

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO

**EFEITO DO TKI-258 SOBRE A MOTILIDADE DE CÉLULAS DE  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Uberaba  
2016

ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO

**EFEITO DO TKI-258 SOBRE A MOTILIDADE DE CÉLULAS DE  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Uberaba  
2016

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

C287e Carneiro, Anna Cecília Dias Maciel  
Efeito do TKI-258 sobre a motilidade de células de carcinoma epidermoide oral in vitro / Anna Cecília Dias Maciel Carneiro. -- 2016.  
79 f. : il., fig.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016  
Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

1. Boca – Neoplasia. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Proteínas  
de tirosina quinase. 4. Movimento celular. I. Crema, Virgínia Oliveira.  
II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.31-002.4

**ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO**

**Efeito do TKI-258 sobre a motilidade de células de carcinoma epidermoide oral *in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Uberaba 20 de julho de 2016

Banca Examinadora:

---

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

---

Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**DEDICATÓRIA**

---

Dedico este trabalho à minha mãe Marília, aos meus avós Lucas e Lôla (*in memoriam*) e a meu pai Aziz (*in memoriam*), por serem meus maiores exemplos de fé, determinação e coragem.

## **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema pela oportunidade de poder realizar este que sempre foi um sonho em minha vida, acreditando no meu potencial e me encorajando a cada etapa. Serei eternamente grata pelo apoio firme, pelos conselhos valiosos e pela compreensão em todos os momentos, especialmente naqueles em que precisei ser forte. Seus exemplos de perseverança, força, dedicação e competência me acompanharão para sempre.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva e ao Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquilis Rodrigues por disponibilizarem seu laboratório da disciplina de Fisiologia. Aos técnicos: Angélica Cristina Alves da Cruz, Lucas Felipe de Oliveira, Glauco da Rocha Finholdt e Livia Alves Martins pelo suporte e acompanhamento.

À Prof. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta e à Prof. Dra. Patrícia Helena Zanier Gomes, da disciplina de Farmacologia, pela disponibilidade. Aos técnicos Douglas Cobo Micheli e Januário Barbosa dos Santos Júnior pela amizade e agradável convivência.

À disciplina de Patologia Especial, em especial a Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti por seu apoio e disponibilidade nas colaborações com a disciplina de Histologia e nas disciplinas da pós-graduação. A Profa. Dra. Renata Margarida Etchbehere pela amizade e pelos ensinamentos valiosos nas disciplinas da pós-graduação. A todos os técnicos da disciplina pelo precioso apoio.

Aos professores titulares e colaboradores da Pós-graduação em Ciências da Saúde: Profa. Rosana Rosa Miranda Corrêa, Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari, Profa. Dra. Adriana Cartafina Perez Bóscolo, Prof. Dr. Robson Azevedo Dutra, Prof. Dr. Hélio Moraes de Souza, Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins e Profa. Dra. Sheila Soares Silva. Agradeço pela

oportunidade de participar de suas disciplinas e pelos aprendizados diversos, teóricos e especialmente didáticos.

Aos cirurgiões-dentistas do Ambulatório de Odontologia: Rafael Miranda Euqueres, Amauri José de Lima e em especial a Stella Borges da Silva, pela amizade e encaminhamento de pacientes ao Projeto de Extensão. Às técnicas: Walquiria Martinelli, Irani Borges, Kátia Cristina Falasque, Núbia Fernanda Moraes Teixeira, Maria Aparecida Rodrigues Araújo e especialmente a Raquel Magalhães Alves pelo apoio, suporte e convivência sempre agradável.

Aos secretários da pós-graduação André Luís Rodrigues Costa e Tuânia Alves Cunha André pela atenção e disponibilidade constantes.

À funcionária Grazielle Ferreira Camargos pelo seu cuidado na manutenção do laboratório de Histologia e especialmente pela sua amizade e alegria contagiante.

Ao técnico Marcelo José Rosa pelo suporte técnico aos equipamentos do laboratório de Histologia, nos atendendo prontamente e especialmente pela sua educação e presteza.

Aos companheiros do Laboratório de Histologia, em especial, a Leopoldo Henrique Barboza Martins pela amizade, suporte e pelos valiosos ensinamentos, especialmente aqueles relacionados a cirurgia oral menor. Nanci Mendes Pinheiro e Simone de Sales Costa Moreira Carboni pelo apoio, ensinamentos preciosos, amizade e convivência fraterna desde o início. Lair Mambrini Furtado, Guilherme Henrique Borges, Ana Maria Barros Spina e Munira Maria Otzuka Nassif Zehuri pelo grande aprendizado e convívio prazeroso.

Aos meus coorientandos: Arthur Silva Rezende, Bruna Raphaela Oliveira Silva, Isadora Caixeta da Silveira e Lorraine Stephanie Hiss, pela confiança, pelo aprendizado diário e pela convivência tão agradável e especial todos os dias.

À toda minha família por acreditar no meu potencial e me incentivar constantemente, em especial à minha querida tia Marilda das Graças Maciel pelo seu exemplo e apoio incondicional em todas as minhas iniciativas. Obrigada por me dar todo o suporte e carinho.

Te amo Di!

Aos meus amigos queridos pela paciência e força constantes nessa caminhada. Obrigada pela torcida e pelo apoio sempre!

À minha amada mãe Marília Eustáquia Maciel por ser meu porto seguro, meu maior exemplo de amor e fé. Sua coragem e determinação me motivam todos os dias. Sempre foram e sempre serão dedicadas a você todas as minhas iniciativas e realizações. Obrigada por me ensinar a ser alguém melhor todos os dias. Te amo muito!

À Deus, aos mentores e companheiros espirituais por esta realização.

Muito obrigada!

## **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

“Sonhe com aquilo que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. (...) A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar, duram uma eternidade. (...)”

Clarice Lispector

**RESUMO**

---

## RESUMO

O carcinoma epidermoide oral é extremamente invasivo e este comportamento é regulado pela ligação de moléculas extracelulares aos receptores da membrana celular. Atualmente o bloqueio desses receptores com inibidores específicos constitui uma nova modalidade de tratamento para neoplasias. O TKI-258 inibe a autofosforilação dos receptores tirosina quinase: FGFRs, VEGFRs e PDGFRs. Este estudo visou avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre o movimento celular, utilizando a linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral humano. A F-actina foi evidenciada com rodamina conjugada à faloidina e os resultados foram analisados em microscopia confocal. Foram realizados ensaios tridimensionais de migração e invasão celular e as células controle e tratadas com TKI-258 foram contadas após 24 horas. As células controle apresentaram citoplasma abundante com ampla distribuição de F-actina e córtex celular evidente, porém as células tratadas com TKI-258 nas concentrações estudadas, apresentaram morfologia arredondada, citoplasma escasso, filamentos de actina desorganizados e córtex celular preservado. O tratamento com TKI-258 (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) inibiu a migração celular de maneira concentração-dependente (ANOVA,  $F=97,749$ ,  $df=3, 10$ ;  $p<0,0001$ ). O número de células tratadas com TKI-258 (5  $\mu$ M) que invadiram a membrana recoberta com Matrigel™ foi significativamente menor que das células controle ( $t=6.708$ ;  $df=5$ ;  $P<0,001$ ). Os resultados obtidos demonstraram que o inibidor tirosina quinase TKI-258 exerce um efeito inibitório sobre o citoesqueleto de actina, migração e invasão celular e provavelmente estes processos são regulados pelas via de sinalização: FGFRs e/ou do PDGFRs e/ou VEGFRs.

**Palavras-chave:** invasão celular, migração celular, movimento celular, carcinoma de células escamosas, TKI-258, inibidor tirosina quinase

**ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma is extremely invasive, this behavior is regulated by binding of extracellular molecules to the cell membrane receptors. Currently, the blocking of these receptors with specific inhibitors is a new treatment modality of cancer. The TKI-258 inhibited phosphorylation of FGFRs VEGFRs and PDGFRs. Our aim was to analyze the effect of TKI-258 treatment on cell movement by using SCC-4 cell line from human oral squamous cell carcinoma. F-actin was stained with rhodamine conjugated to phalloidin and confocal analysis was performed. The migration and invasion (membrane covered with Matrigel™) three-dimensional assays were performed, control and cells treated with TKI-258 that migrated through the membrane were counted after 24 hours. Control cells presented abundant cytoplasm with F-actin wide distributed and evident cell cortex, however cells treated with TKI258 at the concentrations studied showed round morphology, scanty cytoplasm, F-actin desorganized and preserved cell cortex. TKI-258 (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) treatment inhibit migrating cells (ANOVA,  $F=97,749$ ,  $df=3, 10$ ;  $p<0.0001$ ) and it was concentration dependent. Invading cell treated with 5  $\mu$ M TKI-258 was significantly lower ( $t=6.708$ ,  $df=5$ ,  $p<0.001$ ). These results suggest that the tyrosine kinase inhibitor TKI-258 has an inhibitory effect on F-actin, cell migration and cell invasion, probably these processes are regulated by FGFRs and/or PDGFRs and/or VEGFRs signaling pathways.

**Keywords:** cell invasion; cell migration; cell movement; squamous cell carcinoma; TKI-258; tyrosine kinase inhibitor

## **LISTA DE FIGURAS**

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a organização do citoesqueleto de actina de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4..... | 46 |
| <b>Figura 2.</b> Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a migração celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4.....                       | 48 |
| <b>Figura 3.</b> Efeito do tratamento com TKI-258 sobre invasão celular em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.....                          | 49 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

ANOVA - Análise de variância

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

bFGFR - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos básico

BSA - *albumin solution from bovine serum*

Cdc42 - Homóloga a proteína de controle da divisão celular 42 (*Cell division control protein 42 homolog*)

DAPI - *4',6-diamidino-2-fenilindole*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - *Dimethylsulfoxide*

DPBS - *Dulbecco's* salina tamponada fosfatada

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

FGF2 - Fator de crescimento de fibroblastos 2

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

FGFR3b - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos isoforma 3b

FGFR4 - Receptor do fator de crescimento de fibroblasto 4

FRS2 $\alpha$  - Receptor do fator de crescimento de fibroblasto substrato 2 $\alpha$

HAM-F12 - *HAM-F12 Nutrient Mixture*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDGF - Fator de crescimento derivado 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 derivado de plaquetas

PDGFR $\alpha$  - Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas  $\alpha$

PDGFR $\beta$  - Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$

Pi - Fosfato inorgânico

RTKs - Receptores tirosina quinases

SFB - Soro fetal bovino

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

VEGFA - Fator de crescimento vascular endotelial A

VEGFB - Fator de crescimento vascular endotelial B

VEGFC - Fator de crescimento vascular endotelial C

VEGFD - Fator de crescimento vascular endotelial D

VEGFE - Fator de crescimento vascular endotelial E

VEGFRs- Receptores dos fatores de crescimento vasculares endoteliais

VEGFR 1 - Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 1

VEGFR 2 - Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 2

VEGFR 3 - Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 3

sVEGFR-2 - Receptor do fator de crescimento vascular endotelial solúvel 2

## SUMÁRIO

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>2.REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>2.1. Mucosa oral</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>2.3. Fatores de crescimento e seus receptores</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>2.4. TKI-258</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>3.HIPÓTESE</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4.OBJETIVOS</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>4.1.Objetivo geral</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>4.2.Objetivos específicos</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>5.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>40</b> |
| <b>5.1. Casuística</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>5.2. Reagentes</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>5.3. Cultura das células de carcinoma epidermoide oral SCC-4</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>5.4. Avaliação do citoesqueleto de actina</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>5.5. Ensaio de migração celular</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>5.6. Ensaio de invasão celular</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>5.7. Morfometria</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>5.8. Análise estatística</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>5.9. Observação e obtenção de imagens</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>6.RESULTADOS</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>6.1. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a organização do citoesqueleto de actina de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4</b> ..... | <b>45</b> |
| <b>6.2. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a migração celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4</b> .....                       | <b>47</b> |
| <b>6.3. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a invasão celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4</b> .....                        | <b>49</b> |
| <b>7.DISSCUSSÃO</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>8.CONCLUSÃO</b> .....   | <b>62</b> |
| <b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....  | <b>78</b> |

## **1.INTRODUÇÃO**

---

Na população mundial, a incidência de casos de tumores de boca aumenta a cada ano (TORRE *et al.*, 2015). O carcinoma epidermoide oral aparece em oitavo lugar na incidência de câncer correspondendo a 90% dos cânceres de boca (SCULLY e BAGAN, 2009b), e 3% dos cânceres diagnosticados no mundo (FANG *et al.*, 2009). A língua é o sítio mais frequentemente acometido por essa neoplasia, 20% a 40% dos casos (LIM, 2006), seguido pelo assoalho da boca, região ventral-lateral da língua e o palato mole (BROUMAND, LOZANO e GOMEZ, 2006). Entretanto, são menos frequentes lesões na área retromolar, gengiva, região posterior da língua e palato duro (HAYA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004; BAGAN, SARRION e JIMENEZ, 2010). A sobrevida dos pacientes acometidos por essa doença é de apenas 56% (BELL *et al.*, 2007).

Nos tumores malignos ocorre um crescimento desorganizado, a célula neoplásica adquire um potencial migratório e capacidade de invasão, se desprende do tumor, adentra um vaso sanguíneo ou linfático e extravasa em um sítio distante, onde as células tumorais proliferam, formando metástases (ALBINI e 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 (FERRARA, GERBER e LECOUTER, 2003; BELOV e MOHAMMADI, 2013; DEMOULIN e ESSAGHIR, 2014).

O direcionamento de terapias para as vias moleculares das células possibilita avanços terapêuticos no tratamento das neoplasias (GLAZER *et al.*, 2009). Dentre várias moléculas da classe de inibidores de receptores tirosina quinase, o TKI-258 possui características farmacocinéticas e eficácia em vários modelos xenográficos de tumores humanos (RENHOWE *et al.*, 2009). TKI-258 é uma pequena molécula que inibe a autofosforilação dos receptores tirosina quinases do fator de crescimento de fibroblastos (FGFRs), fator de crescimento vascular endotelial (VEGFRs) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs) (KIM *et al.*, 2011), por meio da ligação com o sítio de ligação do adenosina trifosfato (ATP) (GOTINK e VERHEUL, 2010). O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) estimulam o movimento celular no câncer (TURNER e GROSE, 2010; DEMOULIN e ESSAGHIR, 2014), enquanto o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é mais conhecido por regular a angiogênese (FERRARA, GERBER e LECOUTER, 2003).

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1. Mucosa oral

A cavidade oral é delimitada anteriormente pelo vermelhão dos lábios, na região póstero superior pela junção entre palato duro e palato mole e póstero inferiormente pelas papilas circunvaladas da língua, sendo que todas essas regiões são revestidas por mucosa (CHEN e MYERS, 2001). Esse revestimento mucoso é semelhante ao do tubo digestivo e das vias áreas, por exemplo, e são áreas úmidas, sendo a cavidade oral constantemente banhada pela saliva (KATCHBURIAN e ARANA, 2012).

A mucosa oral tem continuidade com a pele dos lábios e a mucosa do palato mole com a da faringe. Histologicamente, é classificada em: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada (LINDHE, KARRING e LANG, 2003; KATCHBURIAN e ARANA, 2012; NANCI, 2013). A mucosa oral é constituída por epitélio e lâmina própria de tecido conjuntivo, originárias do ectoderma e do ectomesênquima, respectivamente. Essa estrutura desempenha as funções de proteção de tecidos mais profundos da cavidade oral, ação como órgão sensorial e atividade glandular (NANCI, 2013).

A mucosa oral possui áreas revestidas por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado nas regiões submetidas às forças mecânicas provenientes da mastigação, e áreas revestidas por epitélio não queratinizado onde há maior exigência de flexibilidade do tecido. São encontrados no epitélio oral: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (SQUIER e KREMER, 2001; NANCI, 2013). Divisões mitóticas das células-tronco da camada basal desse epitélio iniciam o processo de renovação deste tecido. Posteriormente as mitoses, as novas células migram para as camadas superficiais, e os queratinócitos presentes da camada mais superficial descamam resultando na renovação do epitélio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A lâmina própria constituída por células, vasos sanguíneos, elementos neurais e matriz extracelular de tecido conjuntivo, confere ao epitélio oral suporte e nutrição. A camada papilar, mais superficial da lâmina própria, é de tecido conjuntivo frouxo. A camada mais profunda é constituída por tecido conjuntivo denso não-modelado e é denominada camada reticular (SQUIER e KREMER, 2001; NANCI, 2013; CHEN *et al.*, 2015).

## 2.2. Carcinoma epidermoide oral

A palavra neoplasia tem por significado literal “novo crescimento”. Originalmente, o termo tumor era aplicado para aumento de volume localizado em decorrência ao edema em um órgão com inflamação. Atualmente, os termos tumor e neoplasia equivalem, e servem para designar lesões formadas pela proliferação celular descontrolada, anormal e autônoma, podendo ocorrer a redução ou perda da diferenciação celular. As propriedades morfológicas e biológicas dos tumores, suas características macro e microscópicas e os aspectos clínicos e evolutivos permitem classificar as neoplasias em benignas ou malignas. Comumente, as neoplasias benignas não são letais e podem evoluir durante muito tempo sem ameaçar a vida do seu portador. Em contrapartida, as malignas costumam apresentar crescimento rápido e algumas provocam transtornos homeostáticos severos que podem levar o portador ao óbito (KUMAR *et al.*, 2010).

Mais de 100 tipos diferentes de doenças que tem em comum um crescimento desordenado de células anormais caracteriza o termo câncer. Sua origem é multifatorial e seu desenvolvimento ocorre em várias etapas podendo levar até anos. O controle e a prevenção do câncer necessitam de foco e atenção, em virtude do aumento do número de casos e da complexidade dos tratamentos. Estimativas apontam que em 2030, no mundo todo 27 milhões de novos casos serão registrados em decorrência do crescimento e envelhecimento da população. No Brasil, as estimativas 2016/2017 mostram que serão registrados 596.070 novos casos de câncer, sendo esperados 295.200 casos entre homens e 300.800 novos casos em mulheres (INCA, 2014; 2016).

O câncer de boca é um problema de saúde grave cuja incidência aumenta todos os anos em muitas partes do mundo (WARNAKULASURIYA, 2009). Em 2012, ocorreram 300.400 novos casos e 145.400 óbitos por câncer de lábio e cavidade oral (TORRE *et al.*, 2015). Os tumores de boca e de faringe estão agrupados como o sexto tipo de câncer mais comum no mundo (WARNAKULASURIYA, 2009; 2010), sendo o tipo de tumor mais comum o carcinoma epidermoide oral, oitavo mais incidente na população mundial (LLEWELLYN, JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 2001; SCULLY e BAGAN, 2009b). O carcinoma epidermoide oral corresponde à 90% dos cânceres de boca (CHEN *et al.*, 1999; BARNES *et al.*, 2009) e aproximadamente 3% dos cânceres diagnosticados no mundo são carcinoma epidermoide oral (REID *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2009).

A mais alta prevalência do carcinoma epidermoide oral está no norte da França, leste europeu (Eslováquia, Eslovênia e especialmente a Hungria), países da América Latina (Brasil, Uruguai e Porto Rico), sul e sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan) e regiões do Pacífico (Papua Nova-Guiné e Melanésia) (SCULLY e BAGAN, 2009a; WARNAKULASURIYA, 2009). Estudos epidemiológicos revelaram que essa neoplasia é prevalente em regiões onde é comum mastigar betel, planta que é preparada com tabaco e é mascada na Índia, Taiwan, e em outros países asiáticos (FANG *et al.*, 2009).

No Brasil, a estimativa para 2016/2017 é de 15.490 novos casos de câncer de boca. Entre eles 11.140 novos casos nos homens, e de 4.350 novos casos nas mulheres. É o quinto tipo de neoplasia mais comum nos homens brasileiros, sendo o quinto colocado nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e o quarto na região Sudeste (INCA, 2016).

Em todo o mundo o carcinoma epidermoide oral é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino, fato este atribuído a maior indulgência dos homens quanto ao estilo de vida e ao maior consumo de álcool e tabaco. A população masculina brasileira é a terceira mais afetada no mundo pelo câncer de boca, perdendo apenas para os homens franceses e indianos, respectivamente (DE CARVALHO *et al.*, 2001; PETERSEN, 2009; SCULLY e BAGAN, 2009b; WARNAKULASURIYA, 2009; 2010).

O risco de desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral aumenta de acordo com a idade e a maioria dos casos ocorre em indivíduos a partir dos 50 anos. O ápice de sua incidência está entre 61 e 70 anos nas mulheres, enquanto nos homens este pico encontra-se entre 51 e 60 anos (DE CARVALHO *et al.*, 2001; WARNAKULASURIYA, 2009; 2010; RUBACK *et al.*, 2012). Alguns autores afirmam que entre a quinta e a oitava década de vida há maior aparecimento desses casos (BODNER *et al.*, 2014).

Em adultos com idade inferior a 40 anos, a ocorrência desse carcinoma corresponde a 4%. Nestes pacientes, o uso de álcool e tabaco são os fatores de risco de maior importância. Entretanto, estudos evidenciam o papel de outros fatores como: estresse, infecções virais prévias, predisposições genéticas e episódios de câncer em outros indivíduos de suas famílias (LLEWELLYN, JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 2001; BODNER *et al.*, 2014). Em crianças e adolescentes, o aparecimento dessa neoplasia é considerado raro, no entanto, tem comportamento mais agressivo. Os sítios mais acometidos são a língua e o lábio

(BODNER *et al.*, 2014). A etiologia desses casos está relacionada ao estresse, infecções virais prévias e fatores genéticos principalmente nos casos em que há relatos de história prévia de câncer na família (LLEWELLYN, JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 2001).

A taxa de mortalidade geralmente é maior em homens do que em mulheres. Essa taxa é relativamente baixa em países ocidentais industrializados, que possuem serviços de saúde disponíveis à população, quando comparada aos países de baixa e média renda, onde o acesso aos serviços de saúde é limitado (PETERSEN, 2009).

O carcinoma epidermoide oral de língua é o mais comum sendo detectado entre 20% e 40% dos casos (LIM, 2006). As áreas do assoalho da boca, região ventral-lateral da língua e o palato mole aparecem na sequência (FERLITO *et al.*, 2001; BROUMAND, LOZANO e GOMEZ, 2006) e as lesões na área retromolar, gengiva, região posterior da língua e o palato duro são menos comuns (HAYA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004; BAGAN, SARRION e JIMENEZ, 2010). No oriente, a maioria dos sítios acometidos são a mucosa bucal e a língua, enquanto no ocidente o assoalho da boca é a região de acometimento mais expressivo (DE CARVALHO *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2009).

O carcinoma epidermoide oral é uma doença multifatorial (NEVILLE *et al.*, 2009). Os fatores de risco de maior importância são o uso de álcool e tabaco, isoladamente ou em conjunto (SILVERMAN, 1988; PETERSEN, 2009; PETTI, 2009; SCULLY e BAGAN, 2009b; a). Como todas as formas de tabaco são carcinogênicas (WARNAKULASURIYA, 2009), um quarto dos casos de câncer de boca está relacionado ao tabagismo (PETTI, 2009). A associação de álcool e tabaco aumenta em 80% a possibilidade de desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral, demonstrando claramente a multiplicação do risco de desenvolvimento da doença graças ao efeito sinérgico desses dois fatores (HOOPER, WILSON e CREAN, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009).

Existem dificuldades em distinguir os efeitos do álcool e do tabaco separadamente, uma vez que consumidores de bebida alcoólica frequentemente, também, são usuários de tabaco e vice versa (PETERSEN, 2009). A eliminação do consumo de tabaco, e a redução no consumo de álcool podem prevenir 75% dos casos de câncer, além de diminuir o risco de ocorrência de tumores secundários (WARNAKULASURIYA, 2009).

Embora sejam os maiores riscos clínicos, fumar e beber não caracterizam todos os casos de câncer (HOOPER, WILSON e CREAN, 2009). Exposição à radiação solar, hábito de mascar betel, baixo consumo de frutas e vegetais, imunocompetência e infecções também estão relacionados (PETERSEN, 2009; PETTI, 2009; SCULLY e BAGAN, 2009b). A exposição contínua à luz solar tem sido associada ao desenvolvimento do carcinoma epidermoide de lábio (NEVILLE e DAY, 2002) e, em aproximadamente 90% dos casos as primeiras lesões aparecem no vermelhão do lábio inferior. O carcinoma epidermoide labial não está associado diretamente ao tabagismo, embora também seja reconhecido seu desenvolvimento na ausência de qualquer fator de risco (KALMAR, 2006).

Há estudos que correlacionam a ocorrência do carcinoma epidermoide oral ao histórico familiar, à higiene oral deficiente, refluxo gastroesofágico, inalação de gases provenientes de material de pintura e gasolina, hábito de consumir maconha, e infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) (MAO, HONG e PAPADIMITRAKOPOILOU, 2004; APPLEBAUM *et al.*, 2007; GILLISON, 2007; SCULLY e BAGAN, 2009b). Pacientes tabagistas e etilistas com tumores primários podem apresentar lesões pré-malignas múltiplas no trato digestivo superior, e têm maior chance de desenvolvimento de tumores secundários. Enquanto, indivíduos não tabagistas e não etilistas têm menor risco de desenvolver tumores secundários, mas essa possibilidade não pode ser descartada (FORASTIERE *et al.*, 2001).

Muitas neoplasias de cabeça e pescoço são originárias de células epiteliais, e a maioria delas acomete a cavidade oral (SCULLY e BAGAN, 2009a). As lesões de carcinoma epidermoide oral são classificadas em lesões de alto e baixo grau, histopatologicamente, as de alto grau apresentam queratinização, pleomorfismo nuclear e figuras de mitose frequentes; e as de baixo grau apresentam queratinização mais extensa, raras figuras de mitose e pleomorfismo nuclear, podendo muitas vezes ser mantida a orientação basal no epitélio (CHEN e MYERS, 2001). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são diagnosticadas como: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (BARNES *et al.*, 2009). Estes graus de diferenciação e as características extremamente invasivas do carcinoma epidermoide oral, também, demonstram um potencial significativo para a ocorrência de metástases (BARNES *et al.*, 2009; HOOPER, WILSON e CREAN, 2009; NEVILLE *et al.*, 2009), primeiramente para os linfonodos cervicais devido à extensa drenagem linfática da cavidade oral (CHEN e MYERS, 2001).

Assim como ocorre em outros tipos de neoplasias, a manifestação do carcinoma epidermoide oral acontece através de alterações essenciais na fisiologia celular. No primeiro momento, a célula se torna autossuficiente, sendo insensível aos sinais inibitórios ao crescimento e aos sinais apoptóticos. Essas células adquirem, também, um potencial de replicações ilimitado além de um potencial angiogênico e, finalmente se tornam capazes de realizar proteólise da membrana basal e invadir os tecidos adjacentes além do potencial metastático (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

O queratinócito é a célula que dá origem a doença. Alterações no seu DNA, frequentemente espontâneas, mas com potencial aumentado em virtude de exposição aos fatores de risco, promovem a mudança de células normais para pré-malignas ou malignas, as tornando autossuficientes. Essa manifestação dentro do epitélio ocorre próximo a membrana basal, com uma expansão dos queratinócitos germinativos, na direção superior e lateral, substituindo o epitélio normal (BETTENDORF, PIFFKÒ e BÀNKFALVI, 2004; BROUMAND, LOZANO e GOMEZ, 2006; SCULLY, 2009; SCULLY e BAGAN, 2009a). A invasão da membrana basal do epitélio acontece após algum tempo, caracterizando o tumor como invasivo. Uma das propriedades dos tumores malignos é um padrão de crescimento desorganizado e limites irregulares atingindo os tecidos circundantes. Esses são invadidos pela proliferação de células epiteliais e posteriormente metástases (BETTENDORF, PIFFKÒ e BÀNKFALVI, 2004; ALBERTS *et al.*, 2008; SCULLY, 2009; SCULLY e BAGAN, 2009a).

O movimento das células neoplásicas através da matriz extracelular e a invasão para o tecido circundante requer uma transição de células diferenciadas e organizadas num tecido de características não invasivas para células de perfil migratório e fenótipo invasivo. Para que essa transição ocorra essas células sofrem alterações de forma e nos queratinócitos a morfologia assumida após essa diferenciação é de células alongadas, típicas de um perfil invasivo. Mudanças de polaridade ocorrem levando a perda de adesões célula-célula com rearranjos do citoesqueleto e perda da homeostase epitelial (ANETA *et al.*, 2016). Dessa forma a célula adentra a um vaso sanguíneo ou linfático, atravessando a lâmina basal e o revestimento endotelial do vaso, permitindo sua saída em outra parte do corpo, formando no local um pequeno grupo celular chamado micrometástase. Quando estas produzem células que sobrevivem e proliferam extensivamente, está completo o processo de metástase (ALBINI E NOONAN, 2010).

Em casos iniciais de carcinoma epidermoide oral, as lesões são, geralmente, assintomáticas, pequenas, bem demarcadas e com ligeira rugosidade. Podem ser leucoplásicas (brancas), eritroplásicas (vermelhas) ou eritroleucoplásicas (vermelhas e brancas). A elasticidade da mucosa pode estar alterada e pode haver uma sensação de endurecimento à palpação. A maioria dos casos é indolor, no entanto o paciente pode relatar algum desconforto. Lesões persistentes por mais de três semanas são tidas como lesões suspeitas de carcinoma epidermoide oral (BAGAN, SARRION e JIMENEZ, 2010).

O principal indicador de lesões avançadas é a presença de metástase cervical que, também, caracteriza um pior prognóstico desses pacientes (CHEN e MYERS, 2001). A linfadenomegalia cervical pode ser causada por metástases ou por infecção secundária ao tumor. Linfonodos positivos podem ser detectados mesmo na ausência de tumor primário evidente (SCULLY, 2009). Em órgãos distantes, as metástases mais comuns são em linfonodos, pulmão, ossos e cérebro (BROUMAND, LOZANO e GOMEZ, 2006).

A avaliação de um paciente com suspeita de tumores dessa natureza exige biópsia, estudos radiográficos para avaliação da extensão da doença, exame físico e anamnese detalhados. Pesquisa de sintomas como: disfagia, hemoptise, rouquidão, sangramento, trismo, salivação excessiva, dificuldade respiratória e mudança de voz por períodos prolongados podem caracterizar tumores invasivos e avançados (CHEN e MYERS, 2001).

As estratégias de tratamento incluem excisão cirúrgica, quimioterapia e radioterapia e podem ser aplicadas de maneira isolada ou concomitante (FORASTIERE *et al.*, 2001). Excisões cirúrgicas em lesões de tamanho reduzido não exigem procedimentos reconstrutivos, o que não acontece nos casos mais avançados que necessitam de ressecções mais extensas (CHEN e MYERS, 2001). O diagnóstico precoce é fundamental para reduzir a extensão cirúrgica e para aumentar a taxa de sobrevida dos pacientes, podendo atingir níveis de 80% a 90% de cura nos primeiros estágios da doença (BAGAN, SARRION e JIMENEZ, 2010). Os índices prognósticos do carcinoma epidermoide oral são relativamente desfavoráveis com uma sobrevida de aproximadamente cinco anos, que corresponde a uma sobrevida global em torno de 56% (BELL *et al.*, 2007).

### 2.3. Fatores de crescimento e seus receptores

O comportamento celular é regulado através da ação de vias de sinalização intracelular, que são ativadas através da ligação de moléculas extracelulares a receptores da membrana e subsequente ativação de proteínas efetoras. Vários processos celulares são regulados pela ativação de receptores de fatores de crescimento após a ligação com seus fatores específicos, essa ativação acontece pela fosforilação da tirosina, já que esses receptores possuem um domínio proteína quinase. Proliferação, diferenciação, progressão do ciclo celular, sinalização de neurotransmissores são exemplos de processos celulares regulados pelos receptores de fatores de crescimento (POLLARD e EARNSHAW, 2006; ALBERTS *et al.*, 2008; HUNTER, 2014).

Os receptores tirosina quinases (RTKs) podem ativar as proteínas efetoras de duas maneiras diferentes. A primeira está relacionada com a ligação da proteína efetora com a fosfotirosina do receptor promovendo a fosforilação através do seu domínio quinase. A proximidade dos efetores junto a membrana constitui o segundo meio de ativação já que a aproximação dos efetores com seus substratos gera a ligação com o receptor e promove a atividade celular (HUNTER, 2014).

Os FGFs são polipeptídios que exercem várias funções como emissões de sinais de desenvolvimento, manutenção da homeostase dos tecidos, regulação dos processos metabólicos, angiogênese, reparo tecidual, tumorigênese entre outras (CHOI *et al.*, 2001; BELOV e MOHAMMADI, 2013; FEARON, GOULD e GROSE, 2013; SANDHU, BAICHOO e ROBERTS, 2014). Os FGFs compõem uma família de 18 proteínas subdivididas em cinco subfamílias de ação parácrina e uma subfamília de ação endócrina. Suas funções são exercidas ao estabelecer a ligação entre os FGFs e seus receptores específicos, denominados FGFRs (MOHAMMADI, OLSEN e IBRAHIMI, 2005; GOETZ e MOHAMMADI, 2013).

Vários tipos de células e tecidos expressam os FGFRs, que são RTKs, e nos mamíferos são quatro tipos: FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 (GOETZ e MOHAMMADI, 2013). Cada um destes receptores tem diferentes capacidades de sinalização embora apresentem semelhanças nas suas estruturas. Nos FGFRs, a ativação é induzida pelos subconjuntos de ligantes, já que a principal semelhança entre estes receptores está nos domínios tirosina quinases (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012).

Na carcinogênese, a sinalização FGF-FGFR participa da regulação de processos celulares que incluem proliferação, sobrevivência e migração celular, mas funções supressoras tumorais como proteção a danos celulares e vigilância imunológica, também, já foram descritas nessa via de sinalização (TURNER e GROSE, 2010). Duas moléculas de FGF estabelecem uma ligação na porção extracelular dos receptores em conjunto com proteoglicanos de sulfato de heparano, resultando numa mudança na conformação da estrutura do receptor, sua dimerização e ativação (ORNITZ e ITOH, 2001).

Os PDGFs regulam o crescimento de células do tecido conjuntivo como os fibroblastos e células do músculo liso, e ao atuarem em células mesenquimais regulam principalmente a formação de vasos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário. São secretados por plaquetas ativadas e por outros tipos de células como as endoteliais, epiteliais, células da glia e inflamatórias. A família dos PDGFs é composta pelas isoformas: PDGF A, PDGF B, PDGF C e PDGF D cujos receptores, PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ , são do tipo tirosina quinases e desempenham funções fisiológicas distintas (DEMOULIN e ESSAGHIR, 2014).

A expressão de ambos, PDGF e PDGFR, é controlada na idade adulta. Essa sinalização está associada a algumas condições patológicas incluindo doenças fibróticas, proliferativas vasculares e em processos patológicos associados a neoplasias. A sinalização PDGF-PDGFR tem participação em processos como crescimento autócrino das células tumorais, angiogênese, além de recrutar e regular a ação de fibroblastos tumorais (OSTMAN, 2004).

A sinalização de PDGF, por regular funções de células do estroma, pode limitar a distribuição de drogas aos tumores por efeitos sobre a pressão do tecido intersticial, angiogênese e metástase. O fornecimento de oxigênio e de nutrientes para células tumorais é fundamental para manutenção do tumor, e acontece em virtude da neovascularização. Em carcinomas, a sinalização autócrina do PDGF atua nos processos de invasão e metástase, já o recrutamento de diferentes tipos celulares do estroma acontece através da sinalização parácrina do PDGF (ANDRAE, GALLINI e BETSHOLTZ, 2008).

O VEGF tem papel na regulação da embriogênese, do crescimento do esqueleto, das funções reprodutoras e atuam na angiogênese fisiológica, além de papel primordial no desenvolvimento e na diferenciação do sistema vascular (FERRARA e ALITALO, 1999). A família dos VEGFs é composta pelas isoformas VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e VEGFE, e a

produção desses fatores acontece após estímulos como ativação de oncogenes, ação de citocinas e fatores de crescimento e em resposta aos estímulos ambientais (VASSILAKOPOULOU, PSYRRI e ARGIRIS, 2015).

Os VEGFRs são receptores do tipo tirosina quinases, apresentam três isoformas, VEGFR 1, VEGFR 2 e VEGFR 3 e quando ativados, através da ligação com os VEGF, desempenham funções específicas (KOWANETZ e FERRARA, 2006). A função do VEGF não está relacionada somente às células endoteliais, atualmente, são descritas funções desse fator mediando sinalizações em células tumorais (GOEL e MERCURIO, 2013). Processos celulares como proliferação, migração e invasão das células tumorais sofrem atuação da sinalização VEGF-VEGFR (VASSILAKOPOULOU, PSYRRI e ARGIRIS, 2015).

A angiogênese é o principal fator na progressão tumoral e no potencial metastático de tumores sólidos (STÎNGĂ *et al.*, 2011). A ativação da vias VEGFs-VEGFRs geram respostas importantes para o crescimento acelerado dos tumores (KOWANETZ e FERRARA, 2006). A ação dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 é diferente (FERRARA, GERBER e LECOUTER, 2003), mas ambas contribuem para a neovascularização, o crescimento tumoral e as metástases (KOWANETZ e FERRARA, 2006).

Atualmente, os estudos envolvendo inibição das vias angiogênicas tumorais têm despertado muito interesse (OSTMAN, 2004). Têm sido desenvolvidos inibidores de RTKs de alvos múltiplos, em virtude das semelhanças estruturais entre os domínios quinases de alguns desses receptores como por exemplo entre os FGFRs e os VEGFRs (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012). Evidências atuais apontam a participação da via PDGF-PDGFR na angiogênese tumoral (OSTMAN, 2004). O estudo dessas vias de transdução de sinal é necessário em virtude da complexidade de suas atuações além da avaliação das respostas de inibição de cada via relacionada aos fatores de crescimento (FERRARA e ALITALO, 1999). O bloqueio desses receptores inibindo vários processos celulares como angiogênese tumoral, proliferação e migração celular pode apontar redução da eficácia desses inibidores (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012).

#### 2.4. TKI-258

Os inibidores tirosina quinases são pequenas moléculas, que em contraste com os anticorpos monoclonais, têm a capacidade de atravessar a membrana celular (IMAI e TAKAOKA, 2006). A ação desses inibidores ocorre através de sua ligação com a porção correspondente a ligação da molécula de ATP no domínio quinase dos receptores. Sua seletividade é determinada pela estrutura química, já que não possuem semelhanças estruturais com o ATP (LIANG *et al.*, 2013). Os inibidores que têm propensão para inibir alvos múltiplos são uma recente modalidade de terapia para tratamento de neoplasias (KARAMAN *et al.*, 2008). O TKI-258 (CHIR-258 ou Dovitinib) é um potente inibidor de RTKs (HUYNH *et al.*, 2012), que inibe a autofosforilação dos receptores: FGFRs, VEGFRs e PDGFRs (KIM *et al.*, 2011). A inibição direta desses três receptores inibe a proliferação celular e a redução da densidade microvascular intratumoral (LEE *et al.*, 2005).

A ação antitumoral do TKI-258 ocorre através da inibição direta de FGFR e PDGFR, e sua atividade antiangiogênica por inibição desses receptores e do VEGFR. Sua eficácia como potencial antitumoral e antiangiogênico já foi demonstrada, houve a regressão e estabilização de tumores em ratas, e nos modelos de linhagens celulares de neoplasia de colo uterino, houve a inibição da expressão gênica dos fatores de crescimento celular (LEE *et al.*, 2005). O TKI-258 inibe a proliferação, reduz a densidade microvascular e induz a apoptose em modelos tumorais (SARKER *et al.*, 2008). Essa relação como potencial antitumoral e antiangiogênico associados à modulação da atividade biológica dos receptores tirosina quinases é necessária para terapias clínicas bem sucedidas (LEE *et al.*, 2005). Estudo com linhagens celulares de carcinoma hepatocelular apontou a significativa redução da fosforilação do FGFR-1 e o bloqueio do FGF-2, impedindo a migração dessas células com o uso de TKI-258 (SANDHU, BAICHO e ROBERTS, 2014).

O TKI-258 ainda não está disponível comercialmente. Estudos clínicos com tumores pancreáticos (ZHANG *et al.*, 2014), de mama e renais (ROBAK e ROBAK, 2012) já foram relatados. Estudos clínicos de primeira fase em humanos estão sendo realizados para determinar a dose máxima tolerada e os limites de toxicidade do TKI-258 em pacientes com tumores sólidos em estágios avançados (SARKER *et al.*, 2008).

### **3.HIPÓTESE**

---

O tratamento com TKI-258 em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4 leva à desorganização do citoesqueleto de actina, inibição da migração e da invasão celular.

## **4.OBJETIVOS**

---

#### **4.1. Objetivo geral**

- Avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a motilidade de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre o citoesqueleto de actina em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4, por meio de marcação com rodamina conjugada à faloidina.

- Comparar o número de células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 que migraram em ensaio de migração tridimensional.

- Comparar o número de células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 que invadiram a membrana recoberta com Matrigel™ em ensaio de invasão celular tridimensional.

## 5.MATERIAL E MÉTODOS

---

### 5.1. Casuística

Foram utilizadas células da linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral humano da ATCC® (American Type Culture Collection) obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Por se tratar de estudo com linhagem de células comercialmente disponíveis, este projeto de pesquisa foi dispensado da aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Anexo 1).

### 5.2. Reagentes

O inibidor TKI-258 foi obtido da Selleck Chemicals (Houston, TX). O *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Penicilina, Estreptomicina, *L-Glutamine*, *Dimethylsulfoxide* (DMSO), *4',6-diamidino-2-fenilindole* (DAPI), *bovine serum albumin* (BSA), Triton X-100 0,2%, paraformaldeído e os sais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A hidrocortisona foi obtida da Ariston (São Paulo, SP). O *HAM-F12 Nutrient Mixture* (HAM-F12) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Invitrogen (Grand Island, NY) e da Cutilab (Campinas, SP), respectivamente. A rodamina conjugada à faloidina foi obtida da Molecular Probes (Eugene, OR) e o Vectashield® da Vector Laboratories (Burlingame, CA, EUA). O Instant Prov Newprov® foi obtido da Newprov (Pinhais, PR).

### 5.3. Cultura das células de carcinoma epidermoide oral SCC-4

As células SCC-4 foram cultivadas em garrafas, contendo meio DMEM 1:1 HAM F12, SFB 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 400 ng/mL de hidrocortisona e 10 µL/mL de glutamina em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C.

### 5.4. Avaliação do citoesqueleto de actina

Para análise do efeito do TKI-258 sobre o citoesqueleto de actina das células SCC-4, a F-actina foi evidenciada com rodamina conjugada à faloidina. Cerca de 1x10<sup>4</sup> células SCC-4 por poço foram semeadas em Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) 1:2 meio sobre lamínulas em placa de seis poços recobertas, em triplicatas. As células controle e as células tratadas com três concentrações TKI-258 (1 µM, 5 µM e 10 µM) foram incubadas por 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C.

As células foram lavadas com D-PBS (KCl 2,67 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, NaCl 138 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8,1 mM) por duas vezes com duração de cinco minutos cada lavagem. A fixação foi feita com paraformaldeído 4% por uma hora. Foi feita a permeabilização com D-PBS/Triton X-100 0,2% por cinco minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com BSA 3% por 20 minutos. Foi realizada lavagem por 10 minutos com D-PBS por duas vezes. A evidenciação da F-actina foi feita com rodamina conjugada à faloidina, 1:100 D-PBS por 30 minutos à temperatura ambiente e em ambiente escuro. Lavagem com D-PBS por cinco minutos por duas vezes. A evidenciação dos núcleos foi feita com DAPI 1:500 à temperatura ambiente e em ambiente escuro por 5 minutos. Após lavagem com D-PBS por cinco minutos por duas vezes, as lâminas foram montadas com Vectashield®. Os resultados foram analisados em toda a extensão das lamínulas.

### **5.5. Ensaio de migração celular**

Em cada poço superior da placa de migração celular (*BD BioCoat™ 24-well plate*, 8,0 µm, BD Bioscience, Bedford, MA), foram semeadas 1x10<sup>4</sup> células SCC-4 em triplicatas: controle e tratadas com TKI-258 nas concentrações de 1 µM, 5 µM e 10 µM. Nos poços inferiores, foi adicionado meio contendo SFB 20%. As placas foram incubadas por 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C.

O meio dos poços superiores foram descartados e as células que não migraram foram removidas com *swab*. As células que migraram através da membrana foram fixadas com Metanol 30% por 30 segundos e coradas com Instant ProV Newprov®, conforme instruções do fabricante.

### **5.6. Ensaio de invasão celular**

Em cada poço superior da placa de invasão celular com membrana recoberta com Matrigel™ (*BD Matrigel™ Invasion Chamber 24-well plate*, 8,0 µm, BD Bioscience, Bedford, MA) foram semeadas 1x10<sup>5</sup> células SCC-4 em triplicatas: controle e tratadas com TKI-258 na concentração de 5 µM. Nos poços inferiores, foi adicionado meio contendo SFB 20%. As placas foram incubadas por 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO<sub>2</sub>/95% ar a 37°C.

O meio dos poços superiores foram descartados e as células que não invadiram a membrana recoberta com Matrigel™ foram removidas com *swab*. As células que migraram através da membrana foram fixadas com Metanol 30% por 30 segundos e coradas com Instant Prov Newprov®, conforme instruções do fabricante.

### **5.7. Morfometria**

A contagem das células foi feita em toda área da membrana para avaliar o efeito do TKI sobre a migração celular e, em 10 campos aleatórios da membrana recoberta com Matrigel™ para avaliar o efeito do TKI-258 sobre a invasão celular, com objetiva de 20x.

### **5.8. Análise estatística**

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados com o programa IBM SPSS 16.0® (Chicago, IL, USA) e os gráficos foram gerados através do programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

Os dados obtidos pela avaliação da migração celular foram analisados com o teste de homogeneidade de variância de Levene, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. E, os resultados da avaliação da invasão celular foram analisados com o teste Kolmogorov-Smirnov e teste t.

As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **5.9. Observação e obtenção de imagens**

As imagens das células analisadas nos ensaios de migração e invasão foram obtidas em microscópio invertido AXIO Vert A1 (Zeiss®, Göttingen, Lower Saxony, Germany). As imagens de fluorescência foram obtidas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 Meta (Zeiss®, Göttingen, Lower Saxony, Germany). Os parâmetros de intensidade dos lasers foram fixados para análise de todas as amostras. As figuras foram montadas com o programa Photoshop 7.0.1®.

## **6.RESULTADOS**

---

### **6.1. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a organização do citoesqueleto de actina de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4**

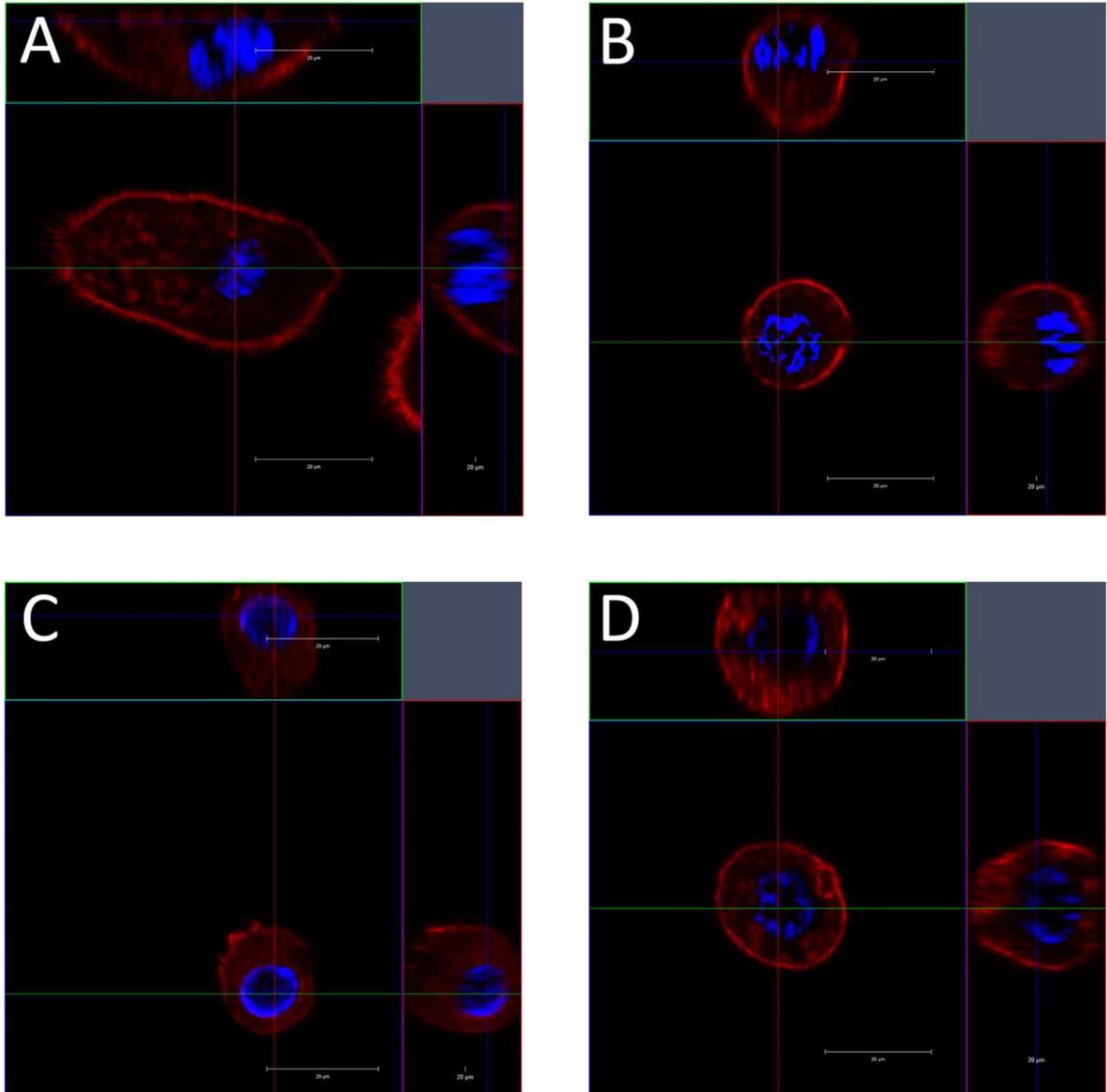
Para avaliar o efeito do TKI-258 sobre a organização do citoesqueleto de actina das células SCC-4 foram tratadas com as concentrações de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de TKI-258 por 24 horas. As células foram cultivadas em Matrigel™ para análise tridimensional.

As células SCC-4 controle apresentavam citoplasma abundante e os núcleos esféricos tinham cromatina evidente. A maioria das células apresentou polarização celular. O citoesqueleto de actina estava bem desenvolvido, com filamentos de actina, e córtex celular evidentes. Foram vistos filopódios na maioria das células controle (Figura 1A).

O tratamento com TKI-258 na concentração de 1  $\mu$ M resultou em células com morfologia arredondada e citoplasma reduzido. Os núcleos foram vistos sem alterações evidentes. O córtex celular estava conservado. Em algumas células, os filopódios estavam presentes. Não foram vistos filamentos de actina contínuos quando comparado às células controle, esses apresentaram uma desorganização na sua estrutura (Figura 1B).

Células SCC-4 tratadas com TKI-258 na concentração de 5  $\mu$ M, também, apresentaram morfologia arredondada, citoplasma reduzido, e núcleo sem alteração. Também, o córtex celular era evidente, raros filopódios foram vistos, e a F-actina tinha aspecto desorganizado (Figura 1C).

As células tratadas com TKI-258 na concentração de 10  $\mu$ M apresentaram: morfologia arredondada, citoplasma reduzido, núcleo sem alteração evidente, córtex celular preservado, não foram vistos filopódios, e os filamentos de actina apareceram desorganizados (Figura 1D).



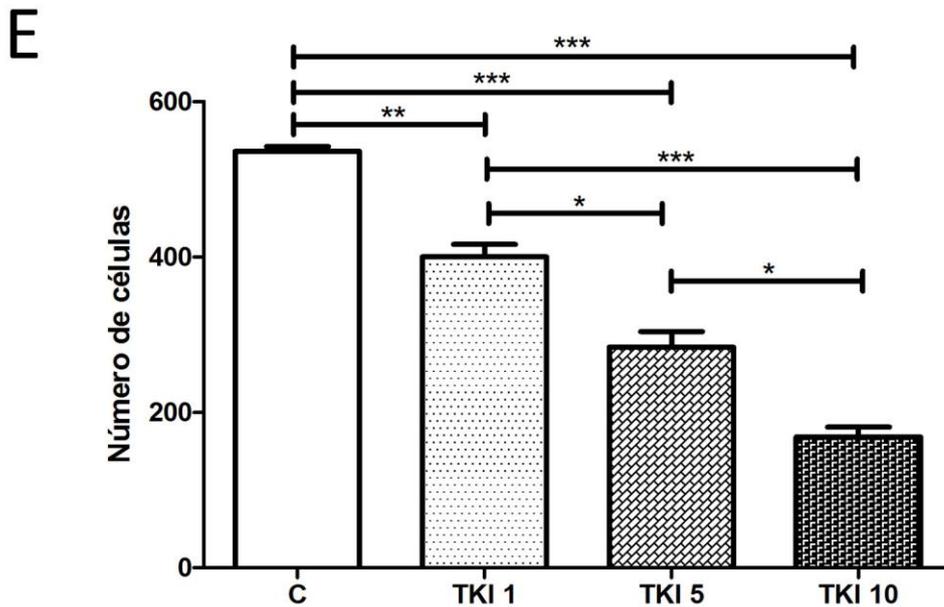
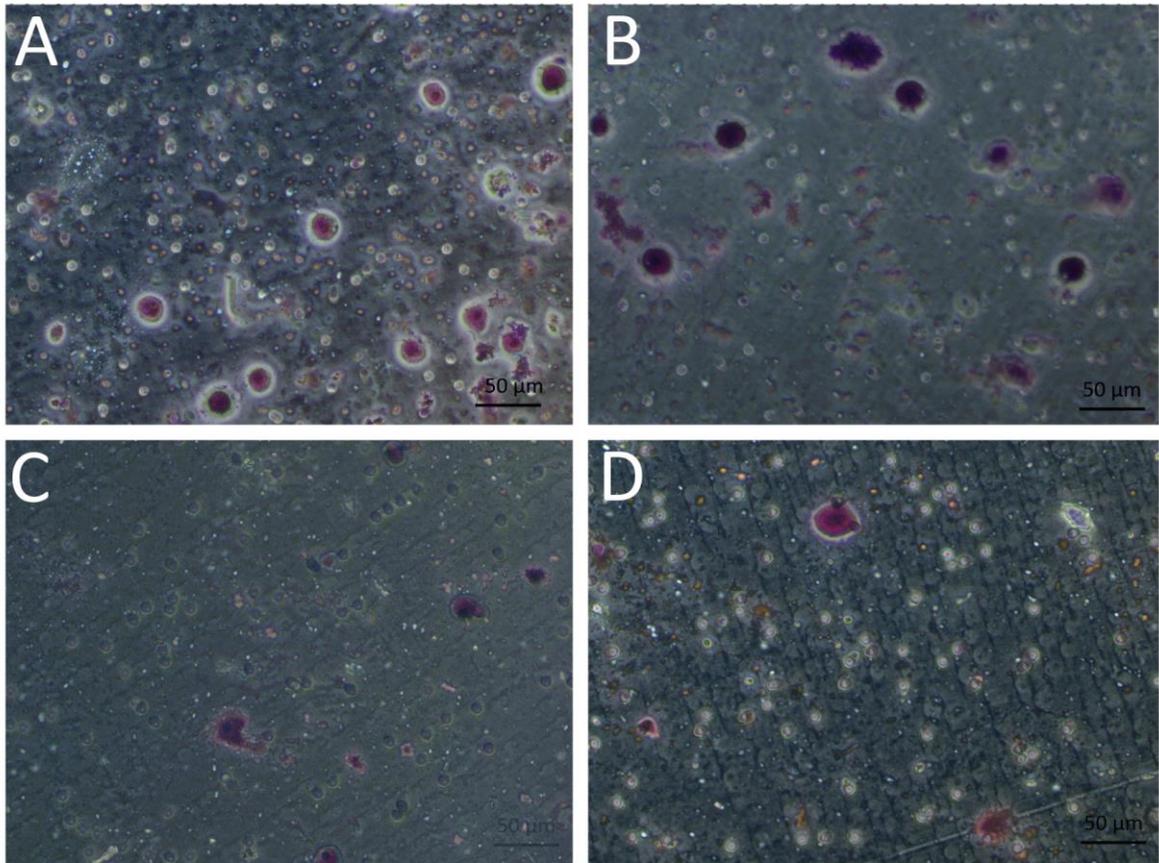
**Figura 1. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a organização do citoesqueleto de actina de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4.** Imagens compactadas em três planos obtidas da varredura sequencial por microscopia confocal de varredura a laser do citoesqueleto de actina evidenciado com rodamina conjugada à faloidina (vermelho) e núcleos com DAPI (azul). (A) Células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258: 1  $\mu$ M (B), 5  $\mu$ M (C) e 10  $\mu$ M (D) por 24 horas.

## **6.2. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a migração celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4**

Para avaliar o efeito do TKI-258 sobre a migração celular, as células SCC-4 controle e tratadas em três concentrações: 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  que migraram através da membrana foram contadas após 24 horas de incubação.

O tratamento com TKI-258 inibiu o número de células migratórias [ $F(3, 10) = 97,749$ ,  $p < 0,0001$ ], uma vez que quando comparado ao número de células controle ( $536,00 \pm 10,44$  células), o número de células tratadas que migraram foi significativamente menor nas três concentrações estudadas: 1  $\mu\text{M}$  ( $400,33 \pm 27,39$  células,  $p < 0,001$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $283,67 \pm 35,13$  células,  $p < 0,0001$ ) e 10  $\mu\text{M}$  ( $168,50 \pm 17,67$  células,  $p < 0,0001$ ). O percentual de redução das células migratórias tratadas com TKI-258 em relação as células controle foi de: 25,3% nas células tratadas com 1  $\mu\text{M}$ , 47,1% nas células tratadas com 5  $\mu\text{M}$  e redução de 68,6% nas tratadas com 10  $\mu\text{M}$  (Figura 2).

O efeito inibitório sobre a migração dessas células foi dependente da concentração do TKI-258, tendo em vista que houve diferença estatística entre o número de células migratórias tratadas com: 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ), 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), Figura 2.



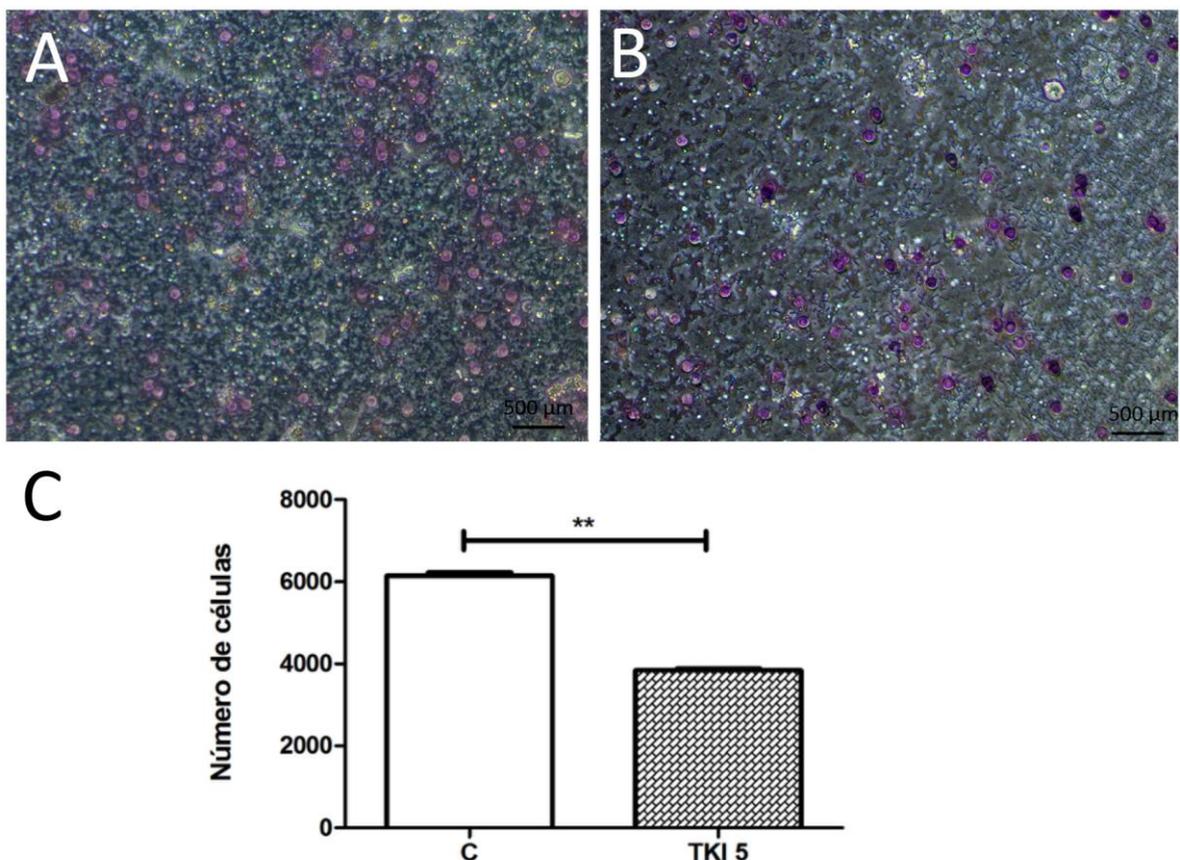
**Figura 2. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a migração celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4.**

Células migratórias contadas no ensaio de migração celular: controle (A) e tratadas com TKI-258: 1  $\mu\text{M}$  (B), 5  $\mu\text{M}$  (C) e 10  $\mu\text{M}$  (D). (E) Número de células que migraram através da membrana. ANOVA,  $p < 0,001$  e pós-teste de Tukey: C vs TKI 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ), C vs TKI 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ), C vs TKI 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ), TKI 1  $\mu\text{M}$  vs TKI 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), TKI 1  $\mu\text{M}$  vs TKI 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ), TKI 5  $\mu\text{M}$  vs TKI 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ).

### 6.3. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre a invasão celular em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4

Para avaliar o efeito do TKI-258 sobre a invasão celular, as células SCC-4 controle e tratadas com na concentração de 5  $\mu$ M que invadiram a membrana recoberta com Matrigel™ foram contadas após 24 horas de incubação.

O tratamento com TKI-258 reduziu o número de células que invadiram a membrana recoberta com Matrigel™ [t(5)=6,708, p<0,001]. O número de células tratadas com TKI-258 a 5  $\mu$ M (3.8343 $\pm$ 85,99) foi significativamente menor que o número de células controle (6.1427 $\pm$ 140,79), indicando que ocorreu uma redução de 37,6% da invasão celular (Figura 3).



**Figura 3. Efeito do tratamento com TKI-258 sobre invasão celular em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.**

Células que migraram através da membrana recoberta com Matrigel™ no ensaio de invasão celular: (A) controle e (B) tratadas com TKI-258 na concentração 5  $\mu$ M. (C) Número de células que migraram através da membrana recoberta com Matrigel™. Teste t, p<0,001.

## **7.DISSCUSSÃO**

---

Este estudo demonstrou por meio de ensaios tridimensionais que o tratamento com TKI-258, inibidor de FGFRs, VEGFRs e PDGFRs, exerce um efeito inibitório sobre a motilidade celular, afetando a organização dos filamentos de actina, a migração celular, a invasão celular em carcinoma epidermoide oral. Foi avaliado o efeito do TKI-258 sobre a migração e invasão celular, pois, são dois processos distintos. As células podem se movimentar sem invadir os tecidos adjacentes, a capacidade de migrar é uma condição prévia a invasão, não há invasão sem migração. Migração é a capacidade das células em alterar suas posições dentro dos tecidos e atingirem órgãos à distância de maneira dirigida, enquanto invasão celular é a capacidade das células tumorais atravessarem barreiras teciduais, rompendo a membrana basal e infiltrando para tecidos subjacentes (KRAMER *et al.*, 2013).

Estudos com linhagens celulares tumorais permitem a avaliação de mecanismos moleculares que possam contribuir para o desenvolvimento de metástases ou que funcionem como marcadores prognósticos (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Neste estudo, foram utilizadas células da linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua moderadamente diferenciado, visando demonstrar o efeito inibitório do TKI-258 sobre os processos biológicos envolvidos na motilidade celular: organização do citoesqueleto de actina, migração e invasão celular.

Os microfilamentos são estruturas poliméricas que se reorganizam interagindo com várias proteínas e moléculas sinalizadoras (FIFE, MCCARROLL e KAVALLARIS, 2014). O citoesqueleto de actina é responsável pela manutenção da morfologia, polaridade celular, tráfego intracelular, divisão e motilidade celular (WINDER e AYSCOUGH, 2005). A migração celular acontece em várias etapas integradas, seu início depende da formação de estruturas protrusivas na membrana celular (POLLARD e BORISY, 2003), resultantes da reorganização do citoesqueleto de actina (FIFE, MCCARROLL e KAVALLARIS, 2014).

A actina é um componente essencial no citoesqueleto de células eucarióticas (WINDER e AYSCOUGH, 2005), seus filamentos contribuem para diversas atividades celulares que derivam de interações entre suas isoformas. Existem as formas de actina nas células: monomérica (G-actina) e polimérica (F-actina), que hidrolisam a ATP em adenosina difosfato (ADP) liberando um fosfato inorgânico (Pi), permitindo a incorporação da actina em um filamento crescente (GUNNING, O'NEILL e HARDEMAN, 2008).

Sinais originados no meio extracelular interferem na regulação dinâmica do citoesqueleto de actina através da transdução de sinal nas vias, que regulam diretamente esse processo. Hormônios, substâncias biologicamente ativas e fatores de crescimento são exemplos de moléculas sinalizadoras que promovem as reorganizações do citoesqueleto de actina (HUNG e TERMAN, 2011). Por inibir receptores de fatores de crescimento (FGFRs, PDGFRs e VEGFRs), o tratamento com TKI-258 levou às células a apresentarem uma desorganização no citoesqueleto de actina.

Este estudo mostrou que ocorre uma redução da formação de filopódios em células SCC-4 tratadas com TKI-258 nas três concentrações testadas. Lamelipódios e filopódios são projeções da membrana formadas após os rearranjos do citoesqueleto de actina e que promovem a migração celular. A formação dos lamelipódios acontece com a polimerização de filamentos de actina na borda das células, alongando os filamentos dessa região e tendo como resultado protrusões da membrana (CASE e WATERMAN, 2015). Os filopódios são saliências da membrana plasmática, formadas pela polarização de filamentos de actina que permitem às células identificarem as características do ambiente em que encontram. São estruturas que desempenham papéis na cicatrização de feridas, adesão à matriz extracelular e tem papel na migração celular já que através de substâncias quimioatrativas determinam a direção em que a célula deve se movimentar (ARJONEN, KAUKONEN e IVASKA, 2011; CHANG *et al.*, 2016).

A dinâmica do citoesqueleto é regulada pela via de sinalização da família das GTPases Rho consequentemente influenciam na migração celular mas também regulam processos como polaridade e ciclo celular (JAFFE e HALL, 2005; HALL, 2012). As GTPases Rho: Rho, Rac e Cdc42 regulam vias de transdução de sinal, se ligando a receptores na membrana plasmática para montagem de distintas estruturas dos filamentos de actina (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002; VEGA e RIDLEY, 2008; HALL, 2012). Os membros RhoA, RhoB e RhoC da subfamília Rho se ligam as proteínas ROCKS, suas efetoras, que atuam na manutenção do córtex celular (HALL, 2012). As proteínas Rac quando ativadas se ligam às proteínas efetoras do complexo WAVE e promovem reorganização do citoesqueleto de actina com a formação dos lamelipódios (RIDLEY, 2015). A formação dos filopódios acontece pela interação de Cdc42 ativada as suas efetoras mDia (RIDLEY, 2015) e a proteínas do complexo WASP (FARHAN e HSU, 2016). As vias dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs,

que neste estudo foram bloqueadas pelo TKI-258, provavelmente têm papel na ativação da sinalização de Cdc42 e suas efetoras, já que nas células tratadas a formação de filopódios foi reduzida.

A presença de assimetria no interior das células resulta em polaridade celular, para que as células desempenhem funções específicas já que a distribuição espacial de suas organelas sofre alterações (MACK e GEORGIU, 2014). A polaridade ápico-basal é essencial para a manutenção dos tecidos já que são importantes para a proliferação de células epiteliais normais. Falhas na polaridade ápico-basal estão relacionados a várias doenças, especialmente ao câncer (LO, HAWROT e GEORGIU, 2012). As GTPases Rac e Cdc42 quando ativadas polimerizam a actina e proporcionam o movimento celular para frente, enquanto RhoA atua na porção oposta promovendo a contração das fibras de actomiosina (RIDLEY *et al.*, 2003). Neste estudo, as células controle apresentaram polaridade celular, com citoplasma abundante e núcleos excêntricos, enquanto as células tratadas mostraram núcleos centrais e morfologia arredondada, possivelmente a atuação do TKI-258 inibindo a transdução de sinal da via da GTPase Cdc42 pode ter sido a causa para a perda da polaridade celular.

Este estudo mostrou que as células tratadas com TKI-258 adquiriram morfologia arredondada. A reorganização dos filamentos de actina é essencial para possibilitar a motilidade celular (GUNNING, O'NEILL e HARDEMAN, 2008). Há diferenças na migração celular mesenquimal e na ameboide. O fenótipo celular é alterado de acordo com o tipo de migração das células, sendo comum nesses dois tipos de migração a perda total do contato célula-célula. Na migração mesenquimal as células apresentam morfologia alongada, e tem associadas à protrusão de filamentos de F-actina. Na migração ameboide as células apresentam morfologia arredondada (SAHAI e MARSHALL, 2003; ANETA *et al.*, 2016), como a observada neste estudo nas células tratadas com TKI-258. A migração ameboide também promove alterações na adesão das células à matriz extracelular, indicando um estado de desdiferenciação celular (ANETA *et al.*, 2016).

O crescimento tumoral inicial acontece após a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, conferindo as células tumorais uma resistência à apoptose. As células metastáticas desencadeiam várias etapas para se alojarem em sítios distantes. A perda de adesão célula-célula resulta em um desprendimento das células neoplásicas de

suas limitações e as células sofrem transição epitélio-mesenquimal. Um perfil invasivo das células tumorais é expresso através da síntese de proteases, a célula metastática se desprende do sítio tumoral primário e adentra em vaso sanguíneo, formado durante a progressão do tumor, rompendo a membrana basal vascular e o revestimento endotelial (ALBINI e NOONAN, 2010), por isto, utilizamos, neste estudo, o modelo de ensaio de invasão celular com membrana recoberta com Matrigel™.

O extravasamento da célula metastática para o vaso acontece em conjunto com inúmeras células que tem potencial heterotípico. Durante o desenvolvimento do tumor, mudanças imunológicas ocorrem nas células primárias conferindo resistência às turbulências e à vigilância imunológica, contribuindo para a sobrevivência das células tumorais no sistema circulatório. Citocinas e quimiocinas do sítio pré-metastático podem induzir o extravasamento das células tumorais para locais distantes do tumor primário (ALBINI e NOONAN, 2010). Neste estudo, foi utilizada uma concentração maior de SFB como quimioatrativo para as células SCC-4, já que o SFB possui fatores de crescimento em sua composição (ZHENG *et al.*, 2006). Aglomerados de células tumorais se formam no tecido alvo e invadem o microambiente local por pressão física, reiniciando o ciclo de progressão e completando o processo de metástase (ALBINI e NOONAN, 2010).

Para que ocorra a migração, as células devem interagir com a matriz extracelular enquanto para invadir as células necessitam de adesão, proteólise de componentes da matriz extracelular e, então, migrar (KRAMER *et al.*, 2013). A migração celular desempenha papel crucial em vários fenômenos biológicos como na embriogênese, na renovação da pele e na vigilância imunológica (LAUFFENBURGER e HORWITZ, 1996), mas, também em processos patológicos como doenças inflamatórias, vasculares e a formação de tumores e metástases (HORWITZ e WEBB, 2003). Interações recíprocas entre o microambiente e as células tumorais contribuem para a sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (SLEEMAN *et al.*, 2012).

Além de ser uma neoplasia epitelial extremamente invasiva e com graus de diferenciação histológica, o carcinoma epidermoide oral possui grande potencial para metástases, principalmente via vasos linfáticos para os linfonodos cervicais. Neste tumor, as metástases mais comuns são em: linfonodos, pulmão, ossos e cérebro (BROUMAND, LOZANO e GOMEZ, 2006). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o TKI-258 é um potencial

tratamento antimetastático para carcinoma epidermoide oral, possivelmente pela inibição das vias dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs.

A atividade inibitória do TKI-258 na sinalização dos FGFRs parece ser mais eficaz quando as células tumorais têm uma maior expressão de FGFR-2, como descrito num estudo que utilizou linhagens de células pancreáticas tratadas com TKI-258 por três dias (ZHANG *et al.*, 2014). A potência de inibição bioquímica da fosforilação do VEGFR-2 e do PDGFR $\beta$  é similar, e a inibição da fosforilação do FGFR-1 é três vezes menos potente, *in vitro*, pelo TKI-258. Além desses receptores, o TKI-258 também inibe o VEGFR-1/3 e FGFR-3 (RENHOWE *et al.*, 2009). O TKI-258 também foi relatado com inibidor dos receptores VEGFR-1/2, FGFR-1/3 e PDGFR $\beta$  (LEE *et al.*, 2005; ANDRÉ e CORTÉS, 2015), FGFR-2 (DEY *et al.*, 2010), bFGFR, PDGFR e VEGFR (ZANG *et al.*, 2015). A inibição dos receptores FGFR-1 e FGFR substrato 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ) também já foi relatada (HUYNH *et al.*, 2012).

Os receptores de fatores de crescimento possuem um domínio proteína quinase para fosforilação da tirosina. Quando ativados pela ligação do fator de crescimento ao seu receptor específico, regulam diversos fenômenos celulares como proliferação celular, diferenciação, progressão do ciclo celular, sinalização de neurotransmissores, resposta imune, ação da insulina e transcrição gênica. A ativação das proteínas efetoras é feita de duas formas distintas pelos receptores tirosina quinases. Por meio da ligação da proteína efetora com uma fosfotirosina do receptor auxiliando a fosforilação pela sua quinase. A segunda acontece em virtude da estreita proximidade dos efetores junto à membrana, apenas a ligação com o receptor promove a atividade da célula em virtude da aproximação dos efetores com seus substratos (HUNTER, 2014). Os receptores tirosina quinases são proteínas transmembranares do tipo I com um domínio extracelular e outro intracelular que inclui um domínio catalítico da tirosina quinase, onde ocorre a autofosforilação. Em resposta à ligação de uma proteína ligante no domínio extracelular, como um fator de crescimento, por exemplo, a atividade do receptor tirosina quinase é aumentada, induzindo a dimerização e fosforilação intermolecular (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010). Há diferenças em detalhes específicos entre as subfamílias dos receptores tirosina quinases (HUNTER, 2014).

A superexpressão de FGFR3b foi constatada através de ensaios de imunohistoquímica em amostras de carcinoma epidermoide oral (ZHANG *et al.*, 2005). Os FGFs e seus receptores

participam de importantes vias de sinalização envolvidas na carcinogênese, que incluem: proliferação, sobrevivência e migração celular. Entretanto, foram descritas funções supressoras tumorais pela sinalização dos FGFRs, como a proteção a danos celulares, vigilância imunológica e diferenciação (TURNER e GROSE, 2010). Além disso, exercem várias funções como emissões de sinais de desenvolvimento, manutenção da homeostase dos tecidos, regulação dos processos metabólicos, angiogênese, cicatrização, reparo tecidual entre outras (CHOI *et al.*, 2001; BELOV e MOHAMMADI, 2013; FEARON, GOULD e GROSE, 2013). Embora os resultados deste estudo não permitam a identificação precisa de qual via de receptores tirosina quinases foi a responsável, possivelmente a via dos FGFRs inibida pelo TKI-258 nas células SCC-4 pode ter contribuído para a redução da migração e/ou invasão celular.

A família FGF é composta de 18 proteínas, dispostas em cinco subfamílias de ação parácrina e uma de ação endócrina, que desempenham suas funções ao se ligar com os FGFRs (MOHAMMADI, OLSEN e IBRAHIMI, 2005; GOETZ e MOHAMMADI, 2013). Os FGFRs são receptores tirosina quinases, codificados por quatro genes diferentes em mamíferos (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4). A expressão desses receptores acontece em vários tipos distintos de células e tecidos (ITOH e ORNITZ, 2004; AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012; GOETZ e MOHAMMADI, 2013). Há muitas semelhanças na estrutura dos FGFRs, especialmente nos domínios tirosina quinases que são altamente conservados e nos subconjuntos de ligantes que induzem sua ativação, além disso, os receptores parecem ter diferentes capacidades de sinalização (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012). A ativação dos FGFRs acontece quando duas moléculas de FGF juntamente com os proteoglicanos de sulfato de heparano, estabelecem uma ligação com os receptores em sua porção extracelular e ocorre a dimerização que promove mudança conformacional na estrutura do receptor, ativando-o. A atividade da quinase do receptor e a transdução do sinal aumenta de 50 a 100 vezes, principalmente na via MAPK, que resulta em crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e migração (ORNITZ e ITOH, 2001).

Em amostras de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, laringe e uma única amostra de língua, a expressão das isoformas PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  de PDGFRs foi detectada, por meio de imunohistoquímica (ONGKEKO *et al.*, 2005). PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  possuem distintos padrões de expressão e funções, o PDGFR $\alpha$  estimula o crescimento celular, estimulação da

borda celular e perda de fibras de stress, estimula ou inibe a quimiotaxia em células como fibroblastos e células de músculo liso, fraca estimulação sobre a mobilização de cálcio, enquanto o PDGF $\beta$  estimula: o crescimento celular, perda de fibras de estresse, a quimiotaxia e realiza mobilização de cálcio e inibe a comunicação de junções comunicantes e a apoptose (HELDIN e WESTERMARK, 1999).

A sinalização autócrina do PDGF exerce um papel na invasão e metástase de neoplasias epiteliais, enquanto a sinalização parácrina parece realizar recrutamento de diferentes tipos de células do estroma. O estroma vascular parece ter influência em metástases bem como células não estromais que também atuam sobre o crescimento das células neoplásicas, sobrevivência e metástases (ANDRAE, GALLINI e BETSHOLTZ, 2008).

Doenças que envolvem proliferação celular, como muitos tipos de neoplasias, inflamação, fibrose pulmonar e aterosclerose, possuem uma evidente sinalização PDGF-PDGFR, que também ocorre rapidamente durante o reparo de feridas (OSTMAN, 2004). Os PDGFs compõem uma família de quatro tipos (PDGF A, B, C e D) e se ligam aos receptores tirosina quinases, PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  (DEMOULIN e ESSAGHIR, 2014). PDGF-A, PDGF-B e PDGF-C se ligam a PDGFR $\alpha$ , enquanto o PDGF-B e PDGF-D se ligam ao PDGFR $\beta$ , promovendo a autofosforilação (KIM *et al.*, 2012). Tendo em vista que a via de sinalização do PDGFRs têm sido relacionada com a regulação das fibras de estresse e formação metástases, provavelmente a inibição pelo TKI-258 dos PDGFRs nas células SCC-4 pode ter contribuído para o efeito inibitório da migração e/ou invasão celular.

A expressão dos receptores de VEGF era descrita apenas em células endoteliais, posteriormente, sua expressão foi descrita em células tumorais (GOEL e MERCURIO, 2013), sendo considerado um possível biomarcador para prognóstico (OLIVEIRA e RIBEIRO-SILVA, 2011). Em carcinoma epidermoide oral, por meio de imunohistoquímica, a superexpressão das três isoformas de VEGFR foi detectada em 88% das amostras sendo VEGFR-3 expresso em 60% das amostras, VEGFR-1 em 56% e o VEGFR-2 foi o menos expresso sendo identificado em 42% das amostras (PIANKA *et al.*, 2015). O VEGF é produzido em resposta aos estímulos ambientais, oncogenes e a fatores de crescimento, essa via de sinalização VEGF-VEGFR atua em diferentes processos tumorais como a proliferação, migração e invasão dessas células além da permeabilidade vascular e neovascularização, sendo as vias MAPK e PI3K-AKT são as mais ativadas (VASSILAKOPOULOU, PSYRRI e ARGIRIS, 2015). As

isoformas do VEGF interagem com os VEGFRs, induzindo as vias de transdução de sinal e gerando respostas diferentes, que promovem um rápido crescimento do tumor relacionado a sua própria angiogênese (KOWANETZ e FERRARA, 2006). Embora a via de sinalização do VEGFRs pareça estar mais envolvida no processo de angiogênese, alguns autores relataram seu envolvimento na migração e invasão celular, por isto, não pode ser descartado um possível papel dessa via na inibição da migração e invasão celular vista neste estudo.

Os VEGFRs apresentam três isoformas, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 que desencadeiam a sinalização celular ao realizar as ligações específicas com os VEGFs. Os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 têm sido descritos como mediadores de funções mitogênicas e indução de angiogênese, e o VEGFR-3 desempenha papel importante na linfangiogênese (AHLUWALIA *et al.*, 2013), tem papel na regulação da embriogênese, do crescimento do esqueleto, das funções reprodutoras e atuam na angiogênese fisiológica além de papel primordial no desenvolvimento e na diferenciação do sistema vascular (FERRARA, GERBER e LECOUTER, 2003). O VEGF participa da regulação da angiogênese patológica, relacionada às neoplasias e às doenças neovasculares intraoculares. Sua ação ocorre com sua ligação aos receptores tirosina quinase VEGFR-1 e VEGFR-2, que tem diferenças significativas nas vias de sinalização (FERRARA, GERBER e LECOUTER, 2003).

Durante a tumorigênese, muitos receptores tirosina quinases, incluindo os receptores de fatores de crescimento, ficam desregulados e terapêuticas com pequenas moléculas alvo destas quinases são estudadas em virtude dos efeitos diretos nas células tumorais. A maioria desses inibidores são moléculas de tirosina quinases miméticas ao ATP (Imai e Takaoka, 2006) e, portanto, inibem a atuação dos receptores tirosina quinases por terem a capacidade de se ligar por pontes de hidrogênio ao sitio correspondente a ligação do ATP (LIANG *et al.*, 2013). Muitos inibidores de pequenas moléculas tirosina quinase multialvos para os receptores dos fatores de crescimento FGF, PDGF e VEGF têm sido desenvolvidos para terapêutica de câncer e estão sendo avaliados em estudos pré-clínicos (RENHOWE *et al.*, 2009). O inibidor TKI-258 avaliado neste estudo é uma destas pequenas moléculas de ligação a alvos múltiplos.

A ação antitumoral do TKI-258 ocorre através da inibição direta de FGFRs e PDGFRs, e sua atividade antiangiogênica é por inibição desses receptores e do VEGFRs (LEE *et al.*, 2005),

através da ligação ao sítio do ATP nesses receptores tirosina quinases (GOTINK e VERHEUL, 2010). Há uma complexidade destas vias de transdução de sinal e da utilização desses fatores de crescimento como alvos terapêuticos (FERRARA e ALITALO, 1999). Alguns autores acreditam que essa multiplicidade de alvos pode indicar uma diminuição da eficácia desses inibidores (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012), outros que essa ação multi-alvos levam à uma eficácia ampla, devido ao envolvimento de múltiplas vias de sinalização (GOTINK e VERHEUL, 2010). O uso de um inibidor multi-alvos neste estudo impossibilitou a identificação de qual a via de sinalização foi responsável pela regulação de cada processo biológico avaliado, ou ainda, se o bloqueio de mais de uma das vias levou aos resultados obtidos.

Embora inibidores tirosina quinase de FGFRs estejam em desenvolvimento, todos também inibem os VEGFRs, em virtude da semelhança estrutural dos seus domínios (AHMAD, IWATA e LEUNG, 2012). O VEGF tornou-se um alvo terapêutico de estratégias anti-neoplásicas, em virtude da inibição do crescimento tumoral ao bloquear o estímulo desse fator de crescimento (FERRARA e ALITALO, 1999). Recentemente, o interesse em terapias anti-angiogênicas interferindo em fatores endoteliais como o VEGF e o FGF têm atraído muitas atenções nas novas terapias contra neoplasias, porém novas evidências apontam a participação do receptor PDGF na angiogênese tumoral (OSTMAN, 2004).

Este estudo demonstrou pela primeira vez que, em carcinoma epidermoide oral, o tratamento com TKI-258 por 24 horas inibiu a migração e a invasão celular, utilizando ensaios de migração e invasão celular tridimensionais em concordância com o descrito previamente para linhagens celulares diferentes. Utilizando os mesmos tipos de placas, a migração e a invasão de células de linhagens de câncer de mama foram inibidas pelo tratamento com TKI-258 por 18 horas (ZANG *et al.*, 2015). O TKI-258 apenas ou associado ao FGF-1 inibe, enquanto FGF-1 estimula a migração de células de câncer pancreático em câmara modificada de Boyden por 24 horas (TAEGER *et al.*, 2011). Em ensaio de migração bidirecional, utilizando linhagens de câncer colorretal, o tratamento com TKI-258 por 24 horas inibiu a migração sozinho ou em combinação com Oxaliplatina (GAUR *et al.*, 2014). A proliferação celular, expressão de FGFR-2 e os efeitos do TKI-258 sobre a apoptose e o ciclo celular foram avaliados em linhagem de células de câncer endometrial após tratamento por 72 horas. O ensaio de proliferação com placas de cultura tecidual de 24

poços mostrou inibição deste processo de maneira concentração-dependente. Por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi avaliada a inibição da via de FGFR-2, e através da citometria de fluxo foi observada a indução parada do ciclo celular quando com a inibição da vida de FGFR2 (KONECNY *et al.*, 2013).

Em um estudo com linhagens celulares de câncer de bexiga foi demonstrado através da citometria de fluxo que o tratamento com TKI258 por 24 horas estimulou a apoptose das células tratadas (LAMONT *et al.*, 2011). Linhagens celulares de câncer de fígado foram tratadas com TKI-258 por 48 horas. As análises por citometria de fluxo indicaram que o tratamento estimulou a apoptose (HUYNH *et al.*, 2012).

Por meio da implantação de células de linhagem de câncer colorretal em camundongo, estudos demonstraram a inibição das vias de sinalização do VEGFR, FGFR, PDGFR após tratamento com TKI-258. Os animais com carcinoma colorretal foram tratados com TKI-258 por sete dias e foi verificada, por meio de imunohistoquímica, a diminuição da expressão de VEGF e PDGF, inibição da autofosforilação de VEGFR e PDGFR $\beta$ , e redução dos volumes tumorais dependente da dose de TKI-258, possivelmente devido à inibição do potencial angiogênico, especialmente das vias VEGFR e PDGFR $\beta$ . E, *in vitro*, a inibição de FGFR-1, PDGFR $\beta$  e VEGFR-1/2 e, após tratamento com TKI-258 por três horas foi observada, através de PCR e imunoprecipitação (LEE *et al.*, 2005). Em camundongos com carcinoma renal tratados com TKI-258 na dose de 60 mg/kg, foi observada a redução da atividade tumoral de maneira dose-dependente, com redução de 91% no volume do tumor no grupo tratado com esse inibidor (ANGEVIN *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, a redução da migração celular das células tratadas com TKI-258, também, ocorreu de maneira dose-dependente, sendo que quanto maior a dose menor foi a taxa de migração celular.

Inibidores tirosina quinase constituem uma recente modalidade de terapias com propensão para inibir alvos múltiplos (KARAMAN *et al.*, 2008). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que um protocolo para o tratamento de carcinoma epidermoide oral poderia ser estabelecido, futuros estudos serão necessários para determinar posologia e o efeito do TKI-258 como droga anti-metastática. Foi demonstrado, por meio de pesquisa farmacocinética, que o uso do TKI-258 por via oral apresenta boa biodisponibilidade, moderada concentração plasmática e bom volume de distribuição (SARKER *et al.*, 2008).

O TKI-258 ainda está em desenvolvimento, e seus testes clínicos estão em fases distintas para cada tipo de neoplasia, por exemplo: fase I de câncer pancreático (ZHANG *et al.*, 2014), fase II de câncer de bexiga (QING *et al.*, 2009), endometrial (KONECNY *et al.*, 2013) e mama em estágios avançados (ANDRÉ *et al.*, 2013) e fase III carcinoma renal (MOTZER *et al.*, 2014). Em pacientes com carcinoma renal, em progressão apesar de estar em tratamento convencional, tratados com TKI-258 nas concentrações de 500 mg e 600 mg/dia por 28 dias, cujo protocolo era de cinco dias de uso de medicação e dois dias sem medicação, foi observada a redução dos níveis séricos de bFGF, receptor do VEGF solúvel (sVEGFR), e VEGF-2 no décimo quinto dia (ANGEVIN *et al.*, 2013).

Em pacientes, com metástases de tumores sólidos refratários ou resistentes à terapia convencional, tratados com diversas doses de TKI-258, os níveis séricos de VEGF, VEGFR, FGF, detectados por meio de ELISA, não apresentaram diferenças. Os efeitos colaterais mais relatados com tratamento de TKI-258 nas concentrações 100 a 175 mg/dia por um período de 28 dias, foram fadiga e toxicidade gastrointestinal (SARKER *et al.*, 2008).

Pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico inoperáveis e em progressão receberam por via oral TKI-258 de 500 mg por cinco dias consecutivos seguidos com pausa de dois dias por ciclos de 28 dias, e a progressão tumoral foi avaliada por meio de tomografia computadorizada. A atividade antitumoral do TKI-258 foi fraca num período médio de seis meses de tratamento (KEAM *et al.*, 2015). Em pacientes com melanoma metastático, em estágio avançado, tratados com no mínimo 22 doses de TKI-258 de 400 mg a 500 mg, por via oral, em 30 dias, foi observado aumento dos níveis de FGF, VEGF e a redução dos níveis séricos, detectados por ELISA, de sVEGF2 tratamento após o primeiro ciclo de medicação (KIM *et al.*, 2011).

Embora este estudo tenha sido realizado com células de linhagem de carcinoma epidermoide oral, os resultados obtidos demonstraram que o inibidor tirosina quinase TKI-258 exerce um efeito inibitório sobre a motilidade celular, provavelmente devido à inibição da via de sinalização dos FGFRs e/ou do PDGFRs e/ou VEGFRs, uma vez que foi utilizado um inibidor multi-alvos. No entanto, será imprescindível que sejam avaliados os efeitos do TKI-258 sobre outros processos biológicos, como: proliferação celular e morte celular para ser prescrito para o tratamento de carcinoma epidermoide oral em humanos.

## **8.CONCLUSÃO**

---

O tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 exerceu um efeito inibitório sobre a motilidade celular, afetando o citoesqueleto de actina, a migração e a invasão celular em linhagem de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado, por uma ou mais vias de sinalização: FGFRs e/ou do PDGFRs e/ou VEGFRs.

- O TKI-258 leva às alterações morfológicas, desorganizando os filamentos de actina e inibindo da formação de filopódios, no entanto, parece não afetar o córtex celular na linhagem SCC-4.

- O tratamento com TKI-258 tem um efeito inibitório sobre as células SCC-4 migratórias, de modo concentração-dependente.

- O TKI-258 inibe a invasão de células SCC-4 em membrana recoberta com Matrigel™.

## **9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AHLUWALIA, A. et al. Aberrant, ectopic expression of VEGF and VEGF receptors 1 and 2 in malignant colonic epithelial cells. Implications for these cells growth via an autocrine mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 437, n. 4, p. 515-20, Aug 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831629> >.

AHMAD, I.; IWATA, T.; LEUNG, H. Y. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 4, p. 850-60, Apr 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273505> >.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of THE CELL**. 5. New York: Garland Science, 2008.

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. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 5, p. 677-89, Oct 2010. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20822888> >.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes Dev**, v. 22, n. 10, p. 1276-312, May 2008. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483217> >.

ANDRÉ, F. et al. Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 13, p. 3693-702, Jul 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658459> >.

ANDRÉ, F.; CORTÉS, J. Rationale for targeting fibroblast growth factor receptor signaling in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 150, n. 1, p. 1-8, Feb 2015. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677745> >.

ANETA, G. et al. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. **Oncotarget**, Feb 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26872368> >.

ANGEVIN, E. et al. Phase I study of dovitinib (TKI258), an oral FGFR, VEGFR, and PDGFR inhibitor, in advanced or metastatic renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 5, p. 1257-68, Mar 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339124> >.

APPLEBAUM, K. M. et al. Lack of Association of Alcohol and Tobacco with HPV16-Associated Head and Neck Cancer. **JNCI J Natl Cancer Inst**, v. 99, p. 1801-10, 2007.

ARJONEN, A.; KAUKONEN, R.; IVASKA, J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. **Cell Adh Migr**, v. 5, n. 5, p. 421-30, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1933-6926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21975551> >.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p. 414-7, Jun 2010. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400366> >.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D.. **Genética e Patologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço**. , São Paulo: Santos, 2009, 428 p..

BELL, R. B. et al. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 2, p. 229-36, Feb 2007. ISSN 0278-2391 (Print) 0278-2391 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17236926> >.

BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, Jun 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732477> >.

BETTENDORF, O.; PIFFKÒ, J.; BÀNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol**, v. 40, n. 2, p. 110-9, Feb 2004. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693233> >.

BODNER, L. et al. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger - review and analysis of 186 reported cases. **Oral Oncol**, v. 50, n. 2, p. 84-9, Feb 2014. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296165> >.

BROUMAND, V.; LOZANO, T. E.; GOMEZ, J. A. Evaluation and staging of oral cancer. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 18, n. 4, p. 435-44, Nov 2006. ISSN 1042-3699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088844> >.

CASE, L. B.; WATERMAN, C. M. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 8, p. 955-63, Aug 2015. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121555> >.

CHANG, K. et al. Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. **Front Microbiol**, v. 7, p. 300, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014223> >.

CHANG, L.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 601-13, Aug 2004. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15366704> >.

CHEN, A. Y.; MYERS, J. N. Cancer of the oral cavity. **Dis Mon**, v. 47, n. 7, p. 275-361, Jul 2001. ISSN 0011-5029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477373> >.

CHEN, J. et al. Biomechanics of oral mucosa. **J R Soc Interface**, v. 12, n. 109, p. 20150325, Aug 2015. ISSN 1742-5662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224566> >.

CHEN, Y. K. et al. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. **Oral Oncol**, v. 35, n. 2, p. 173-9, Mar 1999. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435152> >.

CHOI, D. Y. et al. Fibroblast growth factor receptor 3 induces gene expression primarily through Ras-independent signal transduction pathways. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 5116-22, Feb 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084019> >.

DE CARVALHO, M. B. et al. [Clinical and epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma of the oral cavity in women]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 47, n. 3, p. 208-14, 2001 Jul-Sep 2001. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723500> >.

DEMOULIN, J. B.; ESSAGHIR, A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, Mar 2014. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703957> >.

DEY, J. H. et al. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. **Cancer Res**, v. 70, n. 10, p. 4151-62, May 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460524> >.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629-35, Dec 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12478284> >.

FANG, K. H. et al. Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 141, n. 6, p. 743-9, Dec 2009. ISSN 1097-6817. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932848> >.

FARHAN, H.; HSU, V. W. Cdc42 and Cellular Polarity: Emerging Roles at the Golgi. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 4, p. 241-8, Apr 2016. ISSN 1879-3088. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26704441> >.

FEARON, A. E.; GOULD, C. R.; GROSE, R. P. FGFR signalling in women's cancers. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 12, p. 2832-42, Dec 2013. ISSN 1878-5875. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148254> >.

FERLITO, A. et al. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v. 63, n. 4, p. 202-7, 2001 Jul-Aug 2001. ISSN 0301-1569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408812> >.

FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Med**, v. 5, n. 12, p. 1359-64, Dec 1999. ISSN 1078-8956. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581076> >.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOATER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-76, Jun 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778165> >.

FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 24, p. 5507-23, Dec 2014. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665826> >.

FORASTIERE, A. et al. Head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 26, p. 1890-900, Dec 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756581> >.

GAUR, S. et al. Dovitinib synergizes with oxaliplatin in suppressing cell proliferation and inducing apoptosis in colorectal cancer cells regardless of RAS-RAF mutation status. **Mol**

**Cancer**, v. 13, p. 21, 2014. ISSN 1476-4598. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495750> >.

GILLISON, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head Neck**, v. 29, n. 8, p. 779-92, Aug 2007. ISSN 1043-3074. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230556> >.

GLAZER, C. A. et al. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 440-6, Apr-May 2009. ISSN 1368-8375 (Print) 1368-8375 (Linking). Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674958> >.

GOEL, H. L.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871-82, Dec 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263190> >.

GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 166-80, Mar 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403721> >.

GOTINK, K. J.; VERHEUL, H. M. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 1-14, Mar 2010. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012482> >.

GUNNING, P.; O'NEILL, G.; HARDEMAN, E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 1-35, Jan 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195081> >.

HALL, A. Rho family GTPases. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 6, p. 1378-82, Dec 2012. ISSN 1470-8752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23176484> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

HAYA-FERNÁNDEZ, M. C. et al. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis**, v. 10, n. 6, p. 346-8, Nov 2004. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533209> >.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1283-316, Oct 1999. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508235> >.

HOOPER, S. J.; WILSON, M. J.; CREAN, S. J. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. **Head Neck**, v. 31, n. 9, p. 1228-39, Sep 2009. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475550> >.

HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell migration. **Current Biology**. v. 13, p. 756-759, 2003.

HUNG, R. J.; TERMAN, J. R. Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 68, n. 8, p. 415-33, Aug 2011. ISSN 1949-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21800438> >.

HUNTER, T. The genesis of tyrosine phosphorylation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 5, p. a020644, May 2014. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789824> >.

HUYNH, H. et al. Dovitinib demonstrates antitumor and antimetastatic activities in xenograft models of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 56, n. 3, p. 595-601, Mar 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22027573> >.

IMAI, K.; TAKAOKA, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 9, p. 714-27, Sep 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929325> >.

INCA. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2014.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2016 Incidência de câncer no Brasil**. SAÚDE, M. D. Rio de Janeiro 2016.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet**, v. 20, n. 11, p. 563-9, Nov 2004. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475116> >.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 247-69, 2005. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212495> >.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

KALMAR, J. R. Advances in the detection and diagnosis of oral precancerous and cancerous lesions. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 18, n. 4, p. 465-82, Nov 2006. ISSN 1042-3699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088846> >.

KARAMAN, M. W. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 1, p. 127-32, Jan 2008. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183025> >.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 372 p.

KEAM, B. et al. Phase 2 study of dovitinib in patients with metastatic or unresectable adenoid cystic carcinoma. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2612-7, Aug 2015. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25903089> >.

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. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 23, p. 7451-61, Dec 2011. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976540> >.

KIM, Y. et al. Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. **Genes Dev**, v. 26, n. 11, p. 1247-62, Jun 2012. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661233> >.

KONECNY, G. E. et al. Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 5, p. 632-42, May 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443805> >.

KOWANETZ, M.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 17, p. 5018-22, Sep 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951216> >.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutat Res**, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013 Jan-Mar 2013. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940039> >.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.. **Robbins & Cotran Patologia Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1592 p.

LAMONT, F. R. et al. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. **Br J Cancer**, v. 104, n. 1, p. 75-82, Jan 2011. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119661> >.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359-69, Feb 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608589> >.

LEE, S. H. et al. In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 10, p. 3633-41, May 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897558> >.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-34, Jun 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602996> >.

LIANG, G. et al. Small molecule inhibition of fibroblast growth factor receptors in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 5, p. 467-75, Oct 2013. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23830577> >.

LIM, M. S. LIM, M. S. Re: Correlational of oral tongue cancer invasion with matrixmetalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, by Kim S-H, Cho NH, Kim K, et al. **Journal of Surgical Oncology**. v. 93, p. 253-4, 2006.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 4th. Oxford, UK: Blackwell, p. 1326, 2003.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. **Oral**

**Oncol**, v. 37, n. 5, p. 401-18, Jul 2001. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377229> >.

LO, P.; HAWROT, H.; GEORGIU, M. Apicobasal polarity and its role in cancer progression. **Biomol Concepts**, v. 3, n. 6, p. 505-21, Dec 2012. ISSN 1868-5021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436555> >.

MACK, N. A.; GEORGIU, M. The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity. **Small GTPases**, v. 5, n. 2, p. 10, 2014. ISSN 2154-1256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25469537> >.

MAO, L.; HONG, W. K.; PAPADIMITRAKOPOILOU, V. A. Focus on head and neck cancer. **Cancer Cell**, v. 5, p. 311-6, 2004.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 107-37, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863029> >.

MOTZER, R. J. et al. Dovitinib versus sorafenib for third-line targeted treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma: an open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 3, p. 286-96, Mar 2014. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556040> >.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function**. 8.ed. Quebec. Elsevier, 2013. 379 p.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139232> >.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E.. **Patologia Oral e Maxilo Facial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 798 p.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 298-307, Mar 2011. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269808> >.

ONGKEKO, W. M. et al. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. **Am J Clin Pathol**, v. 124, n. 1, p. 71-6, Jul 2005. ISSN 0002-9173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923166> >.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276432> >.

OSTMAN, A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 15, n. 4, p. 275-86, Aug 2004. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207817> >.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 454-60, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804412> >.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 340-50, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674956> >.

PIANKA, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor isoforms: are they present in oral squamous cell carcinoma? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 5, p. 897-904, May 2015. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883000> >.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-65, Feb 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600310> >.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 799 p.

QING, J. et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 5, p. 1216-29, May 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381019> >.

REID, B. C. et al. Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends, and survival. **Oral Oncol**, v. 36, n. 5, p. 414-20, Sep 2000. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964047> >.

RENHOWER, P. A. et al. Design, structure-activity relationships and in vivo characterization of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: a novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. **J Med Chem**, v. 52, n. 2, p. 278-92, Jan 2009. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19113866> >.

RIDLEY, A. J. Rho GTPase signalling in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**, v. 36, p. 103-12, Oct 2015. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26363959> >.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704-9, Dec 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657486> >.

ROBAK, P.; ROBAK, T. A targeted therapy for protein and lipid kinases in chronic lymphocytic leukemia. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 31, p. 5294-318, 2012. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22830347> >.

RUBACK, M. J. et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. **Sao Paulo Med J**, v. 130, n. 5, p. 307-13, 2012. ISSN 1806-9460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174870> >.

SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 711-9, Aug 2003. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844144> >.

SANDHU, D. S.; BAICHO, E.; ROBERTS, L. R. Fibroblast growth factor signaling in liver carcinogenesis. **Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 1166-73, Mar 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24716202> >.

SARKER, D. et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of TKI258, an oral, multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 7, p. 2075-81, Apr 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18381947> >.

SCULLY, C. **Medicina Oral e Maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 392 p.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 301-8, 2009 Apr-May 2009a. ISSN 1368-8375. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249237> >.

\_\_\_\_\_. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 388-99, Sep 2009b. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371401> >.

SILVERMAN, S. Early diagnosis of oral cancer. **Cancer**, v. 62, n. 8 Suppl, p. 1796-9, Oct 1988. ISSN 0008-543X. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3167796> >.

SLEEMAN, J. P. et al. Concepts of metastasis in flux: the stromal progression model. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 3, p. 174-86, Jun 2012. ISSN 1096-3650. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374376> >.

SQUIER, C. A.; KREMER, M. J. Biology of oral mucosa and esophagus. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 29, p. 7-15, 2001. ISSN 1052-6773. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694559> >.

STÎNGĂ, A. C. et al. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52, n. 4, p. 1269-75, 2011. ISSN 1220-0522. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203933> >.

TAEGER, J. et al. Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 11, p. 2157-67, Nov 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21885862> >.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015. ISSN 1542-4863. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651787> >.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094046> >.

VASSILAKOPOULOU, M.; PSYRRI, A.; ARGIRIS, A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 51, n. 5, p. 409-15, May 2015. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25680863> >.

VEGA, F. M.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 2093-101, Jun 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460342> >.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804401> >.

\_\_\_\_\_. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p. 407-10, Jun 2010. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403722> >.

WINDER, S. J.; AYSCOUGH, K. R. Actin-binding proteins. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 4, p. 651-4, Feb 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701920> >.

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, p. 1291-9, 2015. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714853> >.

ZHANG, H. et al. Enhanced FGFR signalling predisposes pancreatic cancer to the effect of a potent FGFR inhibitor in preclinical models. **Br J Cancer**, v. 110, n. 2, p. 320-9, Jan 2014. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24327018> >.

ZHANG, Y. et al. Constitutive activating mutation of the FGFR3b in oral squamous cell carcinomas. **Int J Cancer**, v. 117, n. 1, p. 166-8, Oct 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880580> >.

ZHENG, X. et al. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. **Biotechnol Prog**, v. 22, n. 5, p. 1294-300, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17022666> >.





UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS - ICBN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL  
3318 5463 - 3318 5427 - virginiacrema@icbn.uftm.edu.br

Memorando nº 47/2012/HISTOLOGIA/ICBN/UFTM

Uberaba, 04 de junho de 2012

Ana Palmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP/UFTM

Prezada Coordenadora,

Tendo em vista que não haverá o envolvimento de seres humanos, solicitamos a dispensa de Parecer do CEP/UFTM para Projeto de Pesquisa intitulado "Regulação de processos biológicos em carcinoma epidermoide oral", utilizando linhagens celulares disponíveis comercialmente.

Atenciosamente,

*Virgínia Oliveira Crema*  
Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema  
Responsável pela Disciplina de Histologia dos  
Cursos Biomedicina e Fisioterapia

*Aprovado em  
15/6/2012*

*[Assinatura]*  
Prof.ª Ana Palmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP da UFTM