-258 tiveram uma redução gradativa do percentual de células positivas para citoqueratina de modo dose dependente, enquanto a imunoexpressão de vimentina não foi afetada.

## 9. CONCLUSÃO

---

Na linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, a inibição das vias de transdução de sinal com o tratamento TKI-258 afeta a expressão gênica de *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFR $\alpha$* , e *PDGFR $\beta$* , ativa GTPases RhoA, RhoB e Rac1, também, altera a citodiferenciação. Deste modo, o TKI-258 é uma terapia promissora para o carcinoma epidermoide oral.

- A expressão gênica dos receptores *FGFR3b*, *VEGFR-1*, *PDGFR $\alpha$*  e *PDGFR $\beta$*  em células SCC-4 tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M por 24 horas tendem a diminuir comparada com as células-controle.
- O tratamento com TKI-258 a 5  $\mu$ M em células SCC-4, por 24 horas, ativa as GTPases RhoA, RhoB e Rac1, apenas a proteína Cdc42 não foi ativada.
- A imunexpressão de citoqueratina diminui, enquanto a vimentina não é afetada em células SCC-4 e tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M por 24 horas, em relação às células-controle.

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ADNANE, J. et al. Suppression of Rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 7, 2002.

ALBINI, A.; NOONAN, D. M. The “chemoinvasion” assay, 25 years and still going strong: the use of reconstituted basement membranes to study cell invasion and angiogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, 2010.

ANDRÉ, F. et al. Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): Preclinical and clinical data in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 13, 2013.

ARAKI-MAEDA, H. et al. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line expressing vascular endothelial growth factor a and its two receptors. **Journal of Dental Sciences**, v. 17, n. 4, 2022.

ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 3, 2005.

AZEVEDO, R. B.; FABER, J.; LEAL, S.; LUCCI, C. Histologia da Cavidade Oral. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 215-226.

AZNAR, S. et al. Rho GTPases: Potential candidates for anticancer therapy. **Cancer Letters**, v. 206, n. 2, 2004.

BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 6, 2013.

BHULLAR, K. S. et al. **Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions**. **Molecular Cancer**, 2018.

BINMADI, N. O.; BASILE, J. R. **Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literature**. **Oral Oncology**, 2011.

BLATT, S. et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 5, 2017.

BRAY, D.; GILBERT, D. **Cytoskeletal elements in neurons**. **Annual review of neuroscience**, 1981.

BROUMAND, V.; LOZANO, T. E.; GOMEZ, J. A. **Evaluation and Staging of Oral Cancer**. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, 2006.

CARNEIRO, A. C. D. M. et al. Tyrosine kinase inhibitor TKI-258 inhibits cell motility in oral squamous cell carcinoma in vitro. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, n. 7, 2017.

CARNEIRO, A. C. D. M. et al. RhoA/ROCKs signaling is increased by treatment with TKI-258 and leads to increased apoptosis in SCC-4 oral squamous cell carcinoma cell line. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 50, n. 4, 2021.

CHEN, Z. Y. et al. Dovitinib preferentially targets endothelial cells rather than cancer cells for the inhibition of hepatocellular carcinoma growth and metastasis. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, 2012.

CIERPIKOWSKI, P. et al. PDGFR $\alpha$ /HER2 and PDGFR $\alpha$ /p53 co-expression in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 38, n. 2, 2018.

CRAWFORD, K. et al. Targeted FGFR/VEGFR/PDGFR inhibition with dovitinib enhances the effects of nab-paclitaxel in preclinical gastric cancer models. **Cancer Biology and Therapy**, v. 22, n. 10–12, 2021.

CSERNI, G. et al. The new TNM-based staging of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 5, 697–703, 2018.

DE MORAIS, E. F. et al. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 7, 2017.

DEMOULIN, J. B.; ESSAGHIR, A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 3, 2014.

ECONOMOPOULOU, P. et al. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Anti-tumor immunity and clinical applications. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 9, 2016.

EDIRISINGHE, S. T. et al. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) as Potential Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Sri Lankan Study. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 24, n. 1, 2023.

EITZEN, G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1641, n. 2–3, p. 175–181, 2003.

ELFERINK, L. A.; RESTO, V. A. Receptor-Tyrosine-Kinase-Targeted Therapies for Head and Neck Cancer. **Journal of Signal Transduction**, v. 2011, 2011.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, 2002.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, 2003.

FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 24, 2014.

GANDALOVIČOVÁ, A. et al. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, 2016.

GARCÍA-QUIROZ, J. et al. Antitumoral effects of dovitinib in triple-negative breast cancer are synergized by calcitriol in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 214, 2021.

GHEDINI, G. C. et al. Future applications of FGF/FGFR inhibitors in cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 9, 2018.

GOLDSTEIN, L. S.; THERIOT, J. A. Cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 1, 2001.

GOTINK, K. J.; VERHEUL, H. M. W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: What is their mechanism of action? **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, 2010.

HALL, A. The cytoskeleton and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, 2009.

HALL, A. Rho family GTPases. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 6, 2012.

HÄNZE, J. et al. Epithelial mesenchymal transition status is associated with anti-cancer responses towards receptor tyrosine-kinase inhibition by dovitinib in human bladder cancer cells. **BMC Cancer**, v. 13, 2013.

HELDIN, C. H.; LENNARTSSON, J.; WESTERMARK, B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 283, n. 1, 2018.

HU, H.; LIU, Y.; JIANG, T. Mutation-introduced dimerization of receptor tyrosine kinases: from protein structure aberrations to carcinogenesis. **Tumor Biology**, v. 36, n. 3, 2015.

HUI, Q. et al. FGF family: From drug development to clinical application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.

HUYNH, H. et al. Dovitinib demonstrates antitumor and antimetastatic activities in xenograft models of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 3, 2012.

IMAI, K.; TAKAOKA, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, 2006.

INCA (Brasil). **Estatísticas de câncer**. Brasília, DF: INCA, 2022. Disponível em: [www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros](http://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros). Acesso em 20 jan. 2023.

INCA (Brasil). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativas 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 20 jan. 2023.

KARAMAN, S.; LEPPÄNEN, V. M.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. **Development (Cambridge)**, v. 145, n. 14, 2018.

KIM, K. B. et al. Phase I/II and pharmacodynamic study of dovitinib (TKI258), an inhibitor of fibroblast growth factor receptors and VEGF receptors, in patients with advanced melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 23, 2011.

LEEK, R. D. et al. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. **Journal of Pathology**, v. 190, n. 4, 2000.

LIU, L. et al. **Progress in targeted therapeutic drugs for oral squamous cell carcinoma. Surgical Oncology**, 2019.

LÓPEZ-CEDRÚN, J. L.; ANDRÉS DE LLANO, J. A 22 years survival and prognostic factors analysis in a homogeneous series of 64 patients with advanced cancer of the tongue and the floor of the mouth. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 3, 2015.

MACHIELS, J. P. et al. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. **F1000Prime Reports**, v. 6, 2014.

MADEIRA, M. C.; LEITE, H. F.; RIZZOLO, R. J. C. Anatomia da Cavidade Oral. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 25-60.

MAHMOOD, N. et al. Impact of age at diagnosis on clinicopathological outcomes of oral squamous cell carcinoma patients. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 3, 2018.

MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K. L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes and Development**, v. 30, n. 1, 2016.

MILOWSKY, M. I. et al. Phase 2 trial of dovitinib in patients with progressive FGFR3-mutated or FGFR3 wild-type advanced urothelial carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 18, 2014.

MONTEIRO, L. S. et al. An immunohistochemical score to predict the outcome for oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 4, 2018.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the Oral Cavity. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, 2015.

MORO, J. DA S. et al. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 16, n. 2, 2018.

NAZIR, M. et al. A genetic overview of 23Y-STR markers in UAE population. **Forensic Science International: Genetics**, v. 23, 2016.

OIKAWA, Y. et al. Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer Science**, v. 108, n. 2, 2017.

PARÉ, A.; JOLY, A. Oral cancer: Risk factors and management. **La Presse Médicale**, v. 46, n. 3, 2017.

- PATEL, V. et al. Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: Evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, 2007.
- PIRO, G. et al. An FGFR3 autocrine loop sustains acquired resistance to trastuzumab in gastric cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 24, 2016.
- PORTA, C. et al. Dovitinib (CHIR258, TKI258): Structure, development and preclinical and clinical activity. **Future Oncology**, v. 11, n. 1, 2015.
- PORTER, S. et al. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, n. 6, 2018.
- QING, J. et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, 2009.
- RADEFF-HUANG, J. et al. G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 5, 2004.
- RENHOWE, P. A. et al. Design, structure-activity relationships and in vivo characterization of 4-Amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: Novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 2, 2009.
- ROJAS, A. M. et al. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 2, 2012.
- ROSSMAN, K. L.; DER, C. J.; SONDEK, J. GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, 2005.
- SADOK, A.; MARSHALL, C. J. Rho gtpases masters of cell migration. **Small GTPases**, v. 5, n. 4, 2014.
- SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. Differing modes for tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 8, 2003.
- SANG, H. L. et al. In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 10, 2005.
- SARASWATHY, M.; GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, 2013.
- SCHÄFER, N. et al. Phase I trial of dovitinib (TKI258) in recurrent glioblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 7, 2016.

- SCHEID, C. et al. Phase 2 study of dovitinib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma with or without t(4;14) translocation. **European Journal of Haematology**, v. 95, n. 4, 2015.
- SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, 2009.
- SHIMIZU, A. et al. Vascular endothelial growth factor-A exerts diverse cellular effects via small G proteins, Rho and Rap. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.
- SILVEIRA, I. C. et al. Anti-Proliferative Role of the Tyrosine Kinase Inhibitors TKI-258 on Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 6, 2020.
- SPERBER, G. H. Oral Anatomy, Histology and Embryology, 5th edition. In: B. K. B. Berkowitz, G. R. Holland, B. J. Moxham. Edinburgh, Lon. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 6, 2018.
- STÎNGĂ, A. C. et al. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: A morphometric study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. 4, 2011.
- TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, 2001.
- TANDON, P. et al. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra – a retrospective 10-year study. **Współczesna Onkologia**, v. 2, 2017.
- THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 9, 2018.
- TROELTZSCH, M. et al. Vascular endothelial growth factor receptor isoforms: Are they present in oral squamous cell carcinoma? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 73, n. 5, 2015.
- VEGA, F. M.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, 2008.
- VUKICEVIC, S. et al. Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. **Experimental Cell Research**, v. 202, n. 1, 1992.
- XIE, X. et al. Roles of FGFR in oral carcinogenesis. **Cell Proliferation**, v. 49, n. 3, 2016.
- YING, H. et al. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 9, 2006.

YOON, S. K.; CHOI, C. M.; LEE, J. C. The continued EGFR-TKI with cytotoxic chemotherapy at progression-poison or medicine? **Translational Lung Cancer Research**, v. 7, p. S176-S178, 2018.

ZANG, C. et al. Targeting multiple tyrosine kinase receptors with dovitinib blocks invasion and the interaction between tumor cells and cancer-associated fibroblasts in breast cancer. **Cell Cycle**, v. 14, n. 8, 2015.