

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO

**O TRATAMENTO COM TKI-258 AUMENTA A SINALIZAÇÃO
RHOA/ROCKS E LEVA AO AUMENTO DE APOPTOSE EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Uberaba
2020

ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO

**O TRATAMENTO COM TKI-258 AUMENTA A SINALIZAÇÃO
RHOA/ROCKS E LEVA AO AUMENTO DE APOPTOSE EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Tese 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 Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Uberaba
2020

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

C287t Carneiro, Anna Cecília Dias Maciel
O tratamento com TKI-258 aumenta a sinalização RhoA/ROCKs e leva ao aumento de apoptose em carcinoma epidermoide oral *in vitro* / Anna Cecília Dias Maciel Carneiro -- 2020.
94f. il.: fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020
Orientadora: Dra. Virgínia Oliveira Crema

1. Boca – Tumores. 2. Carcinoma de células escamosas.
3. Inibidores de proteínas quinases. 4. Proteínas tirosina quinases.
I. Crema, Virgínia Oliveira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.31-002.4

ANNA CECÍLIA DIAS MACIEL CARNEIRO

O tratamento com TKI-258 aumenta a sinalização RhoA/ROCKs e leva ao aumento de apoptose em carcinoma epidermoide oral *in vitro*

Tese 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 Doutora.

Uberaba 18 de agosto de 2020

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Marcia Antoniazzi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Fernanda Bernadelli de Vito
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

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

Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe Marília (*in memoriam*)
por jamais me permitir desistir dos meus
sonhos.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema por mais uma vez me acompanhar nessa jornada. Sua dedicação e coragem são exemplos que me foram norte em muitos momentos ao longo deste caminho. Serei eternamente grata pela compreensão e cuidado nos momentos mais difíceis dessa trajetória, e pelos ensinamentos fundamentais para meu desenvolvimento enquanto ser humano. Mais uma vez obrigada por essa valiosíssima oportunidade.

Ao Prof. Dr. Helio Moraes-Souza pela convivência sempre agradável e enriquecedora, e por disponibilizar o Laboratório de Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

À Profa. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito, do Laboratório de Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas, pelo convívio sempre fraterno e prazeroso e pela colaboração e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus coorientandos: Arthur Silva Rezende, Bruna Raphaela Oliveira Silva, Isadora Caixeta da Silveira e Lorraine Stephanie Hiss, pela amizade, confiança e convivência sempre agradável. Agradeço principalmente pela oportunidade de crescermos juntos ao longo dessa trajetória.

Aos companheiros do Laboratório de Histologia: Guilherme Henrique Borges, Ana Cristina Lopes e Giovana Gonçalves pelo aprendizado e convívio prazeroso.

Às minhas primeiras companheiras do Laboratório de Histologia, que hoje são parte da minha vida, Simone de Sales Costa Moreira Carboni e Nanci Mendes Pinheiro pelo acolhimento, carinho, cuidado e paciência nessa jornada, mas principalmente pelos laços de amizade sincera e fraterna que construímos.

À colaboradora Luciana de Oliveira Abílio pelo seu cuidado primoroso na manutenção do Laboratório de Histologia e especialmente pela sua presteza, amizade e alegria contagiantes.

Ao técnico Marcelo José Rosa pelo suporte aos equipamentos do Laboratório de Histologia e especialmente pela sua educação e presteza.

Ao técnico do Laboratório de Histologia Raphael Almeida pelo suporte e convivência sempre agradável.

À pós-doutoranda Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka, à mestranda Isabela David Cardoso e à graduanda Bárbara Tolentino de Souza, do Laboratório de Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas, pela amizade, apoio, suporte e encontros sempre fraternos e enriquecedores.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva por disponibilizar o Laboratório da Disciplina de Fisiologia. Aos técnicos: Angélica Cristina Alves da Cruz, Lucas Felipe de Oliveira e Glauco da Rocha Finholdt pelo suporte.

Aos técnicos da disciplina de Farmacologia, Douglas Côbo Micheli e Januário Barbosa dos Santos Júnior pelo suporte, amizade e agradável convivência.

À disciplina de Patologia Especial, em especial a Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti por seu apoio e disponibilidade na colaboração com o Projeto de Extensão. À todos os técnicos da disciplina pelo precioso apoio.

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

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

Aos cirurgiões-dentistas do Ambulatório de Odontologia: Rafael Miranda Euqueres, Amauri José de Lima, Stella Borges da Silva e Rosemary Amaral Furtado de Carvalho pela amizade e encaminhamento de pacientes ao Projeto de Extensão. Às técnicas: Kátia Cristina Falasque e Núbia Fernanda Moraes Teixeira e especialmente a Raquel Magalhães Alves pelo carinho, presteza e amizade.

Aos meus amados amigos por acreditarem no meu potencial, incentivarem a todo tempo e constantemente revigorarem meu ânimo.

À Carolina Rocha Carvalho minha gratidão eterna por todas as vivências, ensinamentos, incentivo e carinho, sempre me ajudando a enxergar além. Obrigada por tanto.

À Camila Rocha Naves, Fernanda dos Reis Assis Benaventana, Camila Pinto Ferreira, Jacqueline Assis Silva, Camila Naves Arantes, Monique Amália Moreira Campos, Lauanda Beatriz Matos Costa, Juliane Caroline Leão e Alessandra de Castilho. Vocês são meus presentes. A minha gratidão será eterna por me permitirem desfrutar dessa vida com vocês ao meu lado. Obrigada por toda dedicação e amor.

Aos meus queridos tios Maria José Maciel Mendes e Arceu Mendes por me acolherem com tanto carinho e cuidado todos os dias. Ao meu querido tio Jairo Sávio Santos pela convivência sempre alegre e incentivadora. Ao meu primo de sangue, e irmão de coração, Anauto Lucas Maciel Mendes por ter me apresentado a vida acadêmica partilhando comigo desde sempre sua trajetória. Ao meu padrinho de coração Rodrigo Rosa Fonseca pelo apoio e carinho. Aos meus afilhados Paula Mendes Breynak Fonseca e Lucas Mendes Breynak Fonseca por serem muitas vezes o bálsamo para o meu coração. À minha madrinha, e irmã de coração, Renata Francis Mendes Fonseca por todo seu amor e compreensão, sendo meu apoio e conforto nas dificuldades do caminho. À minha amada tia Marilda das Graças Maciel pelos exemplos de fé e retidão e por muitas vezes ser o porto seguro que tanto

preciso. À minha Nina, minha companheirinha de vida, que me conhece com o olhar e me traz alegria só por estar presente.

Eu amo muito todos vocês.

À minha amada mãe Marília Eustáquia Maciel que sempre será, independente de tempo e espaço, meu maior amor. Meu maior orgulho é ser filha de alguém com tanto caráter e coragem. Seus exemplos de caráter, retidão e amor ao próximo são vivos na minha alma e espero conseguir honrar o seu legado. Aprender com alguém com a sua força a importância de lutar pelos próprios sonhos, incondicionalmente, enche meu coração de gratidão. Muitíssimo obrigada pela oportunidade de ser guiada por você nessa vida. Te amarei eternamente.

À Deus, aos mentores e companheiros espirituais por serem a luz e a energia que me guiam.

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-02333-2018)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa CAPES)
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM C08/2018)

“Ouse, ouse... ouse tudo! Não tenha necessidade de nada! Não tente adequar sua vida a modelos, nem queira você mesmo ser um modelo para ninguém. acredite: a vida lhe dará poucos presentes. Se você quer uma vida, aprenda a roubá-la! Ouse, ouse tudo! Seja na vida o que você é, aconteça o que acontecer. Não defenda nenhum princípio, mas algo de bem mais maravilhoso: algo que está em nós e que queima como o fogo da vida!”

Lou Andreas-Salomé

RESUMO

RESUMO

Introdução: Recentemente terapias para carcinoma epidermoide oral tendo alvo para vias de sinalização moleculares são as mais utilizadas. TKI-258 é um inibidor simultâneo dos receptores tirosina quinase FGFRs, VEGFRs e PDGFRs. Essas vias de sinalização ativam proteínas, como as GTPases Rho que contribuem para a tumorigênese, atuando em diferentes processos biológicos, como apoptose. **Objetivos:** Este estudo avaliou o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a apoptose, envolvendo as GTPases Rho e suas efetoras ROCKs e PAKs em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. **Material e Métodos:** Marcadores de morte celular e apoptose foram analisados em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 por citometria de fluxo. O envolvimento das GTPases Rho e das efetoras ROCKs na indução da apoptose pelo TKI-258 foi avaliado por meio da quantificação de PARP clivada. Também foram realizadas análises de expressão gênica das GTPases Rho e de algumas de suas efetoras. **Resultados:** O tratamento com TKI-258 levou a um aumento significativo na morte celular (7-AAD) e apoptose (Anexina V e PARP clivado). Quando as GTPases Rho foram estimuladas com LPA e inibidas com Toxina *Clostridium difficile*, o percentual de células apoptóticas aumentou e diminuiu, respectivamente. O tratamento com TKI-258 combinado com LPA e Toxina A teve um efeito similar, aumentando e diminuindo a apoptose, respectivamente. O tratamento com TKI-258 aumentou significativamente a expressão gênica de RhoA, enquanto que em RhoB, RhoC, Rac1 e Cdc42 diminuiu significativamente. Os inibidores de ROCKs (Y-27632 e HA-1077) reduziram a apoptose comparado com o controle. TKI-258 combinado com Y-27632 ou HA-1077 levou ao aumento da apoptose em comparação apenas com os inibidores. O tratamento com TKI-258 levou a um aumento na expressão dos genes ROCK1 e ROCK2 e uma diminuição na expressão dos genes PAK1 e PAK2. **Conclusão:** O TKI-258 estimulou a apoptose em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. Possivelmente, GTPases Rho e suas efetoras ROCKs participam da via de sinalização inibida pelo TKI-258. Terapias com inibidores multialvos, como o TKI-258, podem ser alternativas promissoras para o tratamento clínico do carcinoma epidermoide oral.

Palavras-chave: Apoptose, Carcinoma Epidermoide Oral, RhoA, ROCKs, TKI-258

ABSTRACT

ABSTRACT

Background: Recently therapies for oral squamous cell carcinoma targeting molecular pathways are the most useful. TKI-258 is a simultaneous inhibitor of tyrosine kinase receptors FGFRs, VEGFRs, and PDGFRs. These pathways activate proteins such as Rho GTPases that contribute to tumorigenesis, performing different biological processes, as apoptosis. Objectives: This study evaluated the effect of treatment with TKI-258 on apoptosis, involving Rho GTPases and their effectors ROCKs and PAKs in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Materials and Methods: Markers of cell death and apoptosis were analyzed in control and TKI-258 treated SCC-4 cells by flow cytometry. The involvement of Rho GTPases and the effectors ROCKs in the induction of apoptosis by TKI-258 was evaluated by quantification of cleaved PARP. Also gene expression analysis of Rho GTPases and some of their effectors was performed. Results: The treatment with TKI-258 led to a significant increase in cell death (7-AAD) and apoptosis (Annexin V and cleaved PARP). When Rho GTPases were stimulated with LPA and inhibited with Toxin A *Clostridium difficile*, the percentage of apoptotic cells increased and decreased, respectively. The treatment with TKI-258 combined with LPA and Toxin A had a similar effect, increasing and decreasing apoptosis, respectively. Treatment with TKI-258 significantly increased RhoA gene expression, while RhoB, RhoC, Rac1 and Cdc42 decreased significantly. ROCKs inhibitors (Y-27632 and HA-1077) reduced apoptosis compared with control. TKI-258 combined with Y-27632 or HA-1077 led to an increase in apoptosis compared with inhibitors only. Treatment with TKI-258 led to an increase in ROCK1 and ROCK2 gene expression, and a decrease in PAK1 and PAK2 gene expression. Conclusion: TKI-258 stimulates apoptosis in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Possibly, Rho GTPases and their effectors ROCKs participate in the signaling pathway inhibited by TKI-258. Therapies with multi-target inhibitors, such as TKI-258, may be promising alternatives for the clinical treatment of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Apoptosis; Oral Squamous Cell Carcinoma; RhoA; ROCKs; TKI-258.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1. Mecanismos de ação dos inibidores tirosina quinase..... **35**

Figura 2. Mecanismos reguladores das GTPases Rho. **40**

Artigo 1

Figura 1. *TKI-258 stimulates apoptosis in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma.* **53**

Figura 2. *TKI-258 increases apoptosis and affects the gene expression of Rho GTPases in SCC-4 cell of oral squamous cell carcinoma.* **55**

Figura 3. *TKI-258 increases apoptosis and ROCK gene expression in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma.* **57**

Artigo 2

Figura 1. *Biological processes involved in oral squamous cell carcinoma tumorigenesis .* **70**

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. *TaqMan probe codes used*.....**51**

Artigo 2

Tabela 1. *Oral squamous cell carcinoma promising therapeutic with inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways*.....**71**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

ANOVA - Análise de variância

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

bFGF - Fator de crescimento de fibroblastos básico

BSA - *albumin solution from bovine serum*

C₁₄ - Carbono 14

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

DMEM-F12 - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPBS - *Dulbecco's salina tamponada fosfatada*

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EGFRs - Receptores dos fatores de crescimento epidérmicos

EGFR1 - Receptor do fator de crescimento epidérmico 1

EGFR2-Receptor do fator de crescimento epidérmico 2

EGFR3 - Receptor do fator de crescimento epidérmico 3

EGFR4 - Receptor do fator de crescimento epidérmico 4

FDA - *Food and Drug Administration*

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

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GAPs - *GTPase-activating Proteins*

GDIs - *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*

GDP - Guanosina difosfato

GEFs - *Guanine Nucleotide Exchange Factors*

GLOBOCAN - *Global Cancer Statistics*

GPCRs - Receptores acoplados a proteína G

GTP - Guanosina trifosfato

HPV - Papiloma Vírus Humano

LPA - Ácido Lisofosfatídico

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAKs - *p21-activated kinases*

PAK1 - *p21-activated kinase 1*

PAK2 - *p21-activated kinase 2*

PARP - *Nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase*

PARPc - *Nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase cleaved*

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFRs - Receptores dos fatores de crescimento derivado de plaquetas

PI3K - Fosfatidilinositol 3-kinase

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RAS - *Ras homologous family*

RNA - Ácido ribonucleico

ROCKs - *Rho-associated kinase*

ROCK1 - *Rho-associated kinase 1*

ROCK2 - *Rho-associated kinase 2*

RTKs - Receptores tirosina quinases

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

VEGF2 - Fator de crescimento vascular endotelial 2

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

WHO - *World Health Organization*

7-AAD - *7-amino-actinomycin D*

18S - *18S ribosomal RNA*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	266
1.1. Carcinoma epidermoide oral	27
1.1.1. Lesões pré-malignas	28
1.1.2 Fatores de risco	29
1.1.3. Epidemiologia	30
1.1.4. Tratamento	32
1.1.5 Tratamento com inibidores das vias de sinalização dos receptores de tirosina quinase	33
1.2. TKI-258	35
1.3. Família das GTPases Rho	37
1.4. Apoptose	40
1.5. Justificativa	42
2.OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3.RESULTADOS PRÉVIOS	45
Artigo 1 - <i>RhoA/ROCKs signaling is increased by treatment with TKI-258 and leads to increased apoptosis in of oral squamous cell carcinoma in vitro</i>	46
Artigo 2 - <i>The use of inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways treatment for oral squamous cell carcinoma therapeutic - Review</i>	68
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5.CONCLUSÃO	82
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1.INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma epidermoide oral

Características biológicas exclusivas das células propiciam o desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral, assim como em todas as neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Nessas há um crescimento desorganizado, a célula neoplásica perde a capacidade de aderir a outras células, adquire um potencial migratório e capacidade de invasão, entra no vaso sanguíneo ou linfático e sai em um local distante, onde as células tumorais proliferam, formando metástases (ALBINI; NOONAN, 2010).

O queratinócito é a célula que dá origem ao carcinoma epidermoide oral. Alterações no ácido desoxirribonucleico (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 (SCULLY; BAGAN, 2009). Ocorrem alterações nos processos de: diferenciação e migração celular, da camada basal para a camada mais superficial (PATEL et al., 2011).

A avaliação de um paciente com suspeita de tumores dessa natureza exige exame físico e anamnese detalhados, biópsia e exames radiológicos para determinação da extensão da doença (AGAR; PATEL, 2013). A endoscopia digestiva alta feita com uso de solução de lugol é uma alternativa para o diagnóstico precoce de novo tumor primário ou tumores secundários nos pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide oral (TINCANI et al., 2000). O estadiamento do carcinoma epidermoide oral é realizado por meio do sistema TNM que classifica essas lesões avaliando: tumor primário (T), positividade de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M) (MONTERO; PATEL, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as lesões de carcinoma epidermoide oral são diagnosticadas como: bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas e pouco diferenciadas (BARNES et al., 2009). O grau de diferenciação tem correlação com o comportamento do carcinoma epidermoide oral (NEVILLE; DAY, 2002). Tumores diagnosticados como moderadamente e pouco diferenciados têm potencial para invasão de tecidos subjacentes e ocorrência de metástases (DIK et al., 2018), primeiramente para os linfonodos cervicais devido à extensa drenagem linfática da cavidade oral (CHEN; MYERS, 2001).

A maioria dos casos iniciais de carcinoma epidermoide oral é geralmente indolor e assintomática, as lesões são pequenas, bem demarcadas e com ligeiras rugosidades (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Pacientes com lesões ulceradas ou massas exofíticas podem relatar desconforto (CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Sintomas como: disfagia, hemoptise, rouquidão, sangramento, trismo, salivação excessiva, dificuldade respiratória e mudança de voz por períodos prolongados podem caracterizar tumores invasivos e avançados. Em lesões avançadas, a presença de metástase cervical caracteriza um pior prognóstico para esses pacientes (CHEN; MYERS, 2001).

1.1.1. Lesões pré-malignas

Algumas lesões podem preceder o aparecimento de carcinoma epidermoide oral (CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Clinicamente, essas lesões precursoras podem se manifestar como placas brancas ou vermelhas e, o potencial de malignização é determinado ao realizar o diagnóstico diferencial. Leucoplasia, eritroplasia, fibrose submucosa e líquen plano oral, são exemplos dessas lesões, sendo as três primeiras com grande potencial de malignização (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006). As leucoplasias se apresentam como placas brancas, assintomáticas e que não são removidas facilmente. As eritroplasias são placas vermelhas, podem ser sintomáticas e podem apontar evidências de carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos. As fibroses submucosas se desenvolvem de maneira progressiva na porção do tecido conjuntivo das bochechas e os pacientes podem apresentar trismo. O líquen plano por sua vez, pode apresentar algumas formas como: úlceras profundas na forma erosiva, linhas brancas muito finas na forma reticular, e vesículas repletas com fluido na forma bolhosa (AGAR; PATEL, 2013).

O exame histopatológico permite o diagnóstico de hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (JIA; WANG; SUN, 2019). Hiperplasia pode apresentar acantose e paraqueratose, bem como espessamento focal do epitélio, que pode se estender formando sulcos e sem o envolvimento do tecido conjuntivo subjacente. As células nas porções superficial e espinhosa podem apresentar degeneração, aumento citoplasmático, fragmentação nuclear e núcleos ausentes (SAID et al., 2013).

A displasia epitelial é um indicativo para malignização (JIA; WANG; SUN, 2019), sendo classificadas em: (1) displasia leve com presença de proliferação de células basais atípicas ou imaturas acima da região parabasal, sem ultrapassar o terço inferior do epitélio; (2) displasia moderada quando a proliferação de células atípicas alcança um terço da porção central do epitélio; (3) displasia severa com presença de células atípicas da camada basal ao terço superior do epitélio (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018).

O carcinoma epidermoide oral *in situ* é uma lesão inicial restrita ao epitélio, em que ainda não houve invasão dos tecidos subjacentes (NEVILLE; DAY, 2002). Seu diagnóstico ocorre quando as lesões ainda são tratáveis, sendo a biópsia fundamental (BAYKUL et al., 2010). Na análise histopatológica, aparecem queratinócitos com maturação desordenada, polimorfismo celular e nuclear (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018).

1.1.2 Fatores de risco

A etiologia do carcinoma epidermoide oral é multifatorial (NEVILLE; DAY, 2002). O fator de risco de maior importância no desenvolvimento deste tumor é o tabagismo (AL MOUSTAFA, 2017), um quarto dos casos de câncer de boca está relacionado ao hábito de fumar (PETTI, 2009). Todas as formas de tabaco são carcinogênicas (WARNAKULASURIYA, 2009), por possuírem moléculas como hidrocarbonetos policíclicos e nitrosaminas em sua composição (SPITZ et al., 1988). Ao cessar o consumo de tabaco, o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermoide oral pode reduzir, mas não ser eliminado completamente. Essa redução é de 30% nos primeiros nove anos e de 50% nos nove anos seguintes (MONTERO; PATEL, 2015).

A associação de tabaco e álcool tem efeito sinérgico na etiologia do carcinoma epidermoide oral, e aumenta as chances de desenvolvimento deste tumor (HOOPER; WILSON; CREAN, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009). Existem dificuldades em distinguir seus efeitos separadamente, uma vez que consumidores de bebida alcoólica frequentemente, também, são usuários de tabaco e vice versa (PETERSEN, 2009).

Embora os principais fatores de risco sejam o hábito de fumar e o consumo de álcool, uma série de outros fatores, também, pode levar ao desenvolvimento deste tumor (HOOPER; WILSON; CREAN, 2009), como: a exposição à radiação solar, hábito de mascar Betel, nutrição deficiente, uso de enxaguantes bucais que contêm álcool, idade, e gênero

(D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018). Ainda, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), histórico familiar, condições genéticas (anemia de Fanconi e disqueratose congênita), uso de hidroclorotiazida, medicamento anti-hipertensivo (AL MOUSTAFA, 2017). O carcinoma epidermoide oral é o segundo tipo mais comum de tumor em pacientes transplantados de medula óssea para o tratamento de leucemias, linfomas, e mieloma múltiplo (KETABAT et al., 2019). Higiene oral precária, refluxo gastroesofágico, inalação de gases provenientes de tinta e gasolina, uso de maconha, e infecção por papiloma vírus humano (HPV), também, já foram reportadas (APPLEBAUM et al., 2007; GILLISON, 2007; MAO; HONG; PAPADIMITRAKOPOILOU, 2004; SCULLY; BAGAN, 2009).

Atualmente, as infecções por HPV aumentam a incidência de tumores na orofaringe e na base da língua (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018). Estudos epidemiológicos já mostraram que a infecção oral pelo HPV está associada ao comportamento sexual (WESTRA, 2009). Os tipos de vírus HPV 16 e 18 são considerados de alto risco e parecem prevalecer quando relacionados ao aparecimento de tumores de células epiteliais de cabeça e pescoço (D'SOUZA et al., 2007). No entanto, o mecanismo de desenvolvimento desses tipos de tumores devido ao vírus ainda não foi elucidado (JIANG; DONG, 2017).

1.1.3. Epidemiologia

Atualmente, as doenças não transmissíveis são as que mais adoecem e matam, sendo o câncer a mais importante. No último *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 91 de 172 países do mundo, a principal causa de mortes antes dos 70 anos foi o câncer (BRAY et al., 2018). Crescimento populacional, aumento da expectativa de vida, desenvolvimento socioeconômico e aumento da exposição a fatores de risco explicam um grande número de mortes por câncer em todo o mundo (FERLAY et al., 2019).

Os tumores de células epiteliais de cabeça e pescoço têm altas taxas de mortalidade (TORRE et al., 2015), especialmente nos países em desenvolvimento (MONTERO; PATEL, 2015). O câncer bucal é a décima quinta causa mais frequente de morte (BRAY et al., 2018). Mais de 95% dos cânceres de boca são carcinomas (AL MOUSTAFA, 2017) e 3% dos cânceres diagnosticados no mundo são do tipo de carcinoma epidermoide oral (FANG et al., 2009; REID et al., 2000).

A distribuição da incidência do carcinoma epidermoide oral em todo o mundo é desigual e aumenta a cada ano (ROCHA et al., 2017). A maior prevalência desse tumor ocorre em países como França, Hungria, regiões Sul e Sudeste Asiático (MONTERO; PATEL, 2015) e América do Sul (ROCHA et al., 2017). No Brasil, a estimativa para o triênio 2020/2022 é de 15.190 novos casos de câncer de boca. Entre eles 11.180 novos casos em homens, e 4.010 novos casos em mulheres. É o quinto tipo de neoplasia mais comum nos homens brasileiros, sendo o quinto colocado nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste e o sexto mais comum nas regiões Norte e Sul, desconsiderando os casos de tumores de pele não melanoma (INCA, 2020).

O carcinoma epidermoide oral é mais prevalente em homens após a quinta década de vida (ISLAM et al., 2019). O pico de sua incidência é entre 51 e 60 anos nos homens, enquanto esse pico é entre 61 e 70 anos nas mulheres (RUBACK et al., 2012; WARNAKULASURIYA, 2009; 2010). Portanto, entre a quinta e a oitava década de vida, há um aparecimento maior desses casos em ambos os sexos (BODNER et al., 2014).

Em adultos com menos de 40 anos, a ocorrência de carcinoma epidermoide oral é de 4% (BODNER et al., 2014; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001). Em crianças e adolescentes, o aparecimento dessa neoplasia é considerado raro, porém, apresenta comportamento mais agressivo (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001). Atualmente, um aumento no número de casos de carcinoma epidermoide oral foi observado em mulheres e pacientes jovens, provavelmente devido ao aumento das infecções por HPV (NG et al., 2017).

O diagnóstico precoce é essencial para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes e pode atingir 80% a 90% dos níveis de cura nos estágios iniciais da doença (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018). Em média, 60% dos pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide oral sobrevivem por cinco anos após o diagnóstico, e esse número pode diminuir em 50% se houver metástase linfonodal. Outros fatores, também, podem contribuir para variações na sobrevivência, como idade, sexo, raça, comorbidades, estágio e localização do tumor (CHINN; MYERS, 2015).

O carcinoma epidermoide oral afeta principalmente a língua e a mucosa oral, seguidos pelo palato mole, vestibulo, assoalho da boca e gengivas (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018). A relação entre a localização geográfica no planeta e as regiões da boca afetadas pelo carcinoma

epidermoide oral está ligada à natureza dos fatores de risco, aos quais a população está exposta (GHANI et al., 2019). No leste do mundo, a maioria dos locais afetados é a mucosa bucal e a língua (ISLAM et al., 2019), enquanto no oeste o assoalho da boca é a região de envolvimento mais expressiva (DE CARVALHO et al., 2001; FANG et al., 2009). A língua é a região que demanda maior complexidade nas estratégias de tratamento devido a facilidade de disseminação da doença em virtude da ausência de barreiras anatômicas e a drenagem linfática eficiente (CHINN; MYERS, 2015).

1.1.4. Tratamento

O tratamento do carcinoma epidermoide oral deve ser multidisciplinar (MONTERO; PATEL, 2015). As estratégias atuais incluem excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e podem ser aplicadas isoladamente ou concomitantemente (FORASTIERE et al., 2001). A ressecção cirúrgica é, geralmente, a primeira escolha e contribui para a avaliação da disseminação do tumor pelo exame histopatológico de suas margens (CHI; DAY; NEVILLE, 2015). A cirurgia para lesões em estágio inicial visa remover completamente o tumor primário, cujas características histopatológicas determinadas após a remoção do tumor também são determinantes para o tratamento (CHINN; MYERS, 2015).

Quando o estadiamento tumoral é avançado, com positividade regional dos linfonodos e infiltração tecidual subjacente, os recursos adicionados à terapia cirúrgica são a radioterapia adjuvante, com ou sem quimioterapia (MONTERO; PATEL, 2015). Os efeitos colaterais desses tratamentos combinados são diversos, como: mucosite, disfagia, dermatite, leucopenia e trombocitopenia, bem como redução da qualidade de vida a longo prazo devido a várias complicações, desde mutilação cirúrgica a distúrbios neurosensoriais (LEE; JOHNSON; GRANDIS, 2018).

Mudanças nas estratégias para a detecção precoce da doença, a combinação de tratamentos individualizados e o desenvolvimento de novos recursos são fundamentais (KETABAT et al., 2019). Embora as técnicas convencionais tenham feito um progresso significativo, o prognóstico do carcinoma epidermoide oral, especialmente para tumores invasivos, permanece ruim (NÖR; GUTKIND, 2018). Atualmente, as terapias têm sido direcionadas a vias moleculares, como anticorpos monoclonais e inibidores de receptores de tirosina quinase (OIKAWA et al., 2017).

1.1.5 Tratamento com inibidores das vias de sinalização dos receptores de tirosina quinase

Os receptores de tirosina quinase (RTKs) são proteínas transmembranares localizadas na superfície celular e são importantes reguladores de vários processos-chave, como proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, metabolismo e angiogênese. Cerca de 60 RTKs diferentes foram identificados, distribuídos em aproximadamente 20 subfamílias definidas por receptores ou ligantes (HUNTER, 2014). Esses receptores têm um domínio extracelular e intracelular que inclui um domínio catalítico da tirosina quinase onde ocorre a autofosforilação (PETERS, 2019). A ativação requer uma ligação específica do ligante no domínio extracelular, induzindo a dimerização e a fosforilação do domínio intracelular do receptor tirosina quinase, resultando em uma cascata de fosforilação, que pode ser paralela a várias cascatas efetoras ativadas (IMAI; TAKAOKA, 2006).

Os RTKs e suas vias de sinalização estão sujeitos a mutações oncogênicas, levando à transformação celular (LIANG et al., 2013). No câncer, há uma exacerbação na ativação dos RTKs (PETERS, 2019). Essa ativação excessiva associada a numerosas mutações nos tumores desencadearam a busca por novos tratamentos contra o câncer em virtude dos efeitos diretos nas células tumorais (FERGUSON; GRAY, 2018). Essas terapias são divididas em duas categorias: anticorpos monoclonais e inibidores tirosina quinase (PETERS, 2019).

Os anticorpos monoclonais são moléculas muito grandes e hidrofóbicas que podem atuar em moléculas segregadas ou expressas na superfície celular, pois não podem atravessar a membrana plasmática (KOZAKIEWICZ; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, 2018). Sua ação terapêutica é extremamente específica e ocorre apenas quando há junção de ligantes no domínio específico do receptor (SAADA-BOUZID; MILANO; THARIAT, 2018), e esse domínio, por sua vez, é diferente de acordo com a subclasse de anticorpo monoclonal (SUBARNBHESAJ et al., 2017). Embora a ligação ocorra na superfície das células tumorais, os efeitos são observados na transdução de sinal que ocorre na porção intracelular, induzindo efeitos celulares ou estimulando uma resposta imune contra o tumor (SCHLESSINGER, 2002). Esses anticorpos monoclonais são administrados por via intravenosa para que as concentrações plasmáticas se mantenham elevadas (GOERNER; SEIWERT; SUDHOFF, 2010) e seus efeitos antitumorais são potencializados quando combinados com outras terapias (ARTEAGA; ENGELMAN, 2014).

Os inibidores de RTKs são pequenas moléculas que, ao contrário dos anticorpos monoclonais, têm a capacidade de atravessar a membrana celular e impedir a autofosforilação e a consequente ativação do receptor (SAADA-BOUZID; MILANO; THARIAT, 2018). Essas moléculas são capazes de se ligar à porção C-terminal do receptor de tirosina quinase e ao local correspondente a adenosina-5'-trifosfato intracelular (ATP), ligando-se por pontes de hidrogênio (LURJE; LENZ, 2009) e por serem miméticas ao ATP (SAADA-BOUZID; MILANO; THARIAT, 2018). Estes inibidores também podem impedir que o ATP se associe a um sítio alostérico do receptor, impossibilitando a transferência de fosfato para o resíduo de tirosina, bloqueando a sinalização (MARTINS et al., 2013). Em geral, eles são administrados por via oral e seu perfil de toxicidade está relacionado ao receptor-alvo e sua função (MIRGHANI et al., 2015).

Anticorpos monoclonais e inibidores de RTKs mostraram resultados promissores na inibição de processos exacerbados de células tumorais que são críticos para sua sobrevivência (MODJTAHEDI et al., 2014). Ambos têm perfis de toxicidade específicos e atuam em diferentes papéis na sinalização celular (MIRGHANI et al., 2015). Assim, eles constituem uma terapia de precisão porque é uma modalidade de quimioterapia direcionada, uma vez que o objetivo é gerar efeito nas células tumorais e preservar as células normais (IMAI; TAKAOKA, 2006). A maioria desses inibidores do tratamento contra o câncer é de múltiplos alvos, porque age simultaneamente em mais de um receptor, aumentando sua eficácia (MODJTAHEDI et al., 2014).

Atualmente, terapias alvo moleculares já são empregadas para o tratamento de carcinoma epidermoide oral visando a inativação específica dessas proteínas, descritas como fundamentais para a oncogênese e crescimento de tumores (SEIWERT et al., 2014). Alvos como os receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs) (GOETZ; MOHAMMADI, 2013), receptores de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFRs) (AHMAD; IWATA; LEUNG, 2012), e receptores de fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs) (DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014) foram bem descritos e alguns inibidores já são usados em estudos de fase clínica, mas outros estão em diferentes fases de pesquisa (CHEN et al., 2015).

1.2. TKI-258

Os inibidores que têm propensão para bloquear alvos múltiplos são uma recente modalidade de terapia para tratamento de neoplasias (KARAMAN et al., 2008). Os inibidores tirosina quinases são pequenas moléculas, que em contraste com os anticorpos monoclonais, têm a capacidade de atravessar a membrana celular (IMAI; 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 (Figura 1) (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 sal lactato de composto benzimidazol-quinolina com atividade antitumoral por ação antiproliferativa e antiangiogênica (PORTA et al., 2015). Esta pequena molécula é um inibidor multialvos de RTKs (HUYNH et al., 2012), que bloqueia a autofosforilação dos receptores FGFRs, VEGFRs e PDGFRs (KIM et al., 2011). O bloqueio destes múltiplos RTKs ativam vias de sinalização celulares que regulam processos como proliferação e sobrevivência celular (HASINOFF et al., 2012). O grande potencial de inibição do crescimento tumoral atribuído ao TKI-258 tem sido demonstrado em uma diversidade de modelos de estudo, e em vários tipos de tumores (PORTA et al., 2015).

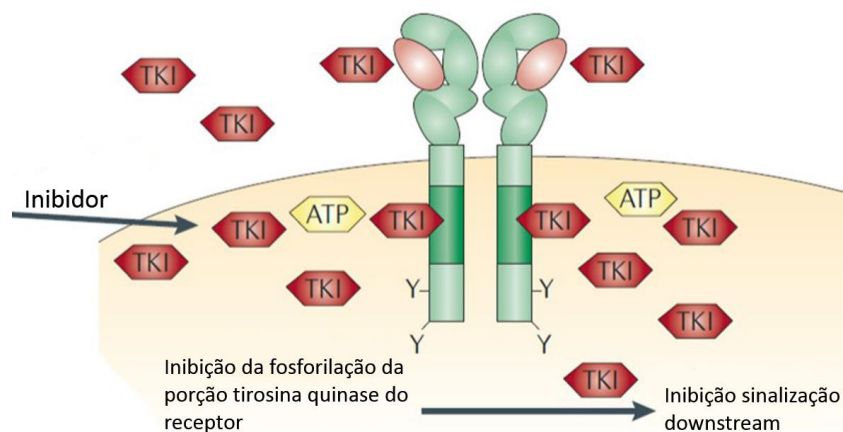


Figura 1. Mecanismo de ação dos inibidores tirosina quinase. Os inibidores tirosina quinases são pequenas moléculas que têm a capacidade de atravessar a membrana celular. A ação desses inibidores ocorre através de sua ligação com a porção correspondente a ligação da molécula de ATP no domínio quinase dos receptores, forma pontes de hidrogênio e impede a ligação do ATP, bloqueando várias vias de transdução de sinal. Adaptado de (IMAI; TAKAOKA, 2006)

A ação antitumoral do TKI-258 ocorre através da inibição direta dos FGFRs e PDGFRs, e sua atividade antiangiogênica por inibição desses receptores e dos VEGFRs. 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 do 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 receptores de fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGFR-1) e o bloqueio do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), impedindo a migração dessas células com o uso de TKI-258 (SANDHU; BAICHO; ROBERTS, 2014).

Em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral o tratamento com TKI-258 exerceu um efeito inibitório sobre o citoesqueleto de actina, a migração e a invasão celular (CARNEIRO et al., 2017). Nesta mesma linhagem celular foi demonstrada a redução da proliferação celular após o tratamento com TKI-258 (SILVEIRA et al., 2020). Ratas nude atímicas receberam injeções na porção proximal da língua contendo linhagens celulares OSC-19 e SCC-1 de tumores de cabeça e pescoço, e foram posteriormente tratadas com TKI-258 20 mg/kg/d, e tiveram como resultado diminuição tumoral, estabilização da doença, redução da metástase em linfonodos regionais e consequente melhora na sobrevivência (SWEENEY et al., 2012).

Embora o TKI-258 ainda não esteja disponível comercialmente, nos últimos anos, diversos estudos pré-clínicos e clínicos para avaliar a sua atividade em diferentes tumores já foram realizados (PORTA et al., 2015). Em ensaios pré-clínicos o TKI-258 se mostrou eficaz em carcinoma renal (ANGEVIN et al., 2013), carcinoma hepatocelular (CHEN et al., 2012), tumores endometriais (KONECNY et al., 2013) e de mama (ANDRÉ et al., 2013). Estudos clínicos já foram realizados para diferentes tipos de neoplasia, por exemplo: tumores de mama em estágios avançados (ANDRÉ et al., 2013), carcinoma adenoide cístico (DILLON et al., 2017), carcinoma urotelial (HAHN et al., 2017), tumores de próstata (CHOI et al., 2018), tumores de pâncreas (MA et al., 2019) e glioblastoma (SHARMA et al., 2019).

A administração do TKI-258 em estudos com animais e humanos é feita por via oral, e sua concentração plasmática máxima é atingida num período que varia de quatro a oito horas

após sua administração (WANG et al., 2013). Seu metabolismo e excreção foram demonstrados em pacientes com tumores avançados por meio da radiomarcagem com carbono 14 (C_{14}), e foi observada boa absorção e distribuição tecidual (DUBBELMAN et al., 2012).

Em pacientes com carcinoma renal em progressão, apesar de estarem 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 fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), receptor do fator de crescimento de vascular endotelial solúvel (sVEGFR), e receptor do fator de crescimento de vascular endotelial 2 (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: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), VEGFR, fator de crescimento de fibroblastos (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).

1.3. Família das GTPases Rho

As GTPases Rho são pequenas proteínas que executam processos biológicos complexos e constituem parte da superfamília *Ras homologous family* (Ras). A subfamília Rho influencia em múltiplos processos celulares como a organização do citoesqueleto de actina, divisão celular, motilidade, adesão celular, tráfego vesicular, fagocitose, regulação de transcrição e apoptose (AZNAR; LACAL, 2001; BARANWAL; ALAHARI, 2011; HALL, 2012; VEGA; RIDLEY, 2008).

Em mamíferos, a subfamília Rho é formada por aproximadamente 23 proteínas que foram divididas em seis grupos: Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd, RhoBTB, Miro, RhoD, Rif/RhoF e TTF/RhoH. Os três primeiros foram os mais estudados até o momento, sendo, portanto, os de melhor caracterização. Rho, Rac e Cdc42 regulam vias de transdução de sinais separadamente, que se ligam a receptores na membrana plasmática para montagem de

distintas estruturas dos filamentos de actina (BARANWAL; ALAHARI, 2011; BURRIDGE; WENNERBERG, 2004; ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; HALL, 2012; VEGA; RIDLEY, 2008).

As GTPases Rho regulam a arquitetura do citoesqueleto de actina, e por estarem superexpressas no câncer desempenham papel importante na progressão da doença (COLEMAN; OLSON, 2002). A sinalização de RhoA leva a formação de fibras de estresse e gera força contrátil por meio de fibras de actomiosina (HODGE; RIDLEY, 2016). A GTPase RhoB parece ser suprimida pelo gene *mIR-21* levando ao aumento de migração e invasão celular e a diminuição da apoptose (RIDLEY, 2013). A superexpressão de RhoC está relacionada com a progressão da doença, e em metástases sua sinalização promove o aumento da vascularização tumoral (SAHAI; MARSHALL, 2002). Rac1 e Cdc42, atuam na formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente, propiciando um movimento celular avançado (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). A formação de bolhas na membrana das células apoptóticas é um processo dinâmico e dependente da presença de filamentos de actina, e ocorre por meio de uma contração celular mediada pelas proteases caspases (COLEMAN; OLSON, 2002).

As GTPases Rho agem como interruptores moleculares, ciclando entre o estado ativo, quando ligadas a guanosina trifosfato (GTP), e inativo vinculado a guanosina difosfato (GDP). Algumas proteínas reguladoras controlam essa ciclagem da subfamília Rho nos dois estados como, *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs), *GTPase-activating Proteins* (GAPs) e *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* (GDIs) (BISHOP; HALL, 2000; VEGA; RIDLEY, 2008). A ativação das GTPases Rho ocorre em resposta a uma variedade de estímulos (como a progressão do ciclo celular e os fatores de crescimento) através dos GEFs que promovem a substituição do GDP ligado a porção inativa da proteína Rho por um GTP. Assim, na forma ativa, as proteínas Rho desempenham suas funções ao se ligarem a diferentes efetores (Figura 2) (LIN; CERIONE; MANOR, 1999; RIDLEY, 2001).

Diversos efetores se ligam as GTPases Rho e possibilitam que uma infinidade de funções biológicas possam ser desempenhadas por estas proteínas (JAFFE; HALL, 2005). Duas das principais vias efetoras de Rho são: *Rho-associated kinase 1 e 2* (ROCK1 e ROCK2) e as *p21-activated kinases 1 e 2* (PAK1 e PAK2). ROCKs estão relacionadas com Rho propriamente ditas (RhoA, RhoB e RhoC) e parece ter efeitos biológicos na adesão célula-célula,

organização do citoesqueleto de actina, proliferação e apoptose. PAKs são proteínas efetoras de Rac1 e Cdc42, sendo mediadoras nos processos motilidade e sobrevivência celular e atuando, também, no citoesqueleto de actina (AZNAR et al., 2004; CARDAMA; GONZALEZ *et al.*, 2017; HALL, 2005). *Citron kinase*, *Citron*, *Rhophilin* e *mDia* são outras efetoras da subfamília Rho, e todas apresentam relação com a reorganização do citoesqueleto de actina (AZNAR et al., 2004; BURRIDGE; WENNERBERG, 2004; HALL, 2012; SCHMITZ et al., 2000). As proteínas efetoras de Rho são classificadas de acordo com suas funções biológicas, e algumas apresentam atividades estreitamente envolvidas em aspectos da tumorigênese, e podem, portanto, ser alvos antineoplásicos (AZNAR et al., 2004).

A ativação das GTPases por meio dos GEFs é geralmente mediada pela sinalização dos RTKs e dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que no câncer, também, são superexpressos (ROSSMAN; DER; SONDEK, 2005). As proteínas GTPases Rho estão envolvidas em diversos estágios da tumorigênese por estarem superativadas, e o envolvimento de muitos fatores de crescimento oriundos do microambiente tumoral, também, interferem na ativação das proteínas Rho, como o ácido lisofosfatídico (LPA) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (SAHAI; MARSHALL, 2003). As vias de sinalização das GTPases Rho são alteradas em diferentes tumores como: mama, pele, pâncreas, pulmão, fígado, cólon, cabeça e pescoço entre outros (GÓMEZ DEL PULGAR *et al.*, 2005).

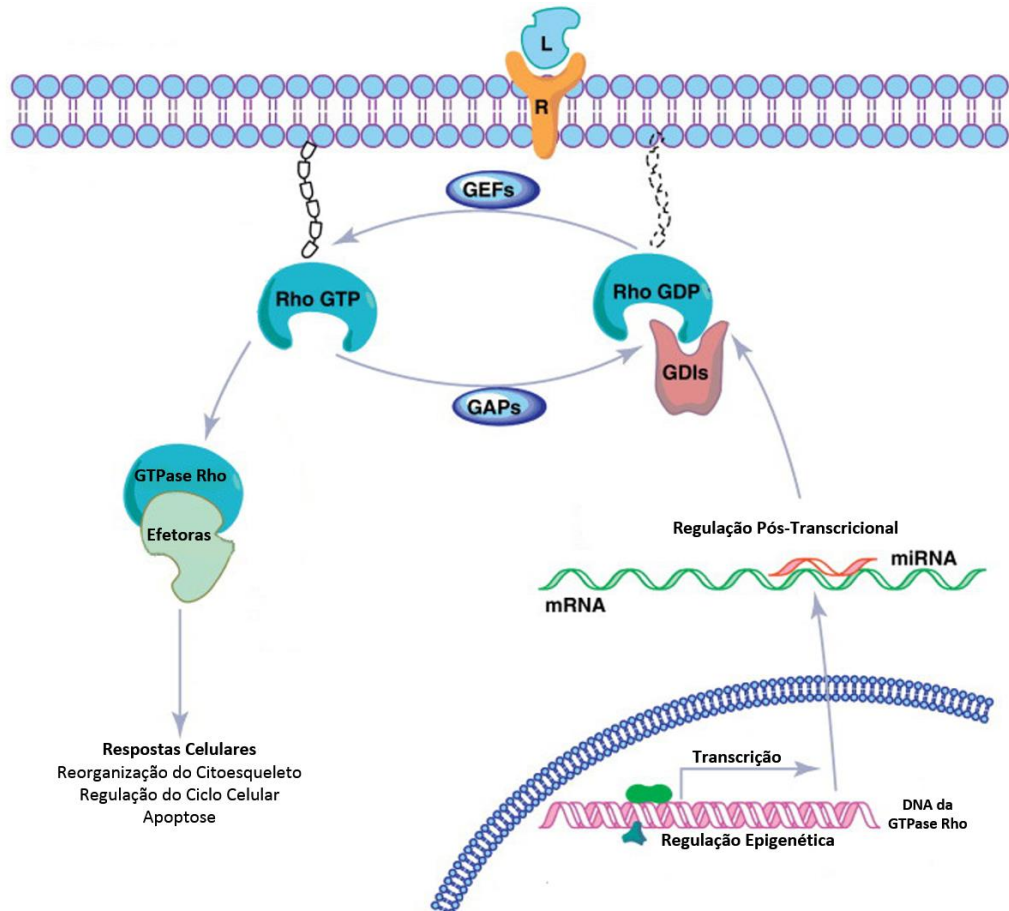


Figura 2. Mecanismos reguladores das GTPases Rho. A ligação entre fatores de crescimento e seus receptores tirosina quinase ativam as proteínas GTPases Rho. GEFs, GAPs e GDIs são reguladores clássicos que controlam o ciclo de ligação GTP-GTPase. Sua ligação às efectoras específicas regulam diferentes processos biológicos, como a reorganização do citoesqueleto, regulação do ciclo celular e apoptose. Modificações epigenéticas dos DNAs cromossômicos e mRNAs das GTPases Rho também podem regular sua expressão em níveis de pré e pós-transcrição. As GTPases Rho estão superexpressas em tumores humanos e, portanto, contribuem para a tumorigênese. Adaptado de (LIU; BI; ZHOU; ZHENG, 2012)

1.4. Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada por alterações bioquímicas e morfológicas específicas, também é conhecida por morte celular programada (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). Este processo acontece após danos irreversíveis no DNA e em virtude de sua complexidade envolve: genes específicos, diversas vias de sinalização, e dependem do equilíbrio entre a ativação de proteínas pró e anti-apoptóticas (PISTRITTO et al., 2016). Essa ativação acontece por meio da sinalização de duas grandes vias: a via extrínseca ligada a receptores de morte celular e a via intrínseca ou mitocondrial (FULDA, 2011), ambas vias culminam na ativação das caspases (PISTRITTO et al., 2016).

As caspases são uma família de proteases que atuam na execução de todo o processo de apoptose (LI; YUAN, 2008), algumas dão início à via apoptótica (caspases -1, -8, -9 e -10), e outras executam o processo (caspases -3, -6 e -7) (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). O processo de apoptose se dá por meio da ativação das caspases iniciadoras que clivam as caspases executoras, que por sua vez executam a clivagem definitiva dos componentes celulares (STENNICKE; SALVESEN, 2000). As alterações morfológicas características de células apoptóticas, como assimetria da membrana, *blebbing* celular e condensação da cromatina, são resultado da atividade das caspases (PISTRITTO et al., 2016).

A via apoptótica extrínseca é ativada pela interação de receptores de morte, da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), com seus ligantes, promovendo alterações conformacionais nestes receptores (GUICCIARDI; GORES, 2009) e levando à formação do complexo de sinalização indutor de morte, que aumenta a concentração de pró-caspases, levando a ativação dessas proteases iniciadoras (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003). A via intrínseca também ativa a via das caspases executoras, resultando em morte celular (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999). A sua ativação acontece por estímulos que provocam danos irreparáveis no DNA, que convergem ao nível mitocondrial, como: hipóxia, estresse oxidativo, agentes quimioterápicos e irradiação (GREEN; KROEMER, 2004).

O câncer tem como uma de suas principais características a capacidade de evadir de sinais de apoptose, sendo autossuficiente em sinais de crescimento e proliferação celular (FOUAD; AANEI, 2017). A evasão da apoptose acontece por meio de mecanismos de inativação de moléculas pró-apoptóticas. As principais alterações bioquímicas envolvidas na apoptose em células tumorais são devido ao desequilíbrio entre os sinais pró e antiapoptóticos, alterações na sinalização das caspases e alterações na sinalização dos receptores de morte celular (WONG, 2011).

1.5. Justificativa

O carcinoma epidermoide oral apresenta índices elevados de prevalência e mortalidade. Seu tratamento ainda depende de diferentes frentes terapêuticas e ainda assim nem sempre os resultados são os esperados devido à agressividade extrema deste tipo de tumor. O estudo de inibidores de vias de sinalização, como o TKI-258, que pode ser considerado uma terapia de precisão, é imprescindível para que sejam desenvolvidos novos fármacos, que atuem de maneira direcionada de modo a produzir efeito em células tumorais, porém preservando células normais.

Previamente, relatamos diferentes efeitos do tratamento com TKI-258 sobre células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado. Em dois estudos demonstramos que o tratamento com TKI-258 reduziu a migração e a invasão celular, alterou o citoesqueleto de actina de maneira concentração dependente (CARNEIRO; SILVEIRA; REZENDE; SILVA *et al.*, 2017), e exerceu um papel antiproliferativo sobre células de carcinoma epidermoide oral (SILVEIRA; D M CARNEIRO; HISS; CREMA, 2020).

A compreensão dos mecanismos de diversos processos celulares e das vias moleculares em células de carcinoma epidermoide oral envolvidas no tratamento com o TKI-158 são imprescindíveis. O estudo da apoptose e o envolvimento da expressão gênica das GTPases Rho e de suas efetoras, em modelo *in vitro* tratado com inibidor de receptores tirosina quinases TKI-258 é de grande importância. A caracterização das proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina em células de carcinoma epidermoide oral tratadas com inibidor multialvos é fundamental, tendo em vista que uma das etapas do processo de apoptose é caracterizada pelas alterações nesta estrutura celular.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a apoptose e o envolvimento das GTPases Rho e suas efetoras em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a morte celular em células SCC-4, por meio de citometria de fluxo utilizando o marcador 7-AAD.

- Avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a apoptose em células SCC-4, por meio de citometria de fluxo utilizando o marcador Anexina V e imunomarcagem de PARP clivada.

- Avaliar o envolvimento das GTPases Rho nas vias de sinalização inibidas por TKI-258 em células SCC-4, por meio de ensaios funcionais utilizando Toxina A e LPA.

- Comparar a expressão gênica das GTPases Rho: RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 e Cdc42 em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258, por meio de PCRq.

- Avaliar o envolvimento das efetoras ROCKs nas vias de sinalização inibidas por TKI-258 em células SCC-4, por meio de ensaios funcionais utilizando Y-27632 e HA-1077.

- Comparar a expressão gênica das proteínas ROCK1 e ROCK2, efetoras de RhoA, RhoB e RhoC, em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258, por meio de PCRq.

- Comparar a expressão gênica das proteínas PAK1 e PAK2, efetoras de Rac1 e Cdc42, em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258, por meio de PCRq.

3.RESULTADOS PRÉVIOS

Artigo 1 - RhoA/ROCKs signaling is increased by treatment with TKI-258 and leads to increased apoptosis in of oral squamous cell carcinoma in vitro

Anna Cecília Dias Maciel CARNEIRO¹, Fernanda Bernadelli DE VITO², Helio MORAES-SOUZA², Virgínia Oliveira CREMA^{1*}

¹Structural Biology Department, Institute of Natural and Biological Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

²Medical Clinical Department, Institute of Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

Corresponding author:

Virgínia Oliveira Crema, Structural Biology Department, Institute of Biological Sciences and Natural, Federal University of Triângulo Mineiro,

Praça Manoel Terra 330, Uberaba, MG, Brazil, CEP 38025-050,

Phone: 55-34-3700-6463, e-mail: virginia.crema@uftm.edu.br

Abstract

Objectives: This study evaluated the effect of treatment with TKI-258 on apoptosis, involving Rho GTPases and their effectors in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. **Materials and Methods:** Markers of cell death and apoptosis were analyzed in control and TKI-258 treated SCC-4 cells by flow cytometry. The involvement of Rho GTPases and effectors in the induction of apoptosis by TKI-258 was evaluated by quantification of cleaved PARP. Also gene expression analysis of those proteins was performed. **Results:** The treatment with TKI-258 led to a significant increase in cell death (7-AAD) and apoptosis (Annexin V and cleaved PARP). When Rho GTPases were stimulated with LPA and inhibited with Toxin A *Clostridium difficile*, the percentage of apoptotic cells increased and decreased, respectively. The treatment with TKI-258 combined with LPA and Toxin A had a similar effect. Treatment with TKI-258 significantly increased RhoA gene expression, while RhoB, RhoC, Rac1 and Cdc42 decreased significantly. ROCKs inhibitors (Y27632 and HA-1077) reduced apoptosis compared with control. TKI-258 combined with Y27632 or HA-1077 led to an increase in apoptosis compared with inhibitors only. Treatment with TKI-258 led to an increase in ROCK1 and ROCK2 gene expression, and a decrease in PAK1 and PAK2 gene expression. **Conclusions:** TKI-258 stimulates apoptosis in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Possibly, RhoA GTPases and their effectors ROCKs participate in the signaling pathway inhibited by TKI-258. **Clinical Relevance:** Therapies with multi-target inhibitors, such as TKI-258, may be promising alternatives for the clinical treatment of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Apoptosis; Oral squamous cell carcinoma; RhoA; ROCKs; TKI-258.

Introduction

Oral cancer is the fifteenth most common cause of death (1), and 3% of cancers diagnosed worldwide are oral squamous cell carcinoma (2). This tumor is extremely invasive and has a multifactorial aetiology (3). The tongue is the site mostly affected (4) and requires greater complexity in treatment strategies (5). Therapies targeting molecular pathways are the most recent ones used to treat invasive tumors such as oral squamous cell carcinoma (6).

TKI-258 is a simultaneous inhibitor of tyrosine kinase receptors (RTKs): fibroblast growth factor receptors (FGFRs), vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) and platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs) (7). This small molecule crosses the cell membrane and, because it is analogous to ATP, it binds to the catalytic kinase, the binding site of this molecule, forms hydrogen bridges and prevents ATP binding, blocking the various signal transduction pathways (8). TKI-258 seems to be a promising therapy for oral squamous cell carcinoma, since in vitro studies have already shown changes in actin filament morphology and filaments, reduction in cell migration and invasion(9), and decreased cell proliferation (10).

The binding between growth factors and their tyrosine kinase receptors activate proteins, over expressed in tumors (11), contribute to tumorigenesis through proteins such as Rho GTPases (12). These proteins are part of the Ras super family, act as molecular switches in response to various stimuli, and perform different biological processes (13), as apoptosis (14). Several proteins have already been identified as effectors of Rho, and some have activities closely involved in aspects of tumorigenesis (15), been possible therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma, such as ROCKs (16).

One of cancer main characteristics is the ability to dodge signs of apoptosis (17). Apoptosis is a type of cell death characterized by specific biochemical and morphological changes and is also known as programmed cell death (18). This process happens after irreversible damage to DNA, and due to its complexity, it involves specific genes, several signaling pathways and depends on the balance between the activation of pro and anti-apoptotic proteins (19). This study evaluated the effect of treatment with TKI-258 on apoptosis, the involvement of Rho GTPases and their effectors ROCKs through functional assays and gene expression in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma.

Material and Methods

1. Cell culture

SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma moderately differentiated of human tongue from the ATCC[®] (American Type Culture Collection), obtained from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro.

The SCC-4 cells were cultured in medium containing DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µg/mL streptomycin/100 U/mL penicillin, also 400 ng/mL of hydrocortisone, fetal bovine serum 10% in a humid incubator with 5% CO₂/95% air 37°C.

2. Cell death and apoptosis assay by flow cytometry

The TKI-258 (Selleck Chemicals, Houston, Texas, USA) concentration 5 µM was used below previously described 5.26 µM cytotoxicity index for SCC-4 cells (10).

The experiments were realized in triplicates. Control and treated cells with 5 µM TKI-258 were maintained for 24, 48 and 72 hours. About 1x10⁶ cells were resuspended in Annexin Binding Buffer (Invitrogen, Eugene, OR, USA) and were incubated with the markers: cell death 7-amino-actinomycin D – 7-AAD (Carlsbad, CA, USA) and apoptosis Annexin V (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) for 15 min. 50.000 events were analysed in a FacsCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) defined the gates used and, the data analysis was performed with FlowJo™ (Ashland, Oregon, EUA).

3. Immunofluorescence assay for cleaved PARP

The experiments were realized in triplicates. About 1x10⁴ SCC-4 cells per well were seeded and grown for 24 hours.

3.1. Evaluation of the involvement of Rho GTPases in the induction of apoptosis by TKI-258

The control cells had the medium changed and the cells were treated for 72 h with: 5 μ M TKI-258 and/or 2 μ g/mL *Clostridium difficile* Toxin A (List Biological Labs, Campbell, CA, USA), 5 μ M TKI-258 and/or 100 μ M Lysophosphatidic acids - LPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2. Evaluation of the involvement of ROCKs in the induction of apoptosis by TKI-258

The medium was changed in wells containing control cells and in the wells of treated cells were applied: 5 μ M TKI-258 and/or 30 μ M Y-27632 (Calbiochem, San Diego, California, USA), 5 μ M TKI-258 and/or 50 μ M HA-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) for 72 h.

3.3. Immunofluorescence reaction

The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 hour. Incubation was performed with: 0.2% Triton X-100 for 5 minutes, 3% DPBS/BSA for 20 minutes and cleaved mouse anti-PARP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 1:50 overnight, secondary goat anti-mouse Alexa 488 antibody (Molecular Probes, Oregon, USA) 1:1000 for 2 hours, and 4'6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) 1:500 for 15 minutes.

3.4. Morphometry

The positive nuclei for DAPI and for PARP cleaved from each sample were counted in 10 random fields under fluorescence microscope (Zeiss®, Goettingen, Germany). The amount of DAPI stain cells was considered as 100% and the percentage of apoptotic cells was calculated according to the amount of PARPc stain cells.

4. Gene expression assay by qPCR

4.1. Treatment of SCC-4 cells with TKI-258

About 1×10^5 control cells and treated with 5 μ M TKI-258 were cultured for 24, 48 and 72 hours.

4.2. Total RNA Isolation and cDNA Synthesis

The cells were homogenized with Trizol[®] (Ambion RNA by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and total RNA was extracted according manufacturer's recommendation. The RNA samples were added to the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Burlington, ONT, CAN). Reverse transcription was performed on the thermal cycler Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems[®], Foster City, EUA).

4.3. Quantitative PCR reaction (qPCR)

The expression of the genes of interest was quantified using the probes TaqMan[®] (Applied Biosystems[®], Foster City, USA) (Table 1). GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) cDNA from each sample, according to manufacturer's recommendations. The qPCR reaction was performed in 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems[®], Foster City, USA). GAPDH and 18S were used to normalize the results. Method $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used to calculate the relative levels of gene expression, as described by Schmittgen and Livak (20).

Table 1. TaqMan probe codes used.

Gene	Probe code
RhoA	Hs00357608_m1
RhoB	Hs03676562_s1
RhoC	Hs00747110_s1
Rac1	Hs01902432_s1
Cdc42	Hs00918044_g1
ROCK 1	Hs01127699_m1
ROCK 2	Hs00178154_m1
PAK 1	Hs00945621_m1
PAK 2	Hs02559219_s1
GAPDH	Hs03929097_g1
18S	Hs99999901_s1

5. Statistical analysis

The results obtained in the tests were analysed with the IBM program SPSS 20.0® (Chicago, IL, USA) and the graphics were generated using the GraphPad Prism program (San Diego, CA, USA). The Kolmogorov-Smirnov test, Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test were performed. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

TKI-258 stimulates apoptosis in oral squamous cell carcinoma SCC-4 cells

The 7-AAD marker, specific for cell death, varied in the studied groups [$F(3,11) = 472.140$, $p < 0.0001$]. Although, no differences were observed at 24 ($6.5 \pm 0.3\%$) and 48 hours ($9.5 \pm 1.1\%$), there was a significant increase in cell death after treatment with TKI-258 for 72 hours ($27.03 \pm 0.8\%$, $p < 0.0001$), compared with control ($7.8 \pm 0.5\%$), (Fig. 1A). The Annexin V marker, specific for apoptosis, was different in control and treated cells with TKI-258 [$F(3,11) = 187.540$, $p < 0.0001$]. When compared with control cells ($7.5 \pm 0.7\%$), apoptosis decreased significantly in 24 hours ($4.7 \pm 0.15\%$, $p < 0.05$), was similar in 48h ($7.1 \pm 0.1\%$) and increased significantly in 72 hours ($18.6 \pm 1.3\%$, $p < 0.0001$), (Fig.1B).

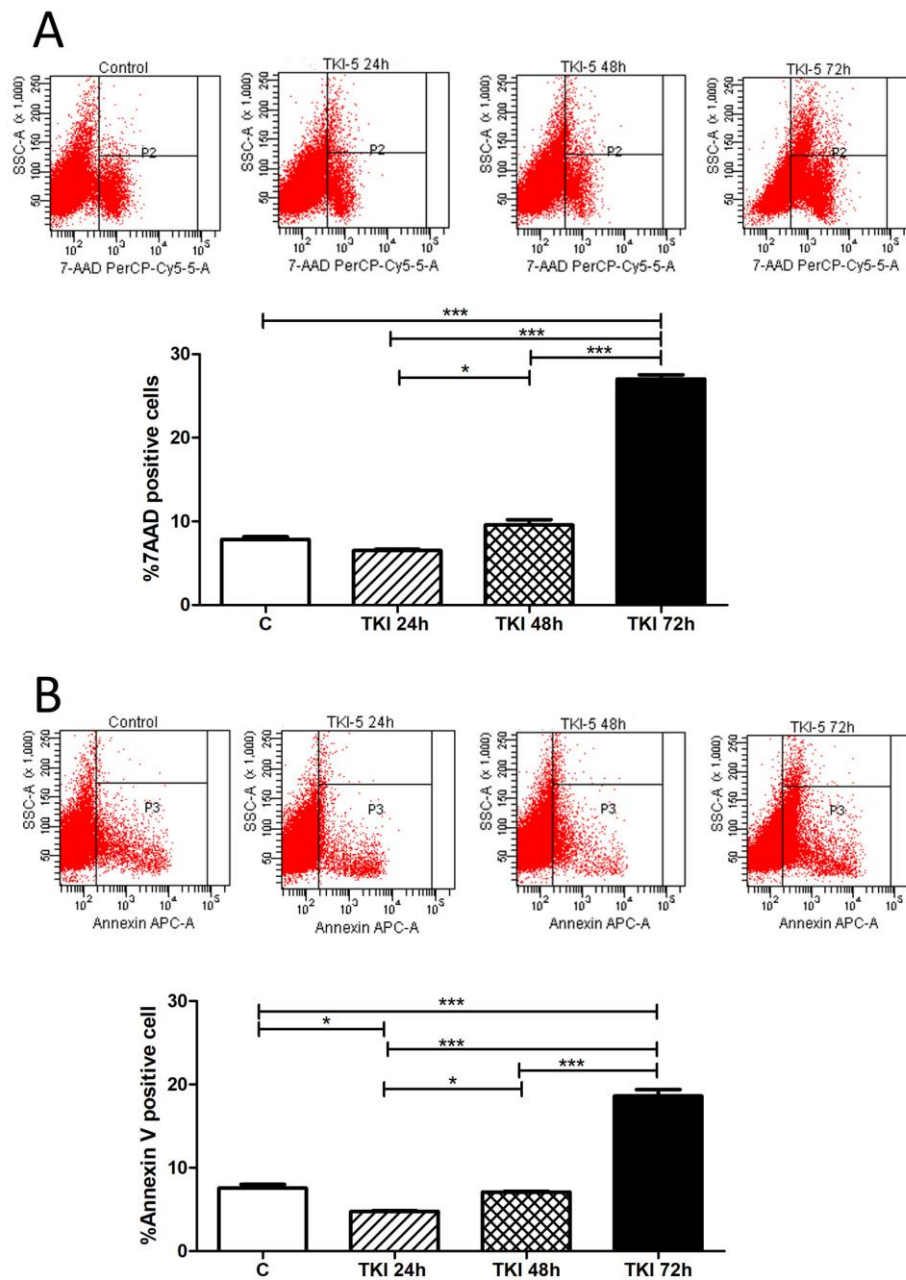


Fig. 1 TKI-258 stimulates apoptosis in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Flow cytometry analysis of control cells treated with 5 μ M TKI-258 for 24, 48 and 72 h. Percentage of cells positive for specific markers: (A) 7-AAD for cell death and (B) Annexin V for Apoptosis. ANOVA, $p < 0.0001$ and Tukey's post-test $*p < 0.05$ $***p < 0.0001$.

Rho GTPases participate in apoptosis signaling and possibly are involved on the TKI-258 inhibitor pathway

Treatment with 5 μ M TKI-258 and/or 100 μ M LPA affected apoptosis [$F(3,11)=277.02$, $p<0.0001$]. The TKI-258 ($248.1\pm 1.1\%$) significantly stimulates apoptosis ($p<0.0001$). As expected, the stimulus for Rho GTPases with LPA ($331.2\pm 24.8\%$), increased the percentage of apoptotic cells ($p<0.0001$), and the rate of apoptosis was even higher when TKI-258 was combined with LPA ($403.3\pm 10.7\%$), $p<0.0001$ (Fig. 2A).

The treatment with 5 μ M TKI-258 and/or 2 μ g/mL Toxin A *Clostridium difficile* affects apoptosis [$F(3,11)=6267.03$, $p<0.0001$]. The inhibition of Rho GTPases family proteins with Toxin A ($64.9\pm 0.1\%$) led to a decrease in apoptosis ($p<0.0001$), which was also expected. Interestingly, the effect of the combination TKI with Toxin A ($69.2\pm 3.5\%$) was similar to only Toxin A (Fig. 2B).

Treatment with TKI-258 affected the gene expression of GTPases RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 and Cdc42 of SCC-4 cells (Fig. 2C). GTPase RhoA had a progressive increase in gene expression over the time studied [$F(3,11)=12.23$, $p<0.05$]. The treatment with TKI-258 for 24h (5.1 ± 1.0 fold) tended to increase the RhoA mRNA, and a significant increase was observed ($p<0.0001$) in 48h (21.4 ± 1.0 fold) and 72h (28.9 ± 12.9 fold). However, gene expression decreased in the other studied Rho GTPases. RhoB mRNA from control and treated cells with TKI- 258 varied [$F(3,11)=91.66$, $p<0.0001$], a significant decrease was observed ($p<0.0001$) in 24h (0.07 ± 0.04 fold), 48h (0.07 ± 0.14 fold) and 72h (0.24 ± 0.01 fold). Gene expression of RhoC varied in the groups [$F(3,11)=1074.74$, $p<0.0001$]. There was a significant reduction ($p<0.0001$) after treatment with TKI-258 in 24h (0.04 ± 0.01 fold), 48h (0.05 ± 0.03 fold) and 72h (0.09 ± 0.03 fold). Treatment with TKI-258 led to a reduction in GTPase Rac1 gene expression [$F(3,11)=45.95$, $p<0.0001$], significantly in 24h (0.28 ± 0.08 fold), 48h (0.14 ± 0.05 fold) and 72h (0.39 ± 0.16 fold). Cdc42 mRNA was different in control and treated cells [$F(3,11)=20.98$, $p<0.0001$], a reduction in 24h (0.17 ± 0.04 fold, $p<0.0001$), 48h (0.08 ± 0.02 fold, $p<0.0001$) and 72h(0.50 ± 0.30 fold, $p<0.05$).

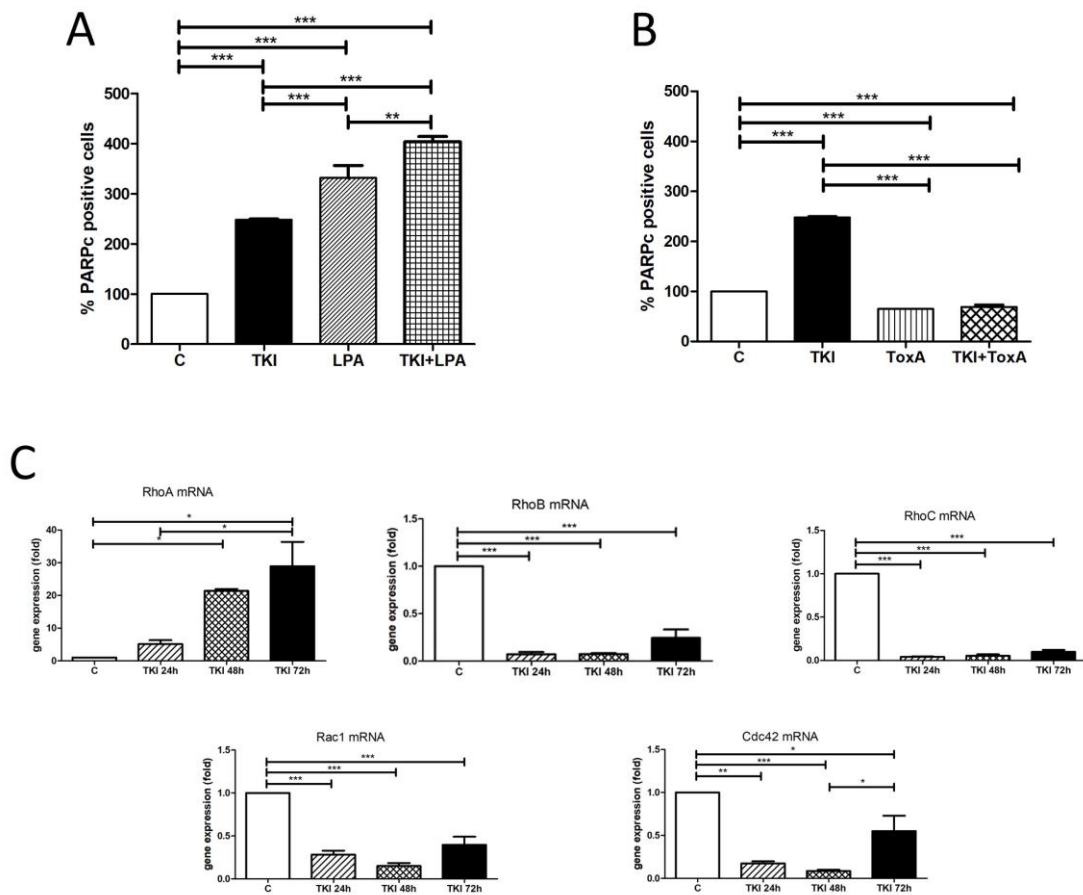


Fig. 2 TKI-258 increases apoptosis and affects the gene expression of Rho GTPases in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Immunofluorescence analysis of PARP cleaved in control and treated cells for 72 h with: (A) TKI-258 5 μ M and/or 100 μ M LPA and (B) TKI-258 5 μ M and/or 2 μ g/mL Toxin A. (C) Quantitative PCR analysis of gene expression of Rho GTPases: RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 and Cdc42 in control and treated cells 5 μ M TKI-258 for 24, 48 and 72h. ANOVA $p < 0.05$ and Tukey's post-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$.

ROCKs participate in apoptosis signaling and possibly are involved on the TKI-258 inhibitor pathway

Treatment with 5 μ M TKI-258 and/or 30 μ M Y-27632 (specific ROCKs inhibitor) affected the percentage of apoptotic cells [$F(3,11) = 3697.97$, $p < 0.0001$]. The inhibition of ROCKs with Y-27632 ($59.7 \pm 1.6\%$) reduces the percentage of apoptotic cells compared with control ($p < 0.0001$) and TKI-258 ($p < 0.0001$). Interestingly, the rate of apoptosis increased when Y-27632 was combined with TKI-258 ($74.7 \pm 2.06\%$) compared with Y-27632 only (Fig. 3A).

A similar result was observed with treatment with another specific ROCKs inhibitor, 50 μ M HA-1077 and/or 5 μ M TKI-258 [$F(3,11) = 3906.30$, $p < 0.0001$]. The HA-1077 ($42.1 \pm 1.8\%$) reduced the rate of apoptosis in relation to the control ($p < 0.0001$) and the TKI-258 ($p < 0.0001$). Also, the combination of TKI-258 and HA-1077 ($69.13 \pm 2.2\%$) increased the percentage of apoptotic cells when compared with HA-1077 only (Fig. 3B).

The ROCK1 protein, effector Rho-like GTPases, had variation in their gene expression after treatment with 5 μ M TKI-258 for 24, 48 and 72h [$F(3,11) = 6.93$, $p < 0.05$]. There was a tendency to increase ($p < 0.05$), ROCK1 mRNA in 24h (34.3 ± 15.5 fold) and 48h (32.06 ± 3.5 fold). And, a significant increase ($p < 0.05$) of ROCK1 mRNA after TKI-258 treatment for 72 hours (48.5 ± 20.9 fold), (Fig. 3C).

The gene expression of the ROCK2 protein, also an effector of the Rho-like GTPases, varied in cells treated with 5 μ M TKI-258 for 24, 48 and 72h [$F(3,11) = 10.12$, $p < 0.05$]. There was a tendency to increase ($p < 0.05$), ROCK2 mRNA in cells treated with TKI-258 for 24h (392.4 ± 68.9 fold) and 48h (1708.2 ± 898.6 fold). Also, there was a significant increase ($p < 0.05$) of ROCK2 mRNA after 72h treatment (1708.2 ± 898.6 fold), (Fig. 3D).

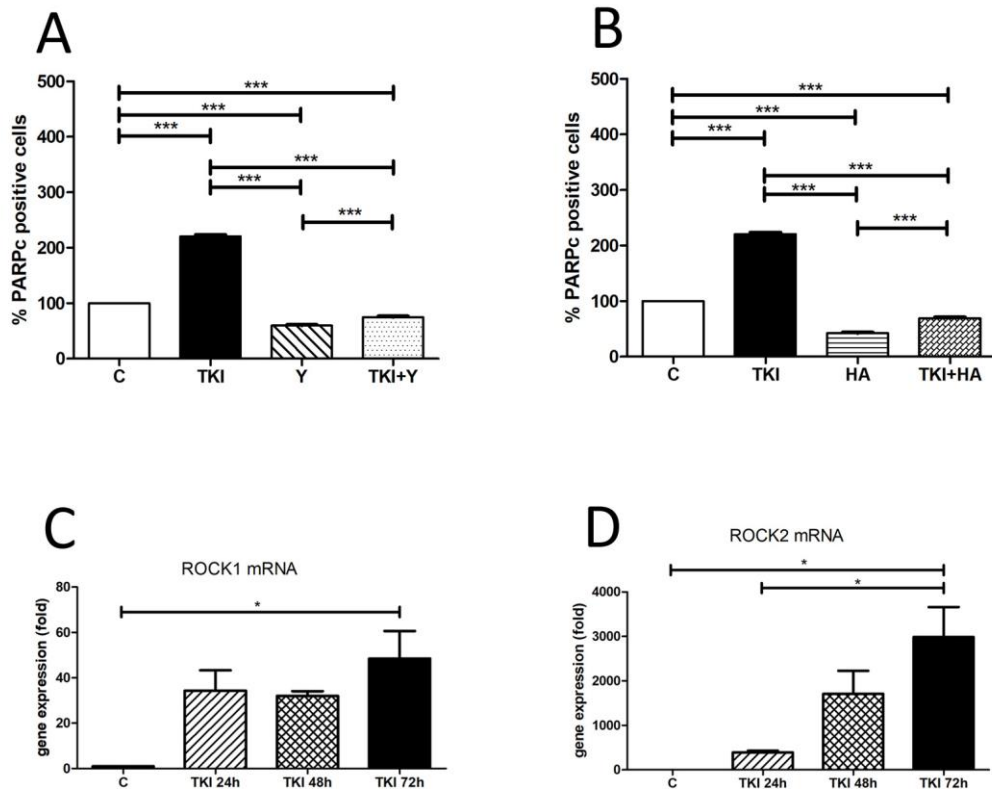


Fig. 3 TKI-258 increases apoptosis and ROCK gene expression in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. Immunofluorescence analysis of PARP cleaved in control cells and treated for 72 h with: (A) 5 μ M TKI-258 and/or 30 μ M Y-27632 and (B) 5 μ M TKI-258 and/or 50 μ M HA-1077. (C) Quantitative PCR analysis of ROCK1 and ROCK2 gene expression in control cells and treated with 5 μ M TKI-258 for 24, 48 e 72h. ANOVA, $p < 0.05$ and Tukey's post-test * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$. signaling is increased by treatment with TKI-258 and leads to increased apoptosis in of oral squamous cell carcinoma in vitro

TKI-258 reduces gene expression of PAK1 and PAK2 in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma

After treatment with 5 μ M TKI-258, the gene expression of PAK1 and PAK2 proteins, effectors of GTPases Rac1 and Cdc42, decreased in SCC-4 cells. PAK1 mRNA varied in control and treated cells [$F(3,11)=782.145$, $p < 0.0001$], showing a significant reduction ($p < 0.0001$) in 24h (0.4 ± 0.2 fold), 48h (0.48 ± 0.001 fold) and 72h (0.5 ± 0.5 fold). Also, PAK2 mRNA varied [$F(3,11)=41.333$, $p < 0.0001$], showing a significant reduction ($p < 0.0001$) in 24h (0.1 ± 0.02 fold), 48h (0.4 ± 0.007 fold) 72h (0.1 ± 0.2 fold).

Discussion

This study showed that the treatment with TKI-258 led to a significant increase in cell death and apoptosis and, probably Rho GTPases and their effectors ROCKs participate in the signaling pathway inhibited by TKI-258. Several biochemical and molecular steps regulate the different mechanisms of cell death, such as necrosis and apoptosis, for example (21). Diseases like cancer have this abnormal regulation and require the understanding of this complex process so that new treatments can be developed (22).

The treatment with the multi-target tyrosine kinase inhibitor TKI-258 increases cell death in oral squamous cell carcinoma SCC-4 cells. In cell death due to necrosis, cells lose their ability to function, which occurs in a manner induced by several factors such as radiation, heat, and chemicals such as some drugs for example (22). The use of cell death marker, 7-AAD, is very efficient because it shows the subpopulations that are in cell death process (23).

Apoptosis is characterized by the activation of caspases, proteases that act in the processes of cell death (24). This activation occurs through the signaling of two major pathways: the extrinsic pathway linked to cell death receptors and, the intrinsic pathway or mitochondrial pathway (25). The Annexin V marker, specific for apoptosis, in control and treated cells with TKI-258, decreased significantly in 24 hours, similar in 48h and increased significantly in 72 hours, therefore being different.

RTKs are transmembrane proteins responsible for transducing signals from the extracellular environment to the cytoplasm, mediating essential cellular processes (26). They have a similar molecular structure: extracellular portion, transmembrane region and the cytoplasmic portion containing the C terminal domain with tyrosine kinase activity (27). RTKs are activated when ligands connect to the extracellular portion forming dimers that activate the intracellular kinase portion, promoting phosphorylation and response to the ligand by activating the molecules that express their target genes (28). In cancer these receptors are overexpressed, with high rates of phosphorylation of the tyrosine portion (27). TKI-258 is a small molecule able to simultaneously inhibit FGFRs, VEGFRs, and PDGFRs.

The binding of cell death-related receptors to their ligands promotes the formation of a protein complex called the death-inducing signaling complex (DISC), responsible for the

activation of caspase-8 (29). This, in turn, promotes the activation of caspase-3, which cleaves the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), which identifies DNA cuts and helps in their repair (30). Lethal DNA damages that result in apoptosis is related to the cleavage and inactivation of repair proteins like PARP (31). Apoptosis labeling, in the functional assays of this study, was for cleaved PARP, demonstrating the role of Rho GTPase and its effectors in the apoptosis process in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma. The actin cytoskeleton of cells undergoing apoptosis undergoes direct action from caspases resulting in morphological changes (31).

Rho GTPases are known to control essential cellular processes and to be overexpressed in human tumors (32). Rho GTPases: Rho-like, Rac, and Cdc42 regulate different signal transduction pathways (33), binding to receptors on the plasma membrane to assemble different actin filament structures (13) and modulate the cytoskeleton rearrangement, important in apoptosis (34). In this study, stimulation of Rho GTPases through treatment with LPA, combined or not with TKI-258, increased apoptosis rates, as well as the inhibition of these same proteins through treatment with Toxin A, associated or not with TKI-258, reduced the percentage of apoptotic cells.

In SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma, the treatment with TKI-258, at a concentration lower than that of the IC_{50} , resulted in significant changes in cell morphology, especially disorganized actin cytoskeleton (9). GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 evidenced in head and neck carcinomas, both in primary cultures and in cell lines, are involved in the control of the actin cytoskeleton (11). Rho GTPases participate in apoptosis signaling and possibly is involved on the TKI-258 inhibitor pathway in SCC-4 cells used in this study.

RhoA is described as having a role in promoting tumor growth and its role in controlling the actin cytoskeleton is related to the regulation of actomyosin contractility (36). Overexpression of RhoA has been described in invasive carcinomas of the head and neck (37) and has already been linked to the induction of apoptosis in cell lines of fibroblast and erythroleukemia (38). The treatment with TKI-258 in cells of oral squamous cell carcinoma had a progressive increase in gene expression of mRhoA over the time studied. The reorganization of the actin cytoskeleton can also occur in return to the DNA damage response, as observed in adherent cells by activating the RhoA/ROCKs signaling (39).

GTPase RhoB is described as a tumor suppressor since when activated in response to stress stimuli there is inhibition of tumor growth, invasion and cell migration (35). In head and neck carcinomas, RhoB expression was easily detected under normal conditions and in early tumors such as carcinoma in situ and well-differentiated tumors and was shown to be reduced to undetectable as the tumor progressed (40). The expression of RhoB in SCC-4 cells of moderately differentiated oral squamous cell carcinoma used in this study was significantly reduced after treatment with TKI-258 in the three studied times. RhoC plays an important role in promoting tumor growth (35), and its expression appears to be elevated in head and neck squamous cell carcinoma when compared to the normal squamous epithelium (41). Gene expression of RhoC, there was a significant reduction after treatment with TKI-258 in 24h, 48h and 72h.

During the remodelling of the actin cytoskeleton, the GTPases Rac1 and Cdc42 when activated polymerize the actin and provide forward cell movement, while RhoA acts in the opposite portion promoting the contraction of the actomyosin fibers (42). Rac1 and Cdc42 participate in the protrusion of lamellipodia and filopodia respectively (43). In oral and head and neck carcinomas, overexpression of these two GTPases have been reported (44, 45). Treatment with TKI-258 led to a reduction in GTPases Rac1 and Cdc42 gene expression. A result similar to that of our study in which there was an increase in RhoA expression and a reduction in Cdc42 expression was also observed in other strains of oral squamous cell carcinoma (46).

The changes that occur in the cytoskeleton through RhoA are mediated by signaling with effectors ROCKs (15). Changes in the morphology of cells undergoing apoptosis occur due to the contraction of the actin-myosin cytoskeleton forming the membrane bubbles, which characterize this process (47), and the ROCK effector proteins act in the production of force for this contraction to happen (48). Activation of ROCK1 occurs through its cleavage by caspase-3 and results in the formation of bubbles in apoptotic cells (49). In this study, the inhibition of the effector ROCKs with Y-27632 and HA-1077 (specific inhibitors of ROCKs) associated or not with TKI-258 reduced the percentage of apoptotic SCC-4 cells.

Rho-like expression in oral squamous cell carcinoma is increased and, consequently increases the expression of effectors ROCK1 and ROCK2 (50). In SCC-090 and SCC-25 cells of oral squamous cell carcinoma the overexpression of ROCK1 reduced the percentage of cell

proliferation (51). And, in another study, ROCK2 showed high levels of expression in immunohistochemical analysis of 93 samples of oral squamous cell carcinoma, is related to the advanced stage of the disease and tumor progression (52). The ROCK1 and ROCK2 proteins, effectors of Rho-like GTPases, had a significant increase of ROCK1 and ROCK2 mRNA after TKI-258 treatment for 72 hours.

In cancer, PAKs, effectors of GTPases Rac1 and Cdc42, when activated by these pathways, act in the protrusion of the cell membrane and enable the phosphorylation of proteins related to actin (53). Tumor progression is related to the expression of PAKs, and in oral squamous cell carcinoma cells these proteins act in the cytoskeleton, invasion and cell migration (54). The reduction of Rac1 and Cdc42 gene expression was also observed in PAK1 and PAK2 after treatment with TKI-258.

Although a single cell line was used, SCC-4 cells are the most used for studies to develop new treatments for oral squamous cell carcinoma because they do not differ terminally when they are deprived of anchorage (55). New analyzes that can identify how each of the RTKs inhibited by TKI-258 (FGFRs, VEGFRs and PDGFRs) interfere in the signaling pathway of Rho GTPases and their effectors in apoptosis, and in other cellular processes should be performed.

Conclusion

This study showed that TKI-258 stimulates apoptosis in SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma it is a multiple target inhibitors. This is a promising therapeutic for oral squamous cell carcinoma because they expand the possibilities of action in different biological processes. Also in this study, it was demonstrated that Rho GTPases and their effectors ROCKs participate in the signaling pathway inhibited by TKI-258. These proteins are essential for tumorigenesis, and therefore are promising targets for the development of antitumoral drugs. The development of new target therapies, for treatment of oral squamous cell carcinoma, is extremely important due to its high prevalence, aggressiveness, morbidity and mortality. TKI-258 has an important potential for action in the stimuli of apoptosis in oral squamous cell carcinoma, and in the future, it may be a

promising therapy to be used in the clinic, especially RhoA/ROCKs signaling that is increased by treatment with TKI-258.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest statement

The authors Carneiro ACDM, De Vito FB, Moraes-Souza H, and Crema VO declare that they have no conflict of interest.

Funding

We are grateful for financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG [APQ-02333-2018] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES [scholarship].

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent

For this type of study, formal consent is not required.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 11:394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Fang KH, Kao HK, Cheng MH, Chang YL, Tsang NM, Huang YC, Lee LY, Yu JS, Hao SP, Chang KP (2009) Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. *Otolaryngol Head Neck Surg* 141:743-749. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2009.09.012>
3. Montero PH, Patel SG (2015) Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* 1:491-508. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>
4. D'souza S, Addepalli V (2018) Preventive measures in oral cancer: An overview. *Biomed Pharmacother* 107:72-80. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.114>
5. Chinn SB, Myers JN (2015) Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. *J Clin Oncol* 33:3269-276. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2929>
6. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H (2017) Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 108:256-266. <https://doi.org/10.1111/cas.13126>
7. Lee SH, Lopes de Menezes D, Vora J, Harris A, Ye H, Nordahl L, Garrett E, Samara E, Aukerman SL, Gelb AB, Heise C (2005) In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clin Cancer Res* 11:3633-3641.
8. Imai K, Takaoka A (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6:714-727
9. Carneiro ACDM, Silveira ICD, Rezende AS, Silva BRO, Crema VO (2017) Tyrosine kinase inhibitor TKI-258 inhibits cell motility in oral squamous cell carcinoma in vitro. *J Oral Pathol Med* 46:484-488. <https://doi.org/10.1111/jop.12511>
10. Silveira IC, D M Carneiro AC, Hiss LS, Crema VO (2020) Anti-Proliferative Role of the Tyrosine Kinase Inhibitors TKI-258 on Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro. *Anticancer Agents Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200213110944>
11. Sahai E, Marshall CJ (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2:133-142.
12. Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V (2014) Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* 5:e29019. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29019>

13. Hall A (2012) Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 40:1378-1382. <https://doi.org/10.1042/BST20120103>
14. Aznar S, Lacal JC (2001) Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* 165:1-10.
15. Aznar S, Fernández-Valerón P, Espina C, Lacal JC (2004) Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer Lett* 206:181-191.
16. Moreira Carboni SeS, Rodrigues Lima NA, Pinheiro NM, Tavares-Murta BM, Crema VO (2015) HA-1077 inhibits cell migration/invasion of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs* 26:923-930. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000267>
17. Fouad YA, Aanei C (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 7:1016-1036.
18. Majtnerová P, Roušar T (2018) An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 45:1469-1478. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
19. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G (2016) Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 04:603-619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method (2008) *Nat Protoc.* 3:1101-1118.
21. Ocker M, Höpfner M (2012) Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res* 48:111-120. <https://doi.org/10.1159/000336875>
22. D'Arcy MS (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 43:582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
23. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13:204-208.
24. Logue SE, Martin SJ (2008) Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36:1-9. <https://doi.org/10.1042/BST0360001>
25. Fulda S (2011) Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. *Front Oncol* 1:1-7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2011.00023>
26. Choura M, Rebaï A (2011) Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology. *J Recept Signal Transduct Res* 31:387-394. <https://doi.org/10.3109/10799893.2011.625425>
27. Hunter T (2014) The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a020644. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020644>

28. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE (2020) Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers (Basel)* 12:1-17. <https://doi.org/10.3390/cancers12030731>
29. Ashkenazi A (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:325-331. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.001>
30. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347.
31. Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:821-846.
32. Svensmark JH, Brakebusch C (2000) Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene* 64:832-46.
33. Song S, Cong W, Zhou S, Shi Y, Dai W, Zhang H, Wang X, He B, Zhang Q (2019) Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* 14:30-39. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.06.004>
34. Ruoslahti E, Reed JC (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77:477-478.
35. Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-179.
36. Hodge RG, Ridley AJ (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:496-510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
37. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Muñoz-Antonia T (2002) Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 8:2225-2232.
38. Esteve P, Embade N, Perona R, Jiménez B, del Peso L, León J, Arends M, Miki T, Lacal JC (1998) Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* 17:1855-1869.
39. Povea-Cabello S, Oropesa-Ávila M, de la Cruz-Ojeda P, Villanueva-Paz M, de la Mata M, Suárez-Rivero JM, Álvarez-Córdoba M, Villalón-García I, Cotán D, Ybot-González P, Sánchez-Alcázar JA (2017) Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences* 18:1-14. <https://doi.org/10.3390/ijms18112393>
40. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Muñoz-Antonia T (2002) Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 8:2225-2232.

41. Islam M, Sharma S, Kumar B, Teknos TN (2013) Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis. *Oral Oncol* 49:778-786. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.04.003>
42. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
43. Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
44. Patel V, Rosenfeldt HM, Lyons R, Servitja JM, Bustelo XR, Siroff M, Gutkind JS (2007) Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. *Carcinogenesis* 28:1145-1152.
45. Lai SY, Ziober AF, Lee MN, Cohen NA, Falls EM, Ziober BL (2008) Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 44:683-688.
46. Li YY, Zhou CX, Gao Y (2015) Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases. *Am J Cancer Res* 5:514-529.
47. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* (4):339-345.
48. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-20249.
49. Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3:346-352.
50. Jiang L, Liu X, Kolokythas A, Yu J, Wang A, Heidbreder CE, Shi F, Zhou X (2010) Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 127:505-512. <https://doi.org/10.1002/ijc.25320>
51. Jin Z, Jiang S, Jian S, Shang Z (2019) Long noncoding RNA MORT overexpression inhibits cancer cell proliferation in oral squamous cell carcinoma by downregulating ROCK1. *J Cell Biochem*. <https://doi.org/10.1002/jcb.28449>
52. Dourado MR, de Oliveira CE, Sawazaki-Calone I, Sundquist E, Coletta RD, Salo T (2018) Clinicopathologic significance of ROCK2 expression in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 47:121-127. <https://doi.org/10.1111/jop.12651>
53. Clayton NS, Ridley AJ (2020) Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 8:1-12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00222>

54. Parvathy M, Sreeja S, Kumar R, Pillai MR (2016) Potential role of p21 Activated Kinase 1 (PAK1) in the invasion and motility of oral cancer cells. *BMC Cancer* 1:1-7.
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2263-8>

55. Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas (1981) *Cancer Res* 41:1657-1663.

Artigo 2 - The use of inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways treatment for oral squamous cell carcinoma therapeutic - Review

Running title:

Oral squamous cell carcinoma therapeutic

Contributors:

1. Msc. Carneiro, Anna Cecília D. M.
2. PhD. Crema, Virgínia O.

Affiliation of authors:

Department(s) and institution(s)

Structural Biology Department, Institute of Biological Sciences and Natural, Federal University of Triângulo Mineiro

Corresponding Author:

Virgínia O. Crema,

Praça Manoel Terra 330, Uberaba, MG, Brazil, CEP 38025-050,

Phone: 55-34-3700-6463, e-mail: virginia.crema@uftm.edu.br

Total number of photographs: 1

Word counts

for abstract: 245

for the text: 2074

Sources of support:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG [APQ-02333-2018] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES [scholarship].

Abstract:

Background: The biggest challenge for the development of new drugs for oral cancer treatment is the need to inhibit some biological processes and stimulate cellular behaviour to eliminate the tumour. Several interacting signalling pathways regulate the cell biology involved in tumorigenesis. **Objectives:** Growth factor receptor-initiated pathways are a potential target for these therapies because they regulate cell proliferation, cell death, cell differentiation, intercellular adhesion, and cell movement. **Methods:** The searches were carried out in the databases: PubMed Central, Elsevier ScienceDirect Complete, Wiley Online Library Journals and Scielo, using articles published from 2001 to 2020, in English. **Results:** Since the treatment of oral squamous cell carcinoma should be multidisciplinary, current strategies include surgical excision, chemotherapy, radiotherapy and can be applied alone or concomitantly. Currently, therapies for invasive tumours have been directed to molecular pathways such as monoclonal antibodies and receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKs). Currently, multi-stage studies are underway to treat oral squamous cell carcinoma with these two types of targeted therapy. Molecular therapies such as monoclonal antibodies and RTKs inhibitors acting on multiple targets and used in combination, including with conventional therapies, may be the key to improving the prognosis of this disease. **Conclusion:** Since oral squamous cell carcinoma currently still leads to death or significant loss in patients' quality of life due to surgical sequelae, new therapeutic approaches that have been developed for the treatment of are promising to be successful, such as the use of inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways.

Key-words: Chemotherapy; Growth factor receptors; Oral squamous cell carcinoma; Tyrosine Kinase Inhibitors; Tyrosine Kinase Receptors

Introduction:

The biggest challenge for the development of new drugs for oral cancer treatment is the need to inhibit some biological processes and stimulate cellular behaviour to eliminate the tumour. Several interacting signalling pathways regulate the cell biology involved in tumorigenesis. Growth factor receptor-initiated pathways are a potential target for these therapies because they regulate cell proliferation, cell death, cell differentiation, intercellular adhesion, and cell movement.

Biological characteristics of cells enable the development of oral squamous cell carcinoma, as in other cancers. Cancer cells present a disorganized growth, loses their ability to adhere to other cells, acquire a migratory potential and invasion capacity, detaches from the tumour, enters the blood or lymphatic vessel and extrudes in a distant site, where the tumour cells proliferate forming metastasis [Figure 1].

Since oral squamous cell carcinoma currently still leads to death or significant loss in patients quality of life due to surgical sequelae, new therapeutic approaches have been developed and promising to be successful, such as the use of inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways.

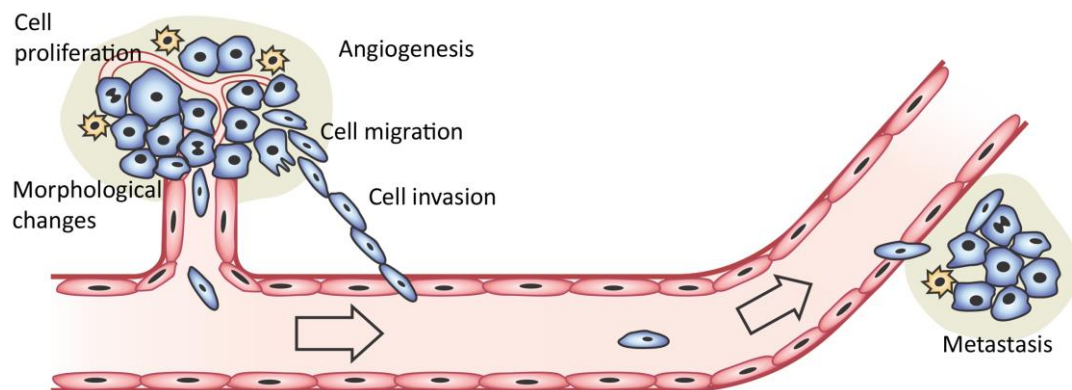


Figure 1. Biological processes involved in oral squamous cell carcinoma tumorigenesis

Methods

The searches were carried out in the databases: PubMed Central, Elsevier ScienceDirect Complete, Wiley Online Library Journals and Scielo. The selected papers were published between 2001 and 2020 in journals indexed to the databases consulted. The selection of articles was made according to the topics covered, being: chemotherapy; growth factor receptors; oral squamous cell carcinoma; tyrosine kinase inhibitors; tyrosine kinase receptors. All selected works were in the English language.

Oral squamous cell carcinoma

The keratinocyte is the cell that gives rise to oral squamous cell carcinoma. The same biological process involved in tumorigenesis occurs in healthy tissue. Keratinocytes from the layer near the basement membrane proliferate and during their migration toward the surface of the oral mucosa, they undergo through the cell differentiation, forming intercellular junctions, occur cell death, and cells detach from the epithelium.

Changes in their DNA, often spontaneous but with increased potential due to exposure to risk factors, promote the change from normal to premalignant or malignant cells, making them self-sufficient ^[1]. Also, changes occur in the processes of cell differentiation and migration, from the basal layer to the most superficial layer ^[2]. According to the World Health Organization (WHO), oral squamous cell carcinoma lesions are diagnosed as well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated ^[3]. The degree of differentiation correlates with the behaviour of oral squamous cell carcinoma ^[4].

Oral squamous cell carcinoma therapeutic

Treatment of oral squamous cell carcinoma should be multidisciplinary. Current strategies include surgical excision, chemotherapy, radiotherapy may be applied alone or concomitantly [Table 1]. Surgical resection is usually the first choice and contributes to the evaluation of tumour spread by histopathological examination of the tumour margins. Surgery for early stage lesions is intended to completely remove the primary tumour, whose histopathological characteristics determined after tumour removal are also determinant for treatment management ^[5].

Table 1. Oral squamous cell carcinoma promising therapeutic with inhibitors of tyrosine kinases signalling pathways.

RTKs*	Inhibitor	Effect on Oral Squamous Cell Carcinoma	Category
EGFR	Cetuximab	Reduction of metastasis ²⁷	Monoclonal Antibody
	Panitumab	Reduction of metastasis ³²	Monoclonal Antibody
	Erlotinib	Reduction of metastasis ³⁴	RTK inhibitor
VEGFR	Bevacizumab	Reduction of angiogenesis ⁴⁰ Reduction of vascular permeability ⁴⁰	Monoclonal Antibody
	Sorafenib	Reduction of cell growth ⁴⁵ Reduction of migration and invasion ⁴⁵	RTK inhibitor
	TKI-258	Reduction of cell proliferation ⁴⁹ Morphological changes in actin filaments ⁵⁰ Reduction of migration and invasion ⁵⁰	RTK inhibitor

*RTKs - tyrosine kinase receptors

When tumour staging is advanced, with regional lymph node positivity and underlying tissue infiltration, the resources added to surgical therapy are adjunctive radiotherapy with or without chemotherapy [6]. The side effects of these combined treatments are diverse such as mucositis, dysphagia, dermatitis, leukopenia, and thrombocytopenia, as well as reduced long-term quality of life due to various complications, from surgical mutilation to neurosensory disorders [7].

Although conventional techniques have made significant progress, the prognosis of oral squamous cell carcinoma, especially for invasive tumours, remains poor [8]. Currently, therapies have been directed to molecular pathways such as monoclonal antibodies and inhibitors of tyrosine kinase receptors [9].

Tyrosine kinase receptors (RTKs) are transmembrane proteins located on the cell surface and are important regulators of several key processes such as proliferation, differentiation, migration, survival, metabolism, and angiogenesis [10]. Around 60 different RTKs have been identified, distributed in approximately 20 subfamilies defined by receptors or ligands [11]. These receptors have an extracellular and intracellular domain that includes a tyrosine kinase catalytic domain where autophosphorylation takes place [10]. Activation requires a specific ligand binding in the extracellular domain inducing dimerization and phosphorylation of the receptor tyrosine kinase intracellular domain, resulting in an intracellular phosphorylation cascade, which can be parallel to multiple activated effector cascades [12].

The RTKs and their signalling pathways are subject to oncogenic mutations, leading to cellular transformation [13]. In cancer, there is an exacerbation in the activation of RTKs [10]. This excessive activation and numerous mutations of tumour RTKs have triggered new cancer treatments because of the direct effects on tumour cells [14]. These therapies are divided into two categories: monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors [10].

Monoclonal antibodies are very large and hydrophobic molecules that can act on secreted or expressed molecules on the cell surface, as they cannot cross the plasma membrane [15]. Its therapeutic action is extremely specific and only occurs when there is ligand junction in the receptor specific domain [16], and this domain, in turn, is different according to which monoclonal antibody subclass is used [17]. Although the binding occurs on the surface of tumour cells, the effects are observed in the signal transduction that occurs in the intracellular portion, inducing cellular effects or stimulating an immune response against the tumour [18]. They are administered intravenously because of the plasma concentration [19] and their antitumor effects are potentiated when combined with other therapies [20].

The tyrosine kinase inhibitors are small molecules that in contrast to the monoclonal antibodies have the ability to cross the cell membrane and prevent autophosphorylation and consequent receptor activation [16]. These molecules are capable of binding to the C-terminal portion of the tyrosine kinase receptor and to the site corresponding to intracellular adenosine-5'-triphosphate (ATP), binding by hydrogen bridges [21] and because it is ATP-mimetic [16]. Tyrosine kinase inhibitors may also prevent ATP from

associating with a site allosteric of the receptor, making phosphate transfer to the tyrosine residue impossible by blocking signalling [22]. In general they are administered orally and their toxicity profile is related to the targeted receptor and its function [23].

Monoclonal antibodies and RTKs inhibitors have shown promising results in inhibiting exacerbated tumour cell processes that are critical for their survival [24]. Both have specific toxicity profiles and acting different roles in cell signalling [23]. Thus, they constitute a precision therapy because it is a targeted chemotherapy modality, since the goal is to generate effect on tumour cells and preserve normal cells [12]. Most of these cancer treatment inhibitors are multi-target because they act simultaneously on more than one receptor increasing their effectiveness [24].

Currently, molecular target therapies are already employed for the treatment of oral squamous cell carcinoma aiming at specific inactivation of these proteins, described as fundamental for tumour oncogenesis and growth. Targets such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) have been well described and some inhibitors are already used in clinical phase studies, but others are in different research phases [Table 1].

Epidermal Growth Factor Receptors (EGFRs)

The first receptor tyrosine kinase discovered was the EGFR, which has four isoforms, EGFR1, EGFR2, EGFR3 and EGFR4 that are activate by the signalling EGF-EGFR. The downstream signalling of this receptor reaches several pathways such as RAS, RAF, MAPK, PI3K among others and therefore can influence a wide range of cellular processes [25].

The EGFRs acts on tumour cells, regulating proliferation, cell differentiation [26], angiogenesis, apoptosis inhibition, cell adhesion, motility and metastasis formation capacity [25]. It has been reported that the mutated EGFR gene has the remodelling capacity of the tumour microenvironment [24]. In oral squamous cell carcinoma, this receptor is overexpressed mainly in well and moderately differentiated tumours [27] and, plays a role in the recurrence and development of metastases [28].

Targeted therapies for EGFR inhibition may be with monoclonal antibodies or tyrosine kinase receptor inhibitors [27]. Monoclonal antibodies block signalling pathways by binding to extracellular domain of EGFR [29]. Tyrosine kinase inhibitors compete with intracellular ATP and inhibit EGFR autophosphorylation by blocking signal transmission to intracellular pathways [30].

The first Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency-approved target treatment for head and neck cancers, including locally advanced oral squamous cell carcinoma, was the monoclonal antibody Cetuximab [27]. When used as monotherapy its response is limited but substantially improved when prescribed in combination with radiotherapy [31] or chemotherapy [32].

Panitumumab is still being test for metastatic oral squamous cell carcinoma, but it has been shown already in a phase III study that when combined with Cisplatin and Fluorouracil there was increased patient survival ^[32]. Other monoclonal antibodies such as Zalutumumab and Nimotuzumab are also being tested, and have shown good results when combined with radiotherapy ^[27].

To date, FDA has not been approved for use of EGFR tyrosine kinase inhibitors in the treatment of head and neck tumours, but several inhibitors are being studied in phase II and III of clinical trials ^[33]. In the phase II clinical study, the Erlotinib treatment of head and neck squamous cell carcinoma also had good results when the inhibitor was combined with radiotherapy and cisplatin ^[34]. Gefitinib inhibitor, when combined with Docetaxel for treatment of patients with metastatic tumours, showed no improvement in outcome and increased treatment toxicity ^[35].

Afatinib is another such inhibitor that irreversibly blocks EGFR, inhibiting proliferation in head and neck tumour cells in vitro ^[36]. And in phase II clinical study, Afatinib was effective in patients with recurrent disease who were treated with platinum, similar to results obtained with Cetuximab treatment ^[37].

Vascular Endothelial Growth Factor Receptors - VEGFR

VEGFRs presents the isoforms VEGFR 1, VEGFR 2 and VEGFR 3, and the activation of these signalling pathways promotes important responses to accelerated tumour growth ^[38]. Tumours of oral squamous cell carcinoma have overexpression of VGFRs, especially in necrotic areas that have suffered hypoxia, thus increasing the amount of microvessel around them, favouring the formation of distant metastasis ^[27]. In these tumours VEGF-VEGFR signalling also performs specific functions in cellular processes such as cell proliferation, migration and invasion ^[39].

The most common blockages of downstream signalling of VEGFRs isoforms may occur via monoclonal antibody ^[40] and tyrosine kinase inhibitors ^[39]. Although many of these inhibitors are already approved for the treatment of other tumours, oral squamous cell carcinoma has been shown to be more effective when these inhibitors are combined ^[39].

Bevacizumab is an FDA approved monoclonal antibody for the treatment of various advanced tumours, but still under study for the treatment of oral squamous cell carcinoma ^[27]. It acts by inhibiting angiogenesis concomitantly with the release of chemotherapeutic agents, reducing vascular permeability and pressure within the tumour ^[40].

The Sunitinib inhibitor is already FDA approved for the treatment of advanced renal cell carcinoma and resistant gastrointestinal tumours. It has antitumor and antiangiogenic activity by blocking VEGFR, PDGFR and C-Kit tyrosine kinase receptors and has the high bioavailability when administered orally ^[41]. In cultures of tumour cells of head and neck treated with radiation and an association between Sunitinib and Cetuximab, similar

results were observed with reduced tumour cell proliferation ^[42]. However, monotherapy of this inhibitor has not shown promising results for the treatment of head and neck tumours ^[43].

Sorafenib is an inhibitor of multiple targets such as VEGFR, EGFR and PDGFR, and acts on proliferation and angiogenesis processes ^[11]. It has already been approved for the treatment of advanced kidney, liver and thyroid tumours ^[44]. Studies conducted with cell culture of oral squamous cell carcinoma have demonstrated significant antitumor effects when associated with exposure to ionizing radiation, inhibiting cell growth, migration, and invasion ^[45].

TKI-258 (CHIR-258 or Dovitinib) is a potent inhibitor of RTKs ^[46], which inhibits autophosphorylation of receptors: FGFRs, VEGFRs and PDGFRs ^[47]. Direct inhibition of these three receptors inhibits cell proliferation and reduced intratumoral microvascular density ^[48]. In different studies with cell culture of oral squamous cell carcinoma, it has been observed after treatment with TKI-258: reduced cell proliferation ^[49] and, morphological changes in actin filaments of these cells, and inhibitory effects on migration and invasion of these cells ^[50].

Conclusion

Oral squamous cell carcinoma is a serious public health problem, with high mortality rates and whose limitations of conventional treatments compromise the quality of life and do not prevent the formation of new tumours. Advances in the understanding of the complexity of oral squamous cell carcinoma, considering its microenvironment and the characteristics of tumours in an individualized manner, allows the development of new classes of medications. Molecular therapies such as monoclonal antibodies and RTKs inhibitors acting on multiple targets and used in combination, including conventional therapies, may be the key to improving the prognosis of this disease. In the near future these new therapeutic alternatives could provide patients with more effective treatments and increased quality and life expectancy.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of interest statement

No conflicts of interest to disclose.

References:

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15:388-399.
2. Patel V, Iglesias-Bartolome R, Siegele B, Marsh CA, Leelahavanichkul K, Molinolo AA, et al. Cellular systems for studying human oral squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 720:27-38.
3. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005.
4. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52:195-215.
5. Chinn SB, Myers JN. Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. *J Clin Oncol.* 2015; 33:3269-3276.
6. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015; 24:491-508.
7. Lee YS, Johnson DE, Grandis JR. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2018; 23:283-99.
8. Nör JE, Gutkind JS. Head and Neck Cancer in the New Era of Precision Medicine. *J Dent Res.* 2018; 97:601-602.
9. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, et al. Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2017; 108:256-266.
10. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010; 141:1117-1134.
11. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315:971-979.
12. Peters GJ. From 'Targeted Therapy' to Targeted Therapy. *Anticancer Res.* 2019; 39:3341-3345.
13. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001; 411(6835):355-365.
14. Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6:020644.
15. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:343-357.
16. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:714-727.

17. Jarboe J, Gupta A, Saif W. Therapeutic human monoclonal antibodies against cancer. *Methods Mol Biol.* 2014; 1060:61-77.
18. Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011; 26:1-64.
19. Dancey J. Epidermal growth factor receptor inhibitors in clinical development. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58:1003-1007.
20. Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res.* 2008; 41:98-107.
21. Liang G, Chen G, Wei X, Zhao Y, Li X. Small molecule inhibition of fibroblast growth factor receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24:467-75.
22. Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis.* 2010; 13:1-14.
23. Gharwan H, Groninger H. Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:209-227.
24. Ferguson FM, Gray NS. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17:353-377.
25. Xu MJ, Johnson DE, Grandis JR. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev.* 2017; 36:463-473.
26. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 2002; 110:669-672.
27. Kozakiewicz P, Grzybowska-Szatkowska L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018; 15:7497-7505.
28. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014; 25:282-303.
29. Markovic A, Chung CH. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012; 12:1149-1159.
30. Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology.* 2009; 77:400-10.
31. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006; 354:567-578.
32. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359:1116-1127.

33. Chapman CH, Saba NF, Yom SS. Targeting epidermal growth factor receptor for head and neck squamous cell carcinoma: still lost in translation? *Ann Transl Med.* 2016; 4:80.
34. Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, et al. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2013; 31:1415-1421.
35. Mirghani H, Amen F, Blanchard P, Moreau F, Guigay J, Hartl DM, et al. Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer.* 2015; 136:1494-1503.
36. Modjtahedi H, Cho BC, Michel MC, Solca F. A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014; 387:505-521.
37. Seiwert TY, Fayette J, Cupissol D, Del Campo JM, Clement PM, Hitt R, et al. A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* 2014; 25:1813-1820.
38. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:5018-5022.
39. Vassilakopoulou M, Psyrri A, Argiris A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015; 51:409-415.
40. Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* 2009; 1:1-6.
41. Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol.* 2007; 25:884-896.
42. Machiels JP, Henry S, Zanetta S, Kaminsky MC, Michoux N, Rommel D, et al. Phase II study of sunitinib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: GORTEC 2006-01. *J Clin Oncol.* 2010; 28:21-28.
43. Bozec A, Sudaka A, Toussan N, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol.* 2009; 20:1703-1707.
44. Alterio D, Marvaso G, Maffini F, Gandini S, Chiocca S, Ferrari A, et al. Role of EGFR as prognostic factor in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiotherapy: proposal of a new approach behind the EGFR overexpression. *Med Oncol.* 2017; 34:107.
45. Möckelmann N, Rieckmann T, Busch CJ, Becker B, Gleißner L, Hoffer K, et al. Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7:23542-23551.

46. Huynh H, Chow PK, Tai WM, Choo SP, Chung AY, Ong HS, et al. Dovitinib demonstrates antitumor and antimetastatic activities in xenograft models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012; 56:595-601.
47. Kim KB, Chesney J, Robinson D, Gardner H, Shi MM, Kirkwood JM. 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.* 2011; 17:7451-7461.
48. Lee SH, Lopes de Menezes D, Vora J, Harris A, Ye H, Nordahl L, 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.* 2005; 11:3633-3641.
49. Sweeny L, Zimmermann TM, Liu Z, Rosenthal EL. Evaluation of tyrosine receptor kinases in the interactions of head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts. *Oral Oncol.* 2012; 48:1242-1249.
50. Carneiro ACDM, Silveira ICD, Rezende AS, Silva BRO, Crema VO. Tyrosine kinase inhibitor TKI-258 inhibits cell motility in oral squamous cell carcinoma in vitro. *J Oral Pathol Med.* 2017; 46:484-488.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma epidermoide oral é uma das principais causas de morte por câncer no mundo, e os tratamentos atuais geralmente mutilam os pacientes, sendo que nos casos mais avançados só apresentam bons prognósticos quando aplicados em diversas modalidades. Para que novas terapêuticas, mais precisas e eficazes possam ser desenvolvidas, estudos com linhagens celulares são primordiais para a compreensão de diversos aspectos como a biologia celular destes tumores. O comportamento destas células, e principalmente suas respostas a novas terapêuticas testadas *in vitro* constituem a base da elaboração de pesquisas pré-clínicas com modelos animais, e posteriormente pesquisas clínicas.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou em duas oportunidades a eficiência do TKI-258, um inibidor multialvos dos receptores tirosina quinases FGFRs, VEGFRs e PDGFRs, em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. Neste estudo abordamos a resposta destas células ao tratamento com TKI-258 no que diz respeito à apoptose, processo cujos mecanismos de evasão nos tumores acontece de maneira complexa, e ainda pouco elucidada. Nossa análise da apoptose foi correlacionada à reestruturação do citoesqueleto de actina das células SCC-4 por meio da avaliação da função e da expressão gênica das GTPases Rho e suas efetoras, proteínas fundamentais na execução desta remodelação. O TKI-258 mais uma vez se mostrou eficiente, pois apresentou níveis de apoptose aumentados nas células tratadas, e pudemos demonstrar a participação da sinalização RhoA/ROCKs neste processo.

5.CONCLUSÃO

O tratamento com o inibidor multialvos TKI-258 estimula a morte celular, especialmente a apoptose em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral e, possivelmente, as proteínas GTPase RhoA e suas efetoras ROCKs participam da regulação da apoptose induzida por TKI-258.

- O tratamento de células SCC-4 com o inibidor TKI-258 aumenta a taxa de morte celular em carcinoma epidermoide oral.

- O tratamento de células SCC-4 com o inibidor TKI-258 induz apoptose em células de carcinoma epidermoide oral.

- Os estímulo das proteínas da família das GTPases Rho por tratamento com LPA e inibição com Toxina A combinados ou não ao TKI-258, eleva e reduz as taxas de apoptose, respectivamente, demonstrando o envolvimento das GTPases Rho nas vias sinalização que regulam a apoptose induzida pelo TKI-258 em células SCC-4.

- O tratamento com TKI-258 leva a um aumento na expressão gênica de RhoA e a redução de RhoB, RhoC, Rac1 e Cdc42, sugerindo que dentre essas proteínas, a GTPase RhoA participa das vias de sinalização de FGFRs, VEGFRs e PDGFRs inibidas pelo TKI-258 que regulam apoptose em células SCC-4.

- A inibição das ROCKs, proteínas efetoras de RhoA, RhoB e RhoC, com seus inibidores específicos associados ou não ao TKI-258, reduz a apoptose, demonstrando o envolvimento das ROCKs nas vias de sinalização inibidas pelo TKI-258 em células SCC-4.

- O tratamento com TKI-258 aumenta a expressão gênica de ROCK1 e ROCK2, sugerindo o envolvimento das ROCKs nas vias de sinalização inibidas por TKI-258, e seu envolvimento na regulação de apoptose em células SCC-4.

- O tratamento com TKI-258 reduz a expressão gênica de PAK 1 e PAK 2, proteínas efetoras de Rac1 e Cdc42, sugerindo que essas proteínas não estão envolvidas na regulação da apoptose em células SCC-4.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, N.; PATEL, R. Early detection, causes and screening of oral cancer. **JSM Dentistry.**, v.2, p. 1-5, 2013. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Early-Detection%2C-Causes-and-Screening-of-Oral-Agar-Rs/3c4a3236383532701510489fd239e0c399d5718f> .

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

AL MOUSTAFA, A.-E. **Development of Oral Cancer - Risk Factors and Prevention Strategies**. 1ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2017. 219 p.

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.**, 22, n. 5, p. 677-89, Oct 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20822888> .

ANDRÉ, F.; BACHELOT, T.; CAMPONE, M.; DALENC, F.; PEREZ-GARCIA, J.M.; HURVITZ, S.A. *et al.* Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 19, n. 13, p. 3693-702, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658459> .

ANGEVIN, E.; LOPEZ-MARTIN, J. A.; LIN, C. C.; GSCHWEND, J. E.; HARZSTARK, A.; CASTELLANO, D., *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, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339124> .

APPLEBAUM, K. M.; FURNISS, C.S.; ZEKA, A.; POSNER, M.R.; SMITH, J.F.; BRYAN, J. *et al.* Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. **JNCI J Natl Cancer Inst.**, v. 99, n. 23, p. 1801-10, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042931> .

ARTEAGA, C. L.; ENGELMAN, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. **Cancer Cell.**, v. 25, n. 3, p. 282-303, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651011> .

AZNAR, S.; FERNÁNDEZ-VALERÓN, P.; ESPINA, C.; LACAL, J. C. Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. **Cancer Lett.**, v. 206, n. 2, p. 181-91, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013523> .

AZNAR, S.; LACAL, J. C. Rho signals to cell growth and apoptosis. **Cancer Lett.**, v. 165, n. 1, p. 1-10, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248412> .

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 6, p. 414-17, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400366> .

BARANWAL, S.; ALAHARI, S. K. Rho GTPase effector functions in tumor cell invasion and metastasis. **Curr Drug Targets.**, v. 12, n. 8, p. 1194-1201, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561416> .

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Genética e Patologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço**. 1ed. IARC Press, Lyon, 2009.

BAYKUL, T.; YILMAZ, H. H.; AYDIN, U.; AYDIN, M. A.; AKSOY, M.; YILDIRIM, D. Early diagnosis of oral cancer. **J Int Med Res.**, v. 38, n. 3, p. 737-49, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819411> .

BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem J.**, v. 348, n. 2, p. 241-55, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816416> .

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644197> .

BODNER, L.; MANOR, E.; FRIGER, M. D.; VAN DER WAAL, I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger - review and analysis of 186 reported cases. **Oral Oncol.**, 50, n. 2, p. 84-9, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296165> .

BOUQUOT, J. E.; SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. Epithelial dysplasia of the oral mucosa - Diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology.**, v.12, p. 11-21, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968605305001067> .

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593> .

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell.**, v. 116, n. 2, p. 167-179, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=14744429> .

CARDAMA, G. A.; GONZALEZ, N.; MAGGIO, J.; MENNA, P. L.; Gomez D.E. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). **Int J Oncol.**, v. 51, n. 4, p. 1025-34, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28848995> .

CARNEIRO, A. C. D. M.; SILVEIRA, I. C. D.; REZENDE, A. S.; SILVA, B. R. O; CREMA, V. O. Tyrosine kinase inhibitor TKI-258 inhibits cell motility in oral squamous cell carcinoma in vitro. **J Oral Pathol**

Med., v. 46, n. 7, p. 484-88, 2017. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27732737> .

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

CHEN, J.; AHMAD, R.; LI, W.; SWAIN, M.; LI, Q. Biomechanics of oral mucosa. **J R Soc Interface.**, v. 12, n. 109, p. 20150325, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224566> .

CHEN, Z. Y.; SHI, M.; PENG, L. X.; WEI, W.; LI, X.J.; GUO, Z.X. Dovitinib preferentially targets endothelial cells rather than cancer cells for the inhibition of hepatocellular carcinoma growth and metastasis. **J Transl Med.**, v. 10, p. 245, Dec 2012. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224566> .

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J Clin.**, v. 65, n. 5, p. 401-21, 2015. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215712> .

CHINN, S. B.; MYERS, J. N. Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 29, p. 3269-76, 2015. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=26351335> .

CHOI, Y. J.; KIM, H. S.; PARK, S. H.; KIM, B. S. *et al.* Phase II Study of Dovitinib in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer (KCSG-GU11-05). **Cancer Res Treat.**, v. 50, n. 4, p. 1252-59, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29334610/> .

COLEMAN, M. L.; OLSON, M. F. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 5, p. 493-504, 2002. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11973608/> .

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W.M. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med.**, v. 356, n. 19, p. 1944-56, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494927> .

D'SOUZA, S.; ADDEPALLI, V. Preventive measures in oral cancer: An overview. **Biomed Pharmacother.**, n. 107, p. 72-80, 2018. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30081204> .

DE CARVALHO, M.B.; LENZI, J.; LEHN, C.N.; FAVA, A.S.; AMAR, A.; KANDA, J.L. 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. Disponível em:
<https://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.**, v. 25, n. 3, p. 273-83, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703957> .

DIK, E. A.; IPENBURG, N. A.; KESSLER, P. A.; VAN ES, R. J. J.; WILLEMS, S.M. *et al.* The value of histological grading of biopsy and resection specimens in early stage oral squamous cell carcinomas. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 46, n. 6, p. 1001-6, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29709328> .

DILLON, P. M.; PETRONI, G. R.; HORTON, B. J.; MOSKALUK, C. A. *et al.* A Phase II Study of Dovitinib in Patients with Recurrent or Metastatic Adenoid Cystic Carcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 23, n. 15, p. 4138-45, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28377480/> .

DUBBELMAN, A. C.; UPTHAGROVE, A.; BEIJNEN, J. H.; MARCHETTI, S.; TAN, E.; KRONE, K. Disposition and metabolism of 14C-dovitinib (TKI258), an inhibitor of FGFR and VEGFR, after oral administration in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 70, n. 5, p. 653-63, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010851> .

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

FANG, K. H.; KAO, H. K.; CHENG, M. H.; CHANG, Y. L.; TSANG, N.M., HUANG, Y.C. Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, 141, n. 6, p. 743-49, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932848> .

FERGUSON, F. M.; GRAY, N. S. Kinase inhibitors: the road ahead. **Nat Rev Drug Discov**, v. 17, n. 5, p. 353-77, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545548> .

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer.**, v. 144, n. 8, p. 1941-53, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350310> .

FORASTIERE, A.; KOCH, W.; TROTTI, A.; SIDRANSKY, D. Head and neck cancer. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 26, p. 1890-900, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350310> .

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res.**, v. 7, n. 5, p. 1016-36, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055> .

FULDA, S. Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. **Front Oncol.**, n. 1, p. 23, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22655234> .

GHANI, W. M. N.; RAMANATHAN, A.; PRIME, S. S.; YANG, Y. H.; RAZAK, I.A.; ABDUL RAHMAN, Z.A. *et al.* Survival of Oral Cancer Patients in Different Ethnicities. **Cancer Invest.**, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31307249> .

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

GOERNER, M.; SEIWERT, T. Y.; SUDHOFF, H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments-. **Head Neck Oncol.**, n. 2, p. 8, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398256> .

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. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23403721> .

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science.**, v. 305, n. 5684, p. 626-29, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286356> .

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Life and death by death receptors. **FASEB J.**, v. 23, n. 6, p. 1625-37, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141537> .

GÓMEZ DEL PULGAR, T.; BENITAH, S. A.; VALERÓN, P. F.; ESPINA, C.; LACAL, J.C. Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link. **Bioessays.**, 27, n. 6, p. 602-13, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892119> .

HAHN, N. M.; BIVALACQUA, T. J.; ROSS, A. E.; NETTO, G. J. *et al.* A Phase II Trial of Dovitinib in BCG-Unresponsive Urothelial Carcinoma with FGFR3 Mutations or Overexpression: Hoosier Cancer Research Network Trial HCRN 12-157. **Clin Cancer Res.**, v. 23, n. 12, p. 3003-11, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27932416/> .

HALL, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. **Biochem Soc Trans.**, v. 33, n. 5, p. 891-95, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246005> .

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> .

HASINOFF, B. B.; WU, X.; NITISS, J. L.; KANAGASABAI, R.; KANAGASABAI, R.; YALOWICH, J.C. The anticancer multi-kinase inhibitor dovitinib also targets topoisomerase I and topoisomerase II. **Biochem Pharmacol.**, v. 84, n. 12, p. 1617-26, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041231> .

HODGE, R. G.; RIDLEY, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 17, n. 8, p. 496-510, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27301673/> .

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, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475550> .

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

HUYNH, H.; CHOW, P. K.; TAI, W. M.; CHOO, S. P.; CHUNG, A.Y.; ONG, H.S. *et al.* Dovitinib demonstrates antitumor and antimetastatic activities in xenograft models of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol.**, v. 56, n. 3, p. 595-601, 2012. Disponível em: <https://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, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929325> .

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2020. 122 p.

ISLAM, S.; MUTHUMALA, M.; MATSUOKA, H.; UEHARA, O; KURAMITSU, Y.; CHIBA, I.; *et al.* How Each Component of Betel Quid Is Involved in Oral Carcinogenesis: Mutual Interactions and Synergistic Effects with Other Carcinogens-a Review Article. **Curr Oncol Rep.**, v. 21, n. 6, p. 53, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31028548> .

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

JIA, H.; WANG, X.; SUN, Z. Exploring the long noncoding RNAs-based biomarkers and pathogenesis of malignant transformation from dysplasia to oral squamous cell carcinoma by bioinformatics method. **Eur J Cancer Prev.**, v. 29, n. 2, p. 174-81, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31343435> .

JIANG, S.; DONG, Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. **Curr Probl Cancer.**, v. 41, n. 5, p. 323-27, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28416242> .

KARAMAN, M. W.; HERRGARD, S.; TREIBER, D. K.; GALLANT, P.; ATTERIDGE, C.E.; CAMPBELL, B.T. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **Nat Biotechnol.**, 26, n. 1, p. 127-32, 2008. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183025>.

KETABAT, F.; PUNDIR, M.; MOHABATPOUR, F.; LOBANOVA, L.; KOUTSOPOULOS, S.; HADJIISKI, L. Controlled Drug Delivery Systems for Oral Cancer Treatment-Current Status and Future Perspectives. **Pharmaceutics.**, v.11, n. 7, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31262096> .

KIM, K. B.; CHESNEY, J.; ROBINSON, D.; GARDNER, H.; KIRKWOOD, J.M. 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, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976540> .

KONECNY, G. E.; KOLAROVA, T.; O'BRIEN, N. A.; WINTERHOFF, B.; YANG, G.; QI, J. 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, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443805> .

KOZAKIEWICZ, P.; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Lett.**, v. 15, n. 5, p. 7497-505, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725456> .

LEE, S. H.; LOPES DE MENEZES, D.; VORA, J.; HARRIS, A.; YE, H.; NORDAHL, L.. In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. **Clin Cancer Res.**, 11, n. 10, p. 3633-41, 2005. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897558> .

LEE, Y. S.; JOHNSON, D. E.; GRANDIS, J. R. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs.**, v. 23, n. 4, p. 283-99, 2018. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30376740> .

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene.**, v. 27, n. 48, p. 6194-206, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931687> .

LIANG, G.; CHEN, G.; WEI, X.; ZHAO, Y.; LI, X. Small molecule inhibition of fibroblast growth factor receptors in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 24, n. 5, p. 467-75, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23830577>.

LIN, R.; CERIONE, R. A.; MANOR, D. Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23633-41, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438546> .

LIU, M.; BI, F.; ZHOU, X.; ZHENG, Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. **Trends Cell Biol.**, v. 22, n. 7, p. 365-73, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22572609/> .

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, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377229> .

LURJE, G.; LENZ, H. J. EGFR signaling and drug discovery. **Oncology.**, v. 77, n. 6, p. 400-10, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130423> .

MA, W. W.; XIE, H.; FETTERLY, G.; PITZONKA, L. *et al.* A Phase Ib Study of the FGFR/VEGFR Inhibitor Dovitinib With Gemcitabine and Capecitabine in Advanced Solid Tumor and Pancreatic Cancer Patients. **Am J Clin Oncol.**, v. 42, n. 2, p. 184-89, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30418178/> .

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Mol Biol Rep.**, v. 45, n. 5, p. 1469-78, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30022463> .

MAO, L.; HONG, W. K.; PAPADIMITRAKOPOILOU, V. A. Focus on head and neck cancer. **Cancer Cell.**, v.5, p. 311-16, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093538> .

MARTINS, R. G.; PARVATHANENI, U.; BAUMAN, J. E.; SHARMA, A. K.; RAEZ, L.E.; PAPAGIKOS, M.A. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. **J Clin Oncol.**, v. 31, n. 11, p. 1415-21, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460709> .

MIRGHANI, H.; AMEN, F.; BLANCHARD, P.; MOREAU, F. GUIGAY, J.; HARTL, D.M. *et al.* Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. **Int J Cancer.**, v. 136, n. 7, p. 1494-503, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622970> .

MODJTAHEDI, H.; CHO, B. C.; MICHEL, M. C.; SOLCA, F. A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 387, n. 6, p. 505-21, Jun 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643470> .

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5018209/> .

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

NG, J. H.; IYER, N. G.; TAN, M. H.; EDGREN, G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head Neck.**, v. 39, n. 2, p. 297-304, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27696557> .

NÖR, J. E.; GUTKIND, J. S. Head and Neck Cancer in the New Era of Precision Medicine. **J Dent Res.**, v. 97, n. 6, p. 601-2, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29771196> .

OIKAWA, Y.; MORITA, K. I.; KAYAMORI, K.; TANIMOTO, K.; SAKAMOTO, K.; KATOH, H. *et al.* Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.**, v. 108, n. 2, p. 256-66, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889930> .

PATEL, V.; IGLESIAS-BARTOLOME, R.; SIEGELE, B.; MARSH, C. A.; LEELAHAVANICHKUL, K; MOLINOLO, AA. *et al.* Cellular systems for studying human oral squamous cell carcinomas. **Adv Exp Med Biol.**, v. 720, p. 27-38, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901616> .

PETERS, G. J. From 'Targeted Therapy' to Targeted Therapy. **Anticancer Res.**, v. 39, n. 7, p. 3341-45, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31262854> .

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. Disponível em: <https://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. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674956> .

PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A.; D'ORAZI G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging (Albany NY).**, v. 8, n. 4, p. 603-19, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019364> .

PORTA, C.; GIGLIONE, P.; LIGUIGLI, W.; PAGLINO, C. Dovitinib (CHIR258, TKI258): structure, development and preclinical and clinical activity. **Future Oncol.**, v. 11, n. 1, p. 39-50, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572783> .

REID, B. C.; WINN, D. M.; MORSE, D. E.; PENDRYS, D. G. Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends, and survival. **Oral Oncol.**, v. 36, n. 5, p. 414-20, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964047> .

RIDLEY, A. J. Rho family proteins: coordinating cell responses. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 12, p. 471-77, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719051> .

RIDLEY, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. **J Microsc.**, v. 251, n. 3, p. 242-49, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23488932/> .

ROCHA, T. A. H.; THOMAZ, E. B. A. F.; DA SILVA, N. C.; DE SOUSA QUEIROZ, R. C.; DE SOUZA, M. R.; BARBOSA, A. C. Q. *et al.* Oral primary care: an analysis of its impact on the incidence and mortality rates of oral cancer. **BMC Cancer.**, v. 17, n. 1, p. 706, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661925/> .

ROSSMAN, K. L.; DER, C. J.; SONDEK, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 6, n. 2, p. 167-80, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688002> .

RUBACK, M. J.; GALBIATTI, A. L.; ARANTES, L. M.; MARUCCI, G. H.; RUSSO, A.; RUIZ-CINTRA, M. T. *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. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802012000500007&script=sci_abstract .

SAADA-BOUZID, E.; MILANO, G.; THARIAT, J. Genomic characterization of head and neck squamous cell carcinoma: Impact and challenges for therapeutic management. **Bull Cancer.**, v. 105, n. 9, p. 820-29, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29937334> .

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. 711-719, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844144> .

SAID, A. K.; LEO, J. C.; FEDELE, S.; PORTER, S. R. Focal epithelial hyperplasia - an update. **J Oral Pathol Med.**, v. 42, n. 6, p. 435-42, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23061874> .

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

SARKER, D.; MOLIFE, R.; EVANS, T. R.; HARDIE, M.; MARRIOTT, C.; BUTZBERGER-ZIMMERLI, P. *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, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18381947> .

SCHLESSINGER, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. **Cell.**, v. 110, n. 6, p. 669-72, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297041> .

SCHMITZ, A. A.; GOVEK, E. E.; BÖTTNER, B.; VAN AELST, L. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. **Exp Cell Res.**, v. 261, n. 1, p. 1-12, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082269> .

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis.**, v. 15, n. 6, p. 388-99, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371401> .

SEIWERT, T. Y.; FAYETTE, J.; CUPISSOL, D.; DEL CAMPO, J. M.; , CLEMENT, P.M.; HITT, R. *et al.* A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol.**, v. 25, n. 9, p. 1813-20, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928832> .

SHARMA, M.; SCHILERO, C.; PEEREBOOM, D. M.; HOBBS, B. P. *et al.* Phase II study of Dovitinib in recurrent glioblastoma. **J Neurooncol.**, v. 144, n. 2, p. 359-68, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31292802/> .

SILVEIRA, I. C.; D M CARNEIRO, A. C.; HISS, L. S.; CREMA, V. O. Anti-Proliferative Role of the Tyrosine Kinase Inhibitors TKI-258 on Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro. **Anticancer Agents Med Chem.**, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32053087> .

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 6, n. 11, p. 1067-74, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578175> .

SPITZ, M. R.; FUEGER, J. J.; GOEPFERT, H.; HONG, W. K.; NEWELL, G.R. *et al.* Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. **Cancer.**, n. 61, n. 1, p. 203-8, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3334949> .

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1477, n. 1-2, p. 299-306, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708865> .

SUBARNBHESAJ, A.; MIYAUCHI, M.; CHANBORA, C.; MIKURIYA, A.; NGUYEN, P.T., FURUSHO, H. *et al.* Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. **PLoS**

One., v. 12, n. 11, p. e0187092, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149180> .

SWEENEY, L.; ZIMMERMANN, T. M.; LIU, Z.; ROSENTHAL, E. L. Evaluation of tyrosine receptor kinases in the interactions of head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts. **Oral Oncol.**, v. 48, n. 12, p. 1242-49, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795534> .

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science.**, v. 281, n. 5381, p. 1312-16, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091> .

TINCANI, A. J.; BRANDALISE, N.; ANDREOLLO, N. A.; LOPES, L. R. *et al.* A importância da endoscopia digestiva alta com solução de lugol no diagnóstico de câncer superficial e displasia em esôfago de doentes com neoplasias de cabeça e pescoço. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.37, p. 107-113. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032000000200007 .

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651787> .

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

WANG, X.; KAY, A.; ANAK, O.; ANGEVIN, E.; ESCUDIER, B; ZHOU, W. *et al.* Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling to assist dosing schedule selection for dovitinib. **J Clin Pharmacol.**, v. 53, n. 1, p. 14-20, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23400739> .

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

WARNAKULASURIYA, S. 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, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403722> .

WESTRA, W. H. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. **Head Neck Pathol.**, v. 3, n. 1, p. 78-81, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807531/> .

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p. 87, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943236> .