

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Isadora Caixeta da Silveira

**EFEITO DO TKI-258 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Uberaba

2018

Isadora Caixeta da Silveira

**EFEITO DO TKI-258 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Coorientadora: Profa. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro

Uberaba

2018

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

S588e Silveira, Isadora Caixeta da
Efeito do TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma
epidermoide oral in vitro / Isadora Caixeta da Silveira. -- 2018.
71 f. : il., fig., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema
Coorientadora: Profa. Me. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro

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

CDU 616.31-002.4

Isadora Caixeta da Silveira

**EFEITO DO TKI-258 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

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

Uberaba, 13 de novembro de 2018

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Nanci Mendes Pinheiro
Faculdade de Talentos Humanos

Uberaba
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adriane e Marco Túlio, por sempre acreditarem no meu sucesso e apoiarem os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema por ter aberto as portas do Laboratório de Histologia e da vida acadêmica e científica para mim. Obrigada pela confiança e ensinamentos que me impulsionaram a continuar firme em direção aos meus objetivos e me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço à minha coorientadora Msc. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro pelos ensinamentos, atenção e motivação para que eu fizesse sempre o meu melhor.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Histologia, Lorraine Stephanie Hiss, Bruna Raphaela Oliveira Silva, Arthur Silva Rezende, Guilherme Henrique Borges, Simone de Sales Costa Moreira Carboni e Ana Cristina Lopes, pela amizade, momentos compartilhados, ensinamentos e palavras amigas que me ajudaram a crescer e aprender.

Agradeço aos meus pais Adriane Caixeta da Silveira e Marco Túlio da Silveira, por tudo que fazem por mim, deixando muitas vezes de realizarem sonhos pessoais para que os meus fossem conquistados. Obrigada pelos ensinamentos, princípios, educação e paciência que contribuíram para me tornar a pessoa que sou hoje. E, ao meu irmão Tales Caixeta da Silveira, pelos momentos de descontração, palavras amigas e paciência.

Agradeço à minha madrinha Maria de Fátima da Conceição Alves e aos meus tios Marcelo Souza da Silveira e Elcia Heleni de Oliveira, que sonharam este sonho comigo desde o início desta caminhada. Sempre se fizeram presentes tanto fisicamente, quanto em orações, vibrações positivas, preocupações e aconselhamentos.

Agradeço ao meu noivo Diego de Brito Ferreira, pelo amor e carinho em todos os momentos que precisei. Obrigada pela paciência nos momentos difíceis, por me acolher nos momentos de tristeza e desânimo e por compartilhar comigo várias felicidades e conquistas.

Agradeço aos meus amigos Daiane dos Santos Rocha, Juliana da Silva Viana, Poliana Pinheiro Teixeira Leão, Ricardo Ferreira Nunes e Waleska Nayara Silva Ribeiro, que apesar da distância, sempre se fazem presentes em minha vida. Obrigada pela torcida e pelo apoio.

Agradeço à gloriosa UFTM, por ter proporcionado experiências e aprendizados únicos. Obrigada às pessoas que ao cruzarem o meu caminho contribuíram para o meu aprendizado e formação, tornando possível a conquista deste tão sonhado objetivo em minha vida.

APOIO FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – FAPEMIG APQ-02333-18
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) – Edital 31/2017 PROPPG-UFTM nº C 08/2018

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

O carcinoma epidermoide oral apresenta altas taxas de mortalidade. Os receptores tirosina quinase, FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, estão amplificados e/ou superexpressos nessa neoplasia e são bloqueados pelo inibidor TKI-258. Esses receptores ativam a PI3K, proteína intracelular que está frequentemente associada à carcinogênese, que pode ser bloqueada pelos inibidores LY294002 e Wortmannin. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com TKI-258 sobre a proliferação celular, e o papel da proteína PI3K nas vias de sinalização inibidas por esse inibidor em carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Através dos ensaios de incorporação do BrdU e imunoexpressão do KI-67, marcadores de proliferação celular, foi determinada a taxa de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral controle e tratadas por 6 h com: TKI-258 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M; LY294002 60 μ M e/ou Wortmannin 2 μ M; TKI 5 μ M somente ou associado ao LY294002 ou ao Wortmannin; e, TKI 5 μ M combinado com LY294002 e Wortmannin. Foi considerada uma significância de $p < 0,05$. O tratamento com TKI-258 reduziu a taxa de proliferação de células SCC-4 que incorporaram BrdU [$F(3,11) = 120,807$, $p < 0,0001$] e imunoexpressaram KI-67 [$F(3,11) = 222,379$, $p < 0,0001$]. O percentual de células proliferativas também foi menor após o tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e/ou Wortmannin, incorporação do BrdU [$F(3,11) = 477,578$, $p < 0,0001$] e imunoexpressão do KI-67 [$F(3,11) = 421,762$, $p < 0,0001$]. A associação do TKI-258 5 μ M com LY294002 e/ou Wortmannin diminuiu ainda mais a taxa de proliferação na incorporação do BrdU [$F(3,11) = 252,324$, $p < 0,0001$] e imunoexpressão do KI-67 [$F(3,11) = 295,346$, $p < 0,0001$]. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o TKI-258 apresenta um efeito antiproliferativo em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral e esse processo possivelmente pode ser regulado pelos receptores tirosina quinase bloqueados por esse inibidor, por meio de vias dependentes e independentes de PI3K.

Palavras-chave: carcinoma epidermoide oral; inibidores tirosina quinase; PI3K; proliferação celular

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma presents high mortality rates. Tyrosine kinase receptors, FGFRs, PDGFRs and, VEGFRs, are amplified and/or overexpressed in this neoplasm and are blocked by the inhibitor TKI-258. These receptors activate PI3K, an intracellular protein that is often associated with carcinogenesis, that can be blocked by inhibitors LY294002 and Wortmannin. The aim of this study was to evaluate the effect of TKI-258 treatment on cell proliferation, and the role of PI3K protein in signaling pathways inhibited by this inhibitor in oral squamous cell carcinoma *in vitro*. Through the BrdU incorporation assays and KI-67 immunoexpression, cell proliferation markers, SCC-4 cells of oral squamous cell carcinoma were quantified and treated for 6 h with TKI-258 (1, 5 and 10 μ M); LY294002 60 μ M (LY) and/or Wortmannin 2 μ M (WTN); TKI-258 5 μ M only or associated with LY or WTN; and, 5 μ M TKI-258 combined with LY and WTN. A significance of $p < 0.05$ was considered. Treatment with TKI-258 reduced the proliferation rate in SCC-4 cells incorporated BrdU [$F(3,11) = 120.807$, $p < 0.0001$] and immunoexpressed KI-67 [$F(3,11) = 222.379$, $p < 0.0001$]. The reduction percentage was also lower after treatment with PI3K, LY and/or WTN inhibitors, incorporation of BrdU [$F(3,11) = 477.578$, $p < 0.0001$] and KI-67 [$F(3,11) = 421.762$, $p < 0.0001$]. And, the association of 5 μ M TKI-258 with LY and/or WTN further decreased the proliferation rate in BrdU incorporation [$F(3,11) = 252.324$, $p < 0.0001$] and KI-67 immunoexpression [$F(3,11) = 295.346$, $p < 0.0001$]. The results obtained in this study demonstrated that TKI-258 exhibits an antiproliferative effect on SCC-4 cells of OSCC and this process may possibly be regulated by the tyrosine kinase receptors blocked by that inhibitor, by means of PI3K dependent and independent pathways.

Keyword: cell proliferation; oral squamous cell carcinoma; PI3K; tyrosine kinase inhibitors

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Classificação histológica do carcinoma epidermoide oral.....	26
Figura 2. Mecanismos de ação dos inibidores tirosina quinase em células tumorais.....	28
Figura 3. Via de sinalização PI3K-AKT-mTOR.....	31
Figura 4. Visão geral simplificada da inibição da PI3K com o LY294002 e o Wortmannin.....	31
Figura 5. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	43
Figura 6. Efeito do tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e/ou Wortmannin, sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	45
Figura 7. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 e/ou com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

BrdU - *5-bromo-2'-deoxyuridine*

BSA - *Albumin solution from bovine serum*

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

DMEM F-12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO - *Dimethylsulfoxide*

DPBS - *Dulbecco's salina tamponada fosfatada*

FGFs - Fatores de crescimento de fibroblastos

FGFRs - Receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos

FGFR1 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1

FGFR2 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2

FGFR3 - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3

FGFR4 - Receptor do fator de crescimento de fibroblasto 4

GPCRs - Receptores acoplados à proteína G

mTORC - Proteína alvo de rapamicina em mamíferos

PDGFs - Fatores de crescimento derivados de plaquetas

PDGF A - Fator de crescimento derivado de plaquetas A

PDGF B - Fator de crescimento derivado de plaquetas B

PDGF C - Fator de crescimento derivado de plaquetas C

PDGF D - Fator de crescimento derivado de plaquetas D

PDGFRs - Receptores dos fatores de crescimento derivados de plaquetas

PDGFR α - Receptor do fator de crescimento derivados de plaquetas α

PDGFR β - Receptor do fator de crescimento derivados de plaquetas β

PI3K - Proteína fosfoinositídeo 3-quinase

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bi-fosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato

PLK1 - Quinase tipo polo 1

PTEN - Fosfatase e homólogo de tensinas

RTKs - Receptores tirosina quinases

SFB - Soro fetal bovino

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

VEGFs - Fatores de crescimento endoteliais vasculares

VEGFA - Fator de crescimento endotelial vascular A

VEGFB - Fator de crescimento endotelial vascular B

VEGFC - Fator de crescimento endotelial vascular C

VEGFD - Fator de crescimento endotelial vascular D

VEGFE - Fator de crescimento vascular endotelial E

VEGFRs- Receptores dos fatores de crescimento endoteliais vasculares

VEGFR 1 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1

VEGFR 2 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

VEGFR 3 - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3

Vps34- Proteína vacuolar 34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	41
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Mucosa oral.....	23
2.2. Neoplasia	24
2.3. Carcinoma epidermoide oral.....	25
2.4. TKI-258.....	27
2.5. PI3K	30
3. HIPÓTESE	32
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo geral	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1. Casuística	37
5.2. Reagentes.....	37
5.3. Cultura celular.....	37
5.4. Ensaios de proliferação celular	38
5.5. Reações de imunofluorescência	39
5.6. Análise morfométrica.....	39
5.7. Análise estatística.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	42
6.2. Efeito do tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e/ou Wortmannin, sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	44
6.3. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 e/ou com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral <i>in vitro</i>	46
7. DISCUSSÃO.....	48
8. CONCLUSÃO	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	69
ANEXO I.....	70

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide oral se origina no epitélio de revestimento da mucosa oral e é responsável pela maioria das lesões malignas da região de cabeça e pescoço (THOMSON, 2018). Mundialmente, ele é considerado o sexto tipo de câncer mais comum e está associado a 1% a 2% das mortes por câncer (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2016).

Na carcinogênese as células neoplásicas adquirem habilidades como, por exemplo, a capacidade de crescimento ilimitado e autônomo (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Este comportamento desregulado pode ser ocasionado pela amplificação e/ou superexpressão de receptores tirosina quinase que sofreram mutações (HU *et al.*, 2015). Quando um ligante como os fatores de crescimento é reconhecido pelo domínio extracelular ou N-terminal do receptor, ocorre sua dimerização e autofosforilação do domínio intracelular ou C-terminal que possui atividade tirosina quinase. Desta forma, a tirosina fosforilada se torna um local de ativação de proteínas intracelulares, dentre elas a proteína fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), que propaga os sinais até o núcleo (ARORA e SCHOLAR, 2005). Sendo assim, o reconhecimento dos mecanismos envolvidos na desregulação desses receptores pode induzir a terapêutica com os inibidores tirosina quinase (GOTINK e VERHEUL, 2010).

Os inibidores tirosina quinase são pequenas moléculas hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana celular e competirem pelo sítio da adenosina trifosfato (ATP) no domínio intracelular do receptor tirosina quinase. Logo, não ocorre a autofosforilação e ativação desse receptor e conseqüentemente a transdução do sinal (GOTINK e VERHEUL, 2010).

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

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a regulação da proliferação em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral moderadamente diferenciado, e determinar se há o envolvimento da proteína PI3K na via de sinalização inibida pelo TKI-258, utilizando os ensaios de incorporação do BrdU e imunexpressão do KI-67.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mucosa oral

A cavidade oral pertence ao sistema digestório e é o local de entrada dos alimentos no organismo. Ela contribui com a ingestão, fragmentação, umidificação e digestão dos alimentos. A cavidade oral também está relacionada com a fala, expressão facial, percepção sensitiva e respiração. Os lábios, os dentes, a língua, a mucosa oral e as glândulas salivares estão envolvidos nesses processos (KATCHBURIAN e ARANA, 2012).

Anatomicamente, a cavidade oral é dividida em dois compartimentos: o vestíbulo da boca e a cavidade própria da boca. O vestíbulo da boca é o espaço entre os dentes e a gengiva, ao passo que a cavidade própria da boca se localiza entre os arcos dentais superiores e inferiores. A cavidade oral é delimitada anteriormente pelos lábios, superiormente pelo palato duro e palato mole, inferiormente pelas papilas circunvaladas da língua e posteriormente pela orofaringe. Todas as regiões da cavidade oral são revestidas pela mucosa oral (MADANI *et al.*, 2014).

A mucosa oral é constituída por epitélio estratificado pavimentoso, formado pelos queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckel. Ela apresenta um papel importante na cavidade oral, que é o de proteger os tecidos mais profundos, além disso, também participa da síntese e secreção de substâncias e atua como órgão sensorial (NANCI, 2012).

O epitélio da mucosa oral pode sofrer alterações de acordo com a região da cavidade oral. Nas áreas mais expostas à mastigação o epitélio é queratinizado, visto que a camada córnea é fundamental para dissipar as forças de cisalhamento, já nas regiões onde é necessária uma maior flexibilidade, ele é não queratinizado. Desta forma, de acordo com características histológicas e localização, a mucosa oral é classificada em três tipos: mucosa oral de revestimento, constituída por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado; mucosa oral mastigatória, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado; e, mucosa oral especializada, que possui epitélio orto e paraqueratinizado (NANCI, 2012).

O epitélio da mucosa oral pode ser acometido por algumas desordens malignas, as principais são: leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e líquen plano. Essas alterações aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias orais como, por exemplo, o carcinoma epidermoide oral (GANESH *et al.*, 2018).

2.2. Neoplasia

A neoplasia é uma massa de tecido atípico formado a partir de um estímulo, que faz com que as células percam sua capacidade de controlar o ciclo celular e passem a se multiplicar de maneira autônoma e ilimitada, e mesmo com a interrupção do estímulo esse crescimento não cessa (KUMAR *et al.*, 2010). Para tanto, as células neoplásicas adquirem algumas habilidades, como: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, potencial de duplicação ilimitado, capacidade de evadir da apoptose, potencial aumentado de angiogênese e capacidade de invadir tecidos e gerar metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os mecanismos relacionados ao surgimento e progressão tumoral são muito variados, porém a maioria das alterações acontece em receptores e proteínas intracelulares que participam de vias de sinalização envolvidas em inúmeros processos celulares, como, por exemplo, a proliferação celular. Para tal, ocorrem mutações que dão origem aos oncogenes, genes que aumentam a ativação de vias de sinalização, além disso, há também a inativação de genes supressores de tumor, que controlam negativamente a atividade de várias proteínas envolvidas na regulação da homeostase (SEVER e BRUGGE, 2015).

As neoplasias podem ser classificadas em benignas ou malignas de acordo com as características morfológicas e os efeitos que causam no organismo. As neoplasias benignas apresentam células bem diferenciadas, com pouca atipia e baixa taxa de divisão, além disso, são encapsuladas e possuem crescimento local e não disseminado por metástases, sendo assim, estão associadas a um prognóstico melhor. Por outro lado, as neoplasias malignas, coletivamente denominadas de cânceres, têm células pouco diferenciadas, com crescimento rápido e infiltrativo, capacidade de invadir tecidos adjacentes e gerar metástases, e estão relacionadas com um prognóstico pior (KUMAR *et al.*, 2010).

As neoplasias malignas que se originam nas células epiteliais são denominadas carcinomas, mais especificamente aquelas que acometem o tecido epitelial estratificado escamoso são intituladas carcinomas de células escamosas. Aproximadamente 80% dos cânceres humanos são carcinomas, provavelmente, devido à alta taxa de proliferação do tecido epitelial em adultos e/ou porque o tecido epitelial fica muito exposto aos danos causados por agentes físicos e químicos (LO *et al.*, 2012).

2.3. Carcinoma epidermoide oral

O carcinoma epidermoide oral é uma neoplasia que se origina nas células escamosas do epitélio de revestimento da mucosa oral e é responsável pela maioria das lesões malignas que acomete a região da cabeça e pescoço, representando mais de 90% dos tumores da cavidade oral (THOMSON, 2018). A língua é o sítio mais frequentemente acometido por essa neoplasia, seguida pelo palato mole e assoalho da boca (DE MORAIS *et al.*, 2017). Mundialmente, é considerado o sexto tipo de câncer mais comum correspondendo a aproximadamente 6% dos casos, e está associado a altas taxas de mortalidade (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2016). Anualmente são observadas 300.000 novas ocorrências dessa neoplasia, e surpreendentemente há um aumento expressivo na quantidade de jovens acometidos (THOMSON, 2018). No Brasil, para os anos de 2018 e 2019, há uma estimativa do aparecimento de 11.200 novos casos em homens e 3.500 em mulheres (INCA, 2017).

O surgimento do carcinoma epidermoide oral é multifatorial, o uso do tabaco, sua associação com o álcool, a infecção pelo papiloma vírus humano, a imunossupressão, os fatores genéticos e ambientais são algumas das causas (PORTER *et al.*, 2018). A maior incidência ocorre em homens (MORO *et al.*, 2018), possivelmente, por estarem mais expostos aos principais fatores de riscos que são o tabaco e o álcool (RUBACK *et al.*, 2012). Outro fator determinante para o desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral é a idade, visto que essa neoplasia é mais frequente em indivíduos a partir dos 50 anos (TANDON *et al.*, 2017; MORO *et al.*, 2018). A maior incidência é observada entre a quinta e sexta década de vida (AL-JABER *et al.*, 2016). Além disso, a idade também desempenha um papel crucial na sobrevida, uma vez que pacientes mais jovens apresentam uma melhor taxa de sobrevivência em relação aos pacientes mais velhos (MAHMOOD *et al.*, 2018).

O grau de queratinização, o pleomorfismo celular e nuclear e a atividade mitótica são os critérios utilizados para classificar, microscopicamente, o carcinoma epidermoide oral em: bem diferenciado, aquele semelhante ao epitélio escamoso normal, que apresenta abundante formação de pérolas de queratina; moderadamente diferenciado, contém nítido pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, incluindo mitoses anormais e pouca queratinização; e, pouco diferenciado, possui predomínio de células indiferenciadas com numerosas mitoses atípicas e pouca queratinização (PEREIRA *et al.*, 2007) (Figura 1).

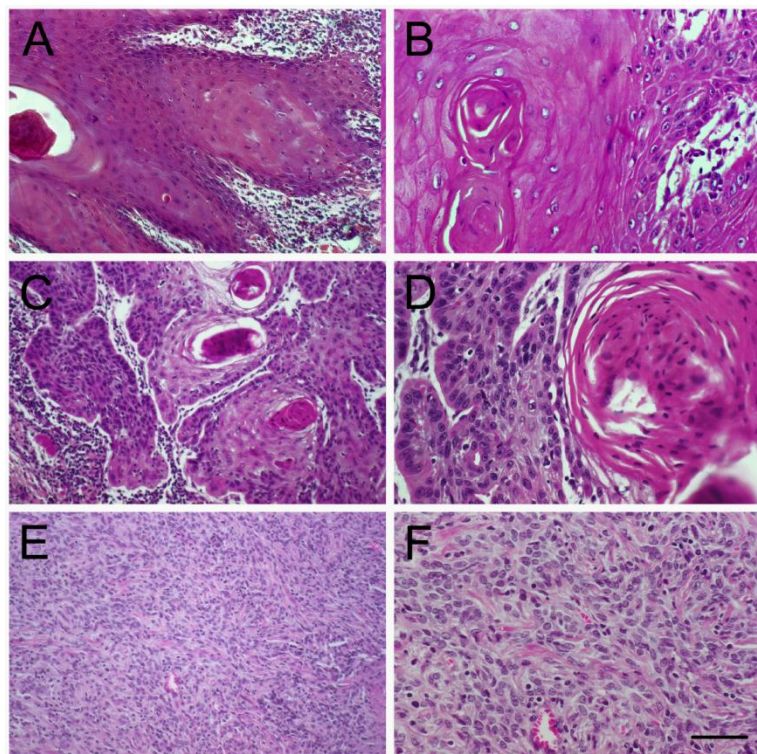


Figura 1. Classificação histológica do carcinoma epidermoide oral. Coloração de hematoxilina e eosina. (A, B) Bem diferenciado. (C, D) Moderadamente diferenciado. (E,F) Pouco diferenciado. Fonte: CREMA, 2001.

A classificação histológica do carcinoma epidermoide oral é muito importante para direcionar o tratamento do paciente, uma vez que quanto maior a diferenciação do tumor, melhor o prognóstico, tumores pouco diferenciados estão associados com uma menor sobrevida (PADMA *et al.*, 2017). A fim de determinar com mais precisão o prognóstico e o tratamento correto para o paciente é fundamental que também sejam quantificados alguns parâmetros clínicos do carcinoma epidermoide oral, como a agressividade clínica, a extensão e a disseminação. Para isso, devem ser avaliados a extensão do tumor primário, o envolvimento de linfonodos locais e a ocorrência ou não de metástases a distância (KADEMANI, 2007).

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

2.4. TKI-258

Para a manutenção da homeostase ocorrem inúmeras reações celulares que modulam as funções fisiológicas, uma delas é a transferência de um grupo fosfato para uma determinada proteína, essa reação é mediada por enzimas denominadas quinases. As tirosinas quinase são aquelas enzimas que fazem o deslocamento de um fosfato da molécula de ATP para um resíduo de tirosina, e algumas delas estão associadas à indução da carcinogênese (BHULLAR *et al.*, 2018).

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

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

Os receptores tirosina quinase regulam vias de sinalização envolvidas em processos celulares importantes como proliferação e migração celular, sobrevivência e angiogênese. Porém, esses receptores podem sofrer mutações e ficarem desregulados e assim desencadear doenças como o câncer, nas quais geralmente ocorre a amplificação e/ou superexpressão desses receptores multados (HU *et al.*, 2015).

Os receptores tirosina quinase estão amplificados em carcinoma epidermoide oral (OIKAWA *et al.*, 2017) e superexpressos em carcinoma de cabeça e pescoço (ELFERINK e RESTO, 2011). Sendo assim, o reconhecimento dos mecanismos envolvidos na desregulação desses receptores conduziu a terapêutica com os inibidores tirosina quinase (GOTINK e VERHEUL, 2010).

Os inibidores tirosina quinase são pequenas moléculas hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana celular e competirem pelo sítio do ATP no domínio intracelular ou C-terminal dos receptores tirosina quinase (IMAI e TAKAOKA, 2006). Eles agem diretamente no local de ligação do ATP por meio de pontes de hidrogênio e indiretamente através de um sítio alostérico impossibilitando a associação do ATP. Conseqüentemente, a tirosina quinase não consegue transferir fosfato para o resíduo tirosina e não ocorre a autofosforilação e ativação do receptor (GOTINK e VERHEUL, 2010) (Figura 2).

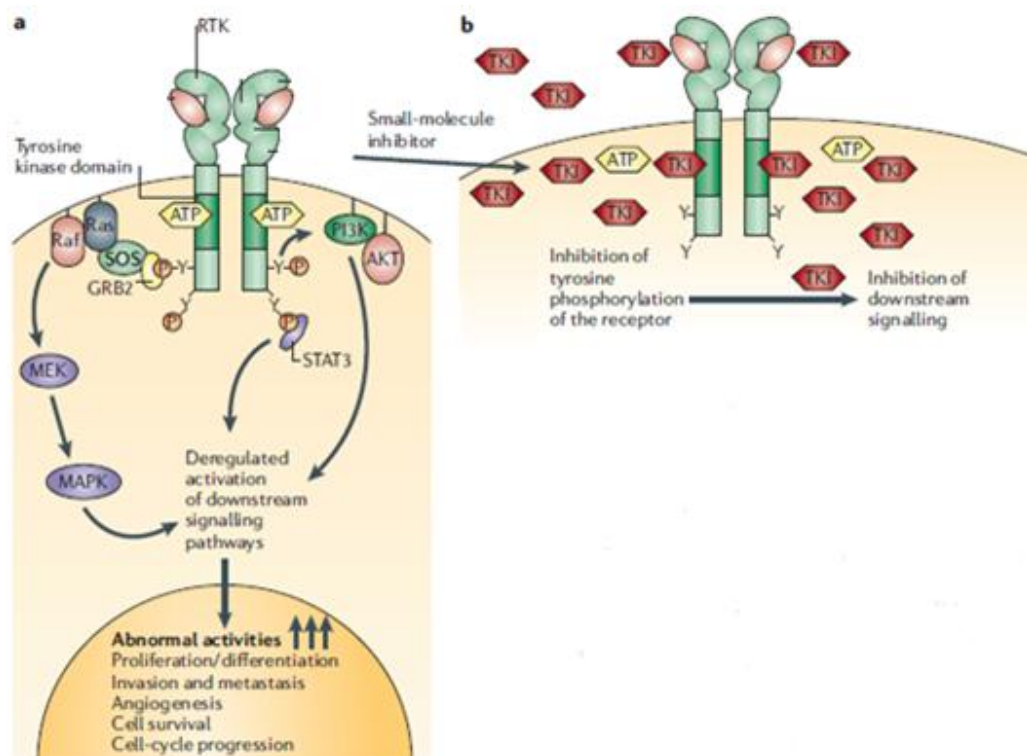


Figura 2. Mecanismos de ação dos inibidores tirosina quinase em células tumorais. a) Após a ativação do receptor tirosina quinase (RKT) pela ligação do ligante no domínio extracelular ou N-terminal, as vias de sinalização intracelulares Ras-Raf-MEK-MAPK e PI3K-AKT são ativadas, assim como as proteínas STAT1, STAT3 e STAT5. Os efeitos coordenados destas vias de sinalização intracelulares levam à indução de respostas celulares incluindo proliferação, diferenciação, motilidade, adesão e angiogênese. A desregulação da sinalização mediada pelos RKTs em células tumorais leva à proliferação, invasão, metástases e neovascularização exacerbadas. b) Inibidores tirosina quinase (TKIs) atuam como análogos do ATP e inibem a sinalização do RKT por meio da competição pela ligação do ATP no domínio intracelular e através de um sítio alostérico impossibilitando a associação do ATP. Como resultado, a ativação de várias vias de sinalização é bloqueada. Cada TKI apresenta uma seletividade diferente para RTK, e alguns são multi-seletivos, o que pode fornecer uma vantagem terapêutica. Fonte: Adaptado de (IMAI e TAKAOKA, 2006).

O TKI-258 é um inibidor tirosina quinase que possui atividade inibitória sobre os FGFRs, PDGFRs e VEGFRs (RENHOWE *et al.*, 2009). Os dados *in vivo* e *in vitro* indicam que o TKI-258 bloqueou a sinalização dos FGFRs, PDGFRs, VEGFRs em câncer urotelial (QING *et al.*, 2009), câncer de mama avançado (ANDRÉ *et al.*, 2013) e câncer pancreático (ZHANG *et al.*, 2014), através do comprometimento do crescimento tumoral (HÄNZE *et al.*, 2013).

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

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

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

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

2.5. PI3K

A PI3K pertence a uma família de quinases lipídicas intracelulares que integram vias de sinalização envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos como, por exemplo, a proliferação celular (THORPE *et al.*, 2015). Nos mamíferos, são conhecidas três diferentes classes da PI3K: I, II e III. O desenvolvimento do câncer está mais associado à classe I, que possui duas subclasses denominadas A e B, as quais apresentam uma subunidade regulatória e outra catalítica, sendo que a subunidade catalítica da classe IA apresenta as isoformas p110 α , β e δ , e da classe IB, p110 γ . A classe II é constituída por três enzimas diferentes, PI3K-C2 α , PI3K-C2 β e PI3K-C2 γ , e sua função ainda é pouco conhecida. Já a classe III possui apenas uma proteína expressa em eucariontes que é a proteína vacuolar 34 (Vps34) (MARTINI *et al.*, 2014).

A ativação da PI3K classe I ocorre através de receptores tirosina quinase localizados na membrana plasmática (classe IA) ou receptores acoplados a proteína G (classe IB). A autofosforilação desses receptores desencadeia a aproximação e ligação da PI3K às tirosinas fosforiladas resultando na ativação da subunidade catalítica, dessa forma a PI3K é capaz de converter o fosfatidilinositol 4,5-bi-fosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato (PIP3), que atua no recrutamento e ativação da AKT, que ativa a proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTORC), resultando em respostas celulares (MARTINI *et al.*, 2014) (Figura 3).

Esta via de sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR possui um papel importante no controle do ciclo celular (FRUMAN e ROMMEL, 2014) e está frequentemente alterada no câncer, o que a torna um potencial alvo para o desenvolvimento de terapias antitumorais direcionadas (FAES e DORMOND, 2015). Os inibidores da PI3K mais conhecidos e utilizados são o LY294002 e o Wortmannin (KONG e YAMORI, 2008). O LY294002 é um produto sintético derivado da quercetina, membro dos flavonoides, que inibe reversivelmente por competição o sítio do ATP em enzimas da família da PI3K classe I. Por outro lado, o Wortmannin é um metabólito produzido pelo fungo *Penicillium wortmannii*, que inibe irreversivelmente a PI3K e outras proteínas correlacionadas a ela, por meio de ligação covalente (KNIGHT, 2010) (Figura 4).

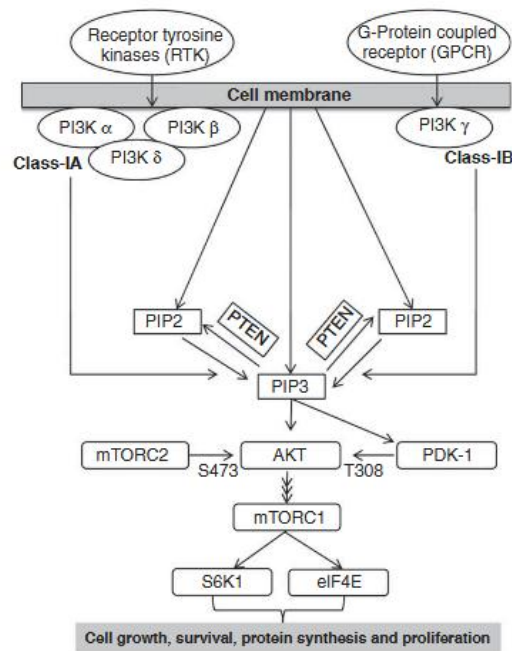


Figura 3. Via de sinalização PI3K-AKT-mTOR. As isoformas da classe IA e IB da PI3K são ativadas pelos receptores de tirosina-quinase (RTKs) e pelos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), respectivamente. A PI3K ativada interage com a membrana lipídica e fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bi-fosfato (PIP2), produzindo o fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato (PIP3), constituindo um sítio de ancoragem para a proteínas PDK1 e AKT. Essas proteínas são translocadas para a membrana, em que AKT fosforilada por PDK1 dentro do circuito de ativação em Thr308 e ativação completa foi conseguida por fosforilação da Serina 473 pelo mTORC2. O PIP3 ativado sinaliza a cascata intracelular através da AKT, que promove o crescimento celular, sobrevivência, síntese de proteínas e proliferação. O PTEN, um supressor de tumor (fosfatase e proteína homóloga da tensina), desfosforila o PIP3 a PIP2 regulando a geração do PIP3. Fonte: (YANAMANDRA *et al.*, 2015).

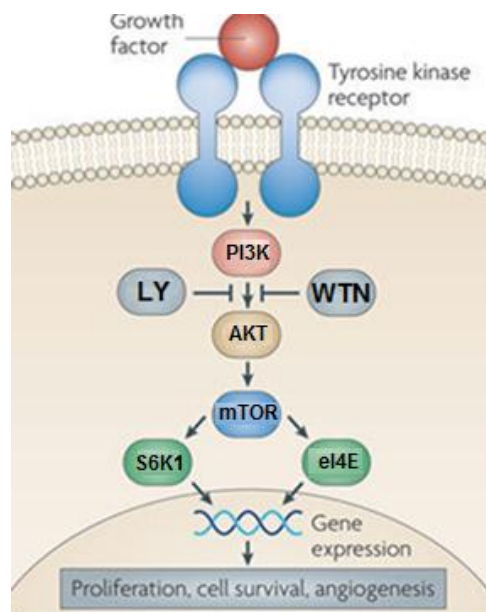


Figura 4. Visão geral simplificada da inibição da PI3K com o LY294002 e o Wortmannin. O LY294002 (LY) inibe reversivelmente a PI3K por competição no sítio do ATP e o Wortmannin (WTN) inibe irreversivelmente a PI3K por meio de ligação covalente. Fonte: Adaptado de (HOLMES, 2011).

3. HIPÓTESE

O inibidor tirosina quinase TKI-258 inibe a taxa de proliferação celular, envolvendo a via da PI3K, em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar a taxa de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral controle e tratadas com o TKI-258, inibidor dos receptores tirosina quinase: FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, em três concentrações diferentes (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M), através da incorporação do BrdU e imunoexpressão do KI-67, marcadores de proliferação celular.

- Avaliar o envolvimento da proteína PI3K na regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral controle e tratadas com seus inibidores, LY294002 e Wortmannin, por meio da incorporação do BrdU e imunoexpressão do KI-67, marcadores de proliferação celular.

- Verificar se a via de sinalização inibida pelo TKI-258 envolve a proteína PI3K na regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, comparando a taxa de proliferação de células tratadas com TKI-258 apenas e associado ao LY294002 e/ou Wortmannin, através da incorporação do BrdU e imunoexpressão do KI-67, marcadores de proliferação celular.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Casuística

Por utilizar células comercialmente disponíveis, este estudo foi dispensado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Anexo 1). Foram empregadas células da linhagem SCC-4 de carcinoma epidermoide oral humano de língua moderadamente diferenciado da *American Type Culture Collection* (ATCC®), obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

5.2. Reagentes

O inibidor tirosina quinase TKI-258 foi obtido da Selleck Chemicals (Houston, TX, USA), já os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin, foram obtidos da Sigma-Aldrich, o *5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU), o *4',6-diamidino-2-fenilindole* (DAPI), o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* F12 (DMEM-F12), o *dimethylsulfoxide* (DMSO), o *bovine serum albumin* (BSA), o Triton X-100 0,2%, o paraformaldeído, os antibióticos penicilina e estreptomicina, e os sais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A hidrocortisona e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Ariston (São Paulo, SP) e da Cultilab (Campinas, SP), respectivamente. O anticorpo primário anti-KI-67 foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e o anticorpo primário anti-BrdU da Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). O anticorpo secundário Alexa 488 foi obtido da Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

5.3. Cultura celular

As células SCC-4 foram cultivadas em garrafas T75 com meio DMEM-F12, contendo 100 U/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 400 ng/mL de hidrocortisona e SFB 10% em incubadora úmida com atmosfera 5% CO₂/95% ar a 37°C. Os experimentos foram realizados quando as células atingiram a semi-confluência.

5.4. Ensaio de proliferação celular

Para avaliar o efeito do inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a regulação da proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*, foram realizados os ensaios de incorporação do BrdU e imunexpressão do KI-67. Foi feita a comparação da taxa de proliferação de células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 em três concentrações: 1 μM , 5 μM e 10 μM , que incorporaram o BrdU e imunexpressaram o KI-67.

Além disso, foi utilizado o percentual de células SCC-4 BrdU e KI-67 positivas controle e tratadas com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin, para avaliar o envolvimento dessa proteína na regulação da proliferação celular. Para essa finalidade as células foram tratadas com LY294002 60 μM , Wortmannin 2 μM , e LY294002 60 μM combinado com Wortmannin 2 μM .

E, para verificar se a via de sinalização inibida pelo TKI-258 envolve a proteína PI3K na regulação da proliferação de células SCC-4, foi feita a comparação da taxa de células positivas para os marcadores de proliferação celular, BrdU e KI-67, tratadas com apenas TKI-258 5 μM e associado ao LY294002 60 μM e/ou Wortmannin 2 μM .

Para os ensaios de proliferação celular, aproximadamente $0,8 \times 10^4$ células por poço foram cultivadas em placas com seis poços, contendo lamínulas de vidro em incubadora úmida com atmosfera 5% CO_2 /95% ar a 37°C *overnight*. No ensaio de incorporação do BrdU, foi adicionado meio com/sem tratamento e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BrdU nos poços de todas as células. Já no ensaio de imunexpressão do KI-67 foi adicionado apenas meio com/sem tratamento. Foram avaliados os seguintes grupos: controle (C); TKI-258 1 μM (TKI 1); TKI-258 5 μM (TKI 5); TKI-258 10 μM (TKI 10); controle veículo (C_w - DMSO no volume de LY294002 60 μM); LY294002 60 μM (LY); Wortmannin 2 μM (WTN); LY294002 60 μM combinado com Wortmannin 2 μM (LY+WTN); TKI-258 5 μM associado ao LY294002 60 μM (TKI 5+LY); TKI-258 5 μM combinado com Wortmannin 2 μM (TKI 5+WTN); e, TKI-258 5 μM associado ao LY294002 60 μM e ao Wortmannin 2 μM (TKI 5+LY+WTN). As células SCC-4 controle e tratadas foram incubadas por 6 h. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais.

5.5. Reações de imunofluorescência

Após 6 h de tratamento, as células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral foram lavadas com DPBS, com cálcio e magnésio, duas vezes de 5 min. Em seguida, foi realizada a fixação com paraformaldeído 4% por 1 h. As células foram novamente lavadas com DPBS duas vezes de 5 min. No ensaio de incorporação do BrdU, foi feita a incubação com HCl 1 N a 37°C por 1 h. Tanto no ensaio de incorporação do BrdU, quanto no ensaio de imunoexpressão do KI-67, após a lavagem com DPBS, foi feita a permeabilização com Triton X-100 0,2% por 5 min. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com DPBS/BSA 3% por 20 min. Em seguida, foi realizada a incubação em câmara úmida e temperatura ambiente com anticorpo primário anti-BrdU e anti-KI-67 na diluição 1:50 em DPBS/BSA 0,1% *overnight*. Após a lavagem com DPBS duas vezes de 10 min, as células foram incubadas em ambiente escuro, câmara úmida e temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-mouse Alexa 488 diluído 1:1000 em DPBS/BSA 0,1% por 2 h. Após duas lavagens com DPBS de 10 min, a evidenciação dos núcleos foi feita com o fluoróforo DAPI diluído 1:500 em DPBS por 15 min. Finalmente, após lavagem com DPBS duas vezes de 5 min, as lâminas foram montadas com glicerol-carbonato.

5.6. Análise morfométrica

Foram avaliados dez campos aleatórios de cada lâmina das células controle e tratadas em um microscópio de fluorescência. Os núcleos de todas as células marcadas com DAPI e das células positivas para os marcadores de proliferação celular, BrdU e KI-67, foram quantificados. O percentual de células positivas foi calculado utilizando o programa Excel®.

5.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados com o programa IBM SPSS 20.0® (San Francisco, CA, USA) e os gráficos confeccionados com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA). As variáveis foram testadas para verificar se a distribuição foi normal através do teste de análise de variância. Como a distribuição foi normal, foram utilizados os testes paramétricos, teste de análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, para a comparação múltipla entre os grupos estudados. Os resultados foram expressos em média mais ou menos erro. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*

Houve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral BrdU positivas entre todos os grupos estudados [$F(3,11) = 120,807$, $p < 0,0001$]. A taxa de células que incorporam o BrdU foi significativamente menor nos grupos tratados com TKI 1 ($38,64 \pm 1,29$, $p < 0,0001$), TKI 5 ($33,67 \pm 1,63$, $p < 0,0001$) e TKI 10 ($28,82 \pm 0,75$, $p < 0,0001$), em relação ao grupo C ($53,41 \pm 2,51$). O efeito antiproliferativo do TKI-258 foi dependente da dose, considerando que houve diferenças estatísticas entre o percentual de células proliferativas tratadas com: 1 μM vs 5 μM ($p < 0,05$), 1 μM vs 10 μM ($p < 0,0001$) e 5 μM vs 10 μM ($p < 0,05$) (Figura 5A), indicando que ocorreu 27,64%, 36,94% e 46,04% de redução, respectivamente.

A imunoexpressão do KI-67 em células SCC-4 controle e tratadas com TKI-258 demonstrou resultados semelhantes aos observados no ensaio de incorporação do BrdU. Foi vista uma diferença estatisticamente significativa da taxa de células SCC-4 KI-67 positivas entre todos os grupos estudados [$F(3,11) = 222,379$, $p < 0,0001$]. Quando comparado com o percentual de células do grupo C ($45,85 \pm 2,26$) que imunoexpressaram KI-67, o percentual de células proliferativas foi significativamente menor nas três concentrações de TKI-258: TKI 1 ($35,58 \pm 0,57$, $p < 0,0001$), TKI 5 ($27,62 \pm 0,48$, $p < 0,0001$) e TKI 10 ($22,04 \pm 0,25$, $p < 0,0001$). O TKI-258 inibiu a proliferação celular de maneira dose dependente, uma vez que houve diferenças estatísticas entre a taxa de células proliferativas tratadas com: 1 μM vs 5 μM ($p < 0,0001$), 1 μM vs 10 μM ($p < 0,0001$) e 5 μM vs 10 μM ($p < 0,001$) (Figura 5B), indicando que ocorreu 22,40%, 39,75% e 51,91% de redução, respectivamente.

Desta forma, o bloqueio dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, com o inibidor tirosina quinase TKI-258, reduziu o percentual de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral proliferativas em todos os grupos tratados. E, à medida que as concentrações do inibidor aumentaram a taxa de proliferação celular diminuiu.

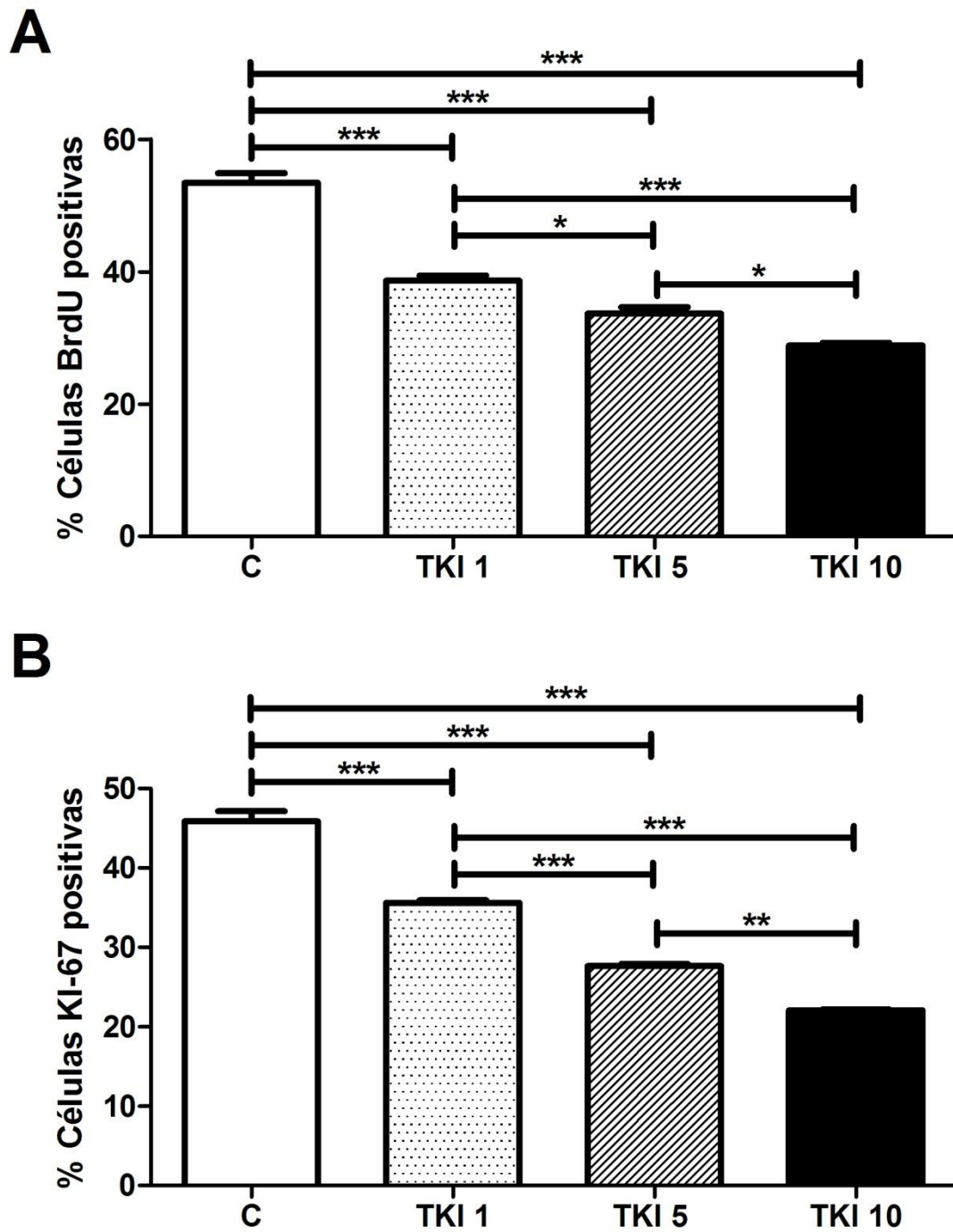


Figura 5. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Percentual de células controle e tratadas com TKI-258 (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) durante 6 h. (A) Percentual de células BrdU positivas e (B) Percentual de células KI-67 positivas. ANOVA e pós-teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

6.2. Efeito do tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e/ou Wortmannin, sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*

Houve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral BrdU positivas entre todos os grupos estudados [F(3,11) = 477,578, $p < 0,0001$]. O percentual de células proliferativas foi significativamente menor nos grupos tratados: LY ($38,46 \pm 1,66$, $p < 0,0001$), WTN ($22,36 \pm 0,80$, $p < 0,0001$) e LY+WTN ($14,31 \pm 0,59$, $p < 0,0001$), quando comparados ao grupo C_{vv} ($49,01 \pm 1,53$). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa da porcentagem de células proliferativas do grupo tratado com LY quando comparado com WTN ($p < 0,0001$) e, com LY+WTN ($p < 0,0001$); houve uma redução significativa entre o percentual de células proliferativas tratadas com LY+WTN em comparação com as tratadas somente com WTN ($p < 0,0001$) (Figura 6A). Foi observada uma redução de 21,52% no grupo LY; 54,36% no grupo WTN; e 70,78% no grupo LY+WTN.

Confirmando os resultados encontrados no ensaio de incorporação do BrdU, no ensaio de imunexpressão do KI-67 também houve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 KI-67 positivas entre todos os grupos estudados [F(3,11) = 421,762, $p < 0,0001$]. Quando comparado com o percentual de células do grupo C_{vv} ($48,11 \pm 1,68$) que imunexpressaram KI-67, o percentual foi significativamente menor nos grupos tratados: LY ($36,18 \pm 1,56$, $p < 0,0001$), WTN ($23,89 \pm 1,23$, $p < 0,0001$) e LY+WTN ($11,87 \pm 0,40$, $p < 0,0001$). Foi vista uma diferença estatisticamente significativa da porcentagem de células proliferativas do grupo tratado com LY quando comparado com WTN ($p < 0,0001$) e, com LY+WTN ($p < 0,0001$); houve uma redução significativa entre a taxa de células proliferativas tratadas com LY+WTN em comparação com as tratadas somente com WTN ($p < 0,0001$) (Figura 6B). Foi vista uma redução de 24,79% no grupo LY; 50,33% no grupo WTN; e 75,31% no grupo LY+WTN.

Desta maneira, a inibição da proteína PI3K com os inibidores LY294002 e Wortmannin, reduziu o percentual de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral em todos os grupos tratados com um ou mais inibidor da PI3K. E, a associação entre os dois inibidores diminuiu mais significativamente a taxa de proliferação celular.

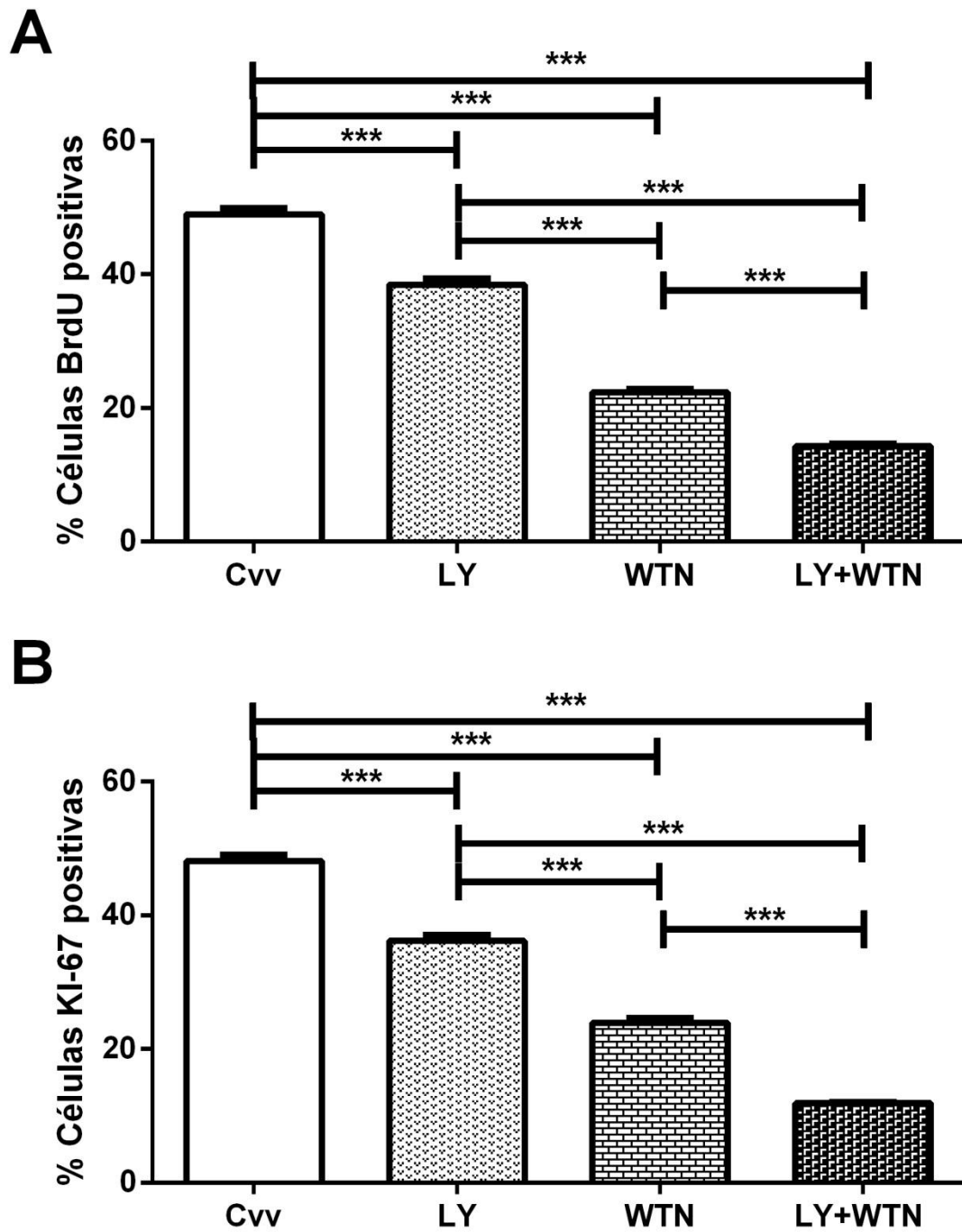


Figura 6. Efeito do tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e/ou Wortmannin, sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Percentual de células controle e tratadas com LY294002 60 μ M, Wortmannin 2 μ M e LY294002 60 μ M associado ao Wortmannin 2 μ M, durante 6 h. (A) Percentual de células BrdU positivas e (B) Percentual de células KI-67 positivas. ANOVA e pós-teste de Tukey: *** p <0,0001.

6.3. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 e/ou com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*

No ensaio de incorporação do BrdU houve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral proliferativas entre todos os grupos estudados [$F(3,11) = 252,324$, $p < 0,0001$]. A taxa de células BrdU positivas foi significativamente menor nos grupos tratados com TKI 5+LY ($23,77 \pm 1,46$, $p < 0,0001$), TKI 5+WTN ($17,93 \pm 0,79$, $p < 0,0001$) e TKI 5+LY+WTN ($10,09 \pm 0,82$, $p < 0,0001$), em relação ao grupo tratado com TKI 5 ($35,48 \pm 1,40$). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células proliferativas do grupo tratado com TKI 5+LY quando comparado com TKI 5+WTN ($p < 0,001$) e, com TKI 5+LY+WTN ($p < 0,0001$); houve uma redução significativa entre a taxa de células proliferativas tratadas com TKI 5+LY+WTN em comparação com as tratadas com TKI 5+WTN ($p < 0,0001$) (Figura 7A). Foi observada uma redução de 32,97% no grupo TKI 5+LY; 49,45% no grupo TKI 5+WTN; e 71,54% no grupo TKI 5+LY+WTN.

Por meio do ensaio da imunexpressão do KI-67 também teve uma diferença estatisticamente significativa do percentual de células SCC-4 KI-67 positivas entre todos os grupos estudados [$F(3,11) = 295,346$, $p < 0,0001$]. Quando comparado com a taxa de células proliferativas tratadas com TKI 5 ($31,64 \pm 1,57$), a taxa foi significativamente menor nos grupos tratados com TKI 5+LY ($21,40 \pm 0,75$, $p < 0,0001$), TKI 5+WTN ($18,26 \pm 0,64$, $p < 0,0001$) e TKI 5+LY+WTN ($8,52 \pm 0,45$, $p < 0,0001$). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa da porcentagem de células proliferativas no grupo tratado com TKI 5+LY quando comparado com TKI 5+WTN ($p < 0,05$) e, com TKI 5+LY+WTN ($p < 0,0001$); houve uma redução significativa do percentual de células proliferativas tratadas com TKI 5+LY+WTN em relação às tratadas com TKI 5+WTN ($p < 0,0001$) (Figura 7B). Foi vista uma redução de 32,36% no grupo TKI 5+LY; 42,29% no grupo TKI 5+WTN; e 73,06% no grupo TKI 5+LY+WTN.

Deste modo, a inibição dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs com o inibidor tirosina quinase TKI-258 e/ou da proteína PI3K com os inibidores LY294002 e Wortmannin, reduziu a proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral em todos os grupos tratados. E, a combinação dos três inibidores diminuiu mais ainda o percentual de células proliferativas.

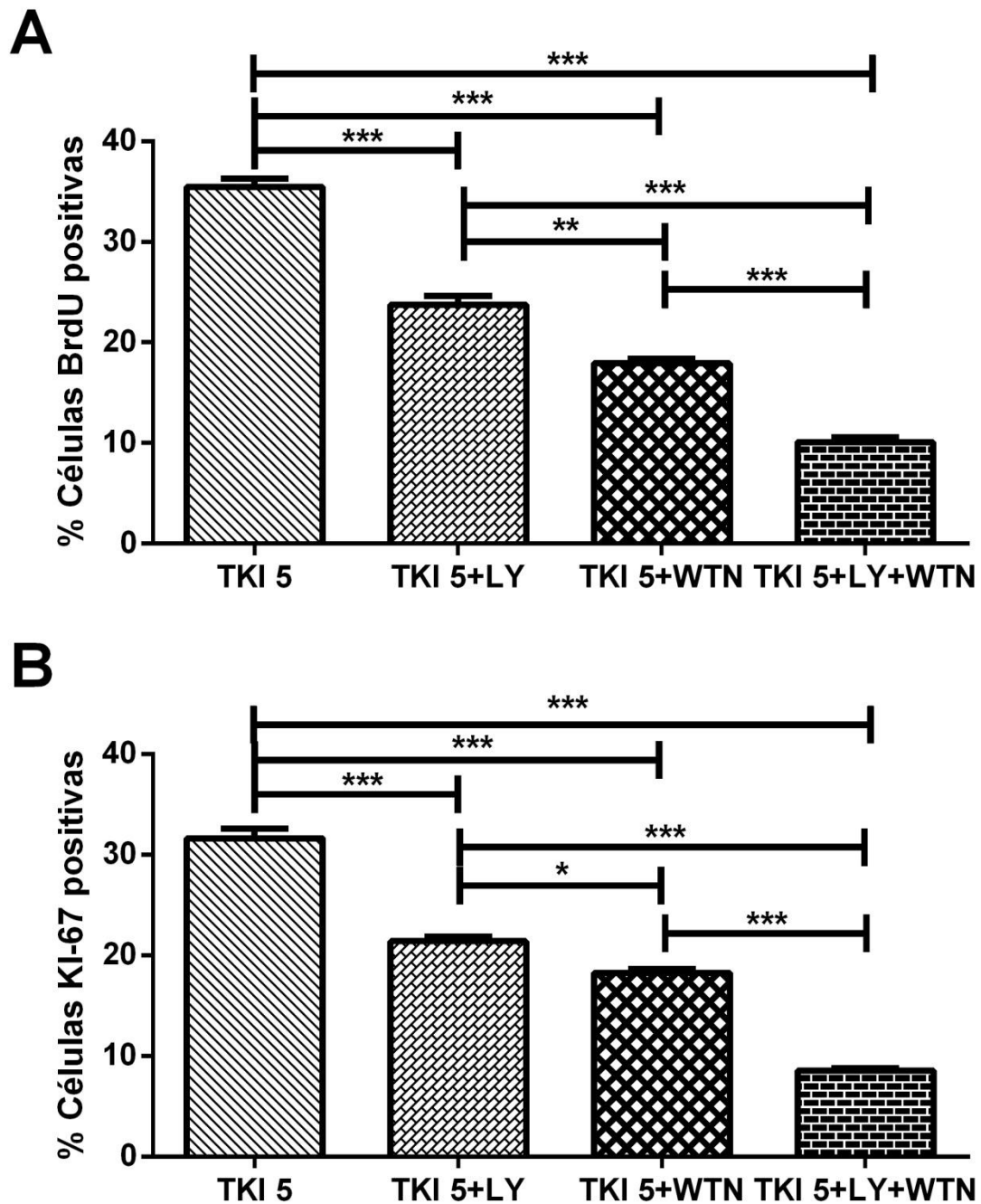


Figura 7. Efeito do tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 e/ou com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin sobre a proliferação celular em carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Percentual de células tratadas com TKI-258 5 μ M, TKI-258 5 μ M associado com LY294002 60 μ M, TKI-258 5 μ M associado com Wortmannin 2 μ M e TKI-258 5 μ M associado com LY294002 60 μ M e com Wortmannin 2 μ M, durante 6 h. (A) Percentual de células BrdU positivas e (B) Percentual de células KI-67 positivas. ANOVA e pós-teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

7. DISCUSSÃO

Através dos ensaios de incorporação do BrdU e imunexpressão do KI-67, marcadores de proliferação celular, este estudo demonstrou pela primeira vez que a inibição dos receptores tirosina quinase FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, com o TKI-258, reduz a proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado, e provavelmente esse processo ocorre por meio de vias intracelulares envolvendo a proteína PI3K. A proliferação é um processo celular complexo e altamente coordenado que ocorre em quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M. Nas primeiras fases há o aumento do tamanho da célula e a síntese de proteínas e DNA, já na fase M acontece efetivamente a divisão celular (GOLIAS *et al.*, 2004).

A continuidade do ciclo celular é modulada por várias proteínas, responsáveis por impulsionar o início do ciclo e sua interrupção de forma reversível. Existem ainda algumas moléculas extracelulares que também participam dessa regulação, como: FGFs, PDGFs e VEGFs (WILLIAMS e STOEBER, 2012). A perda de controle do ciclo celular é um evento prévio e fundamental para que haja um aumento desordenado da proliferação e conseqüentemente à carcinogênese (GOLIAS *et al.*, 2004). Esta desregulação pode ser desencadeada por mutações em receptores e/ou em proteínas intracelulares que controlam a proliferação celular como, por exemplo, a PI3K (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Este estudo avaliou o efeito da inibição de três diferentes famílias de receptores de fatores de crescimento e/ou da proteína PI3K, sobre a taxa de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

O TKI-258 é um inibidor tirosina quinase que possui atividade inibitória sobre os FGFRs, PDGFRs e VEGFRs (RENHOWE *et al.*, 2009), e está em fase de desenvolvimento I (SCHÄFER *et al.*, 2016), II (SCHEID *et al.*, 2015) e III (MOTZER *et al.*, 2014) em ensaios clínicos para tratamento de alguns tipos de câncer, embora em carcinoma epidermoide oral ainda existam poucos trabalhos com esse inibidor.

Em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, através da expressão de RNAm, foram observadas alterações nas isoformas de FGFRs em 46% dos casos, sendo que desses, 31% dos pacientes tiveram amplificação e superexpressão de FGFR1, 12% de FGFR3, 9% de FGFR2 e 8% de FGFR4, além disso foram vistas alterações dos VEGFR2 e VEGFR3 em 16% e 9% dos pacientes do estudo, respectivamente (BRANDS *et al.*, 2017).

Por meio de reações de imunohistoquímica e imunofluorescência, em amostras de tecidos de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, foi observada uma expressão de 94% de PDGFR β , 71% de VEGFR1-2 e 65% de FGFR2, entretanto através da análise por *Western blot*, foi constatado que nas linhagens celulares FADU, SCC-1, SCC-6, SCC-22A, OSC-19 e Cal27 de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, houve a expressão somente de FGFR1-3 (SWEENEY *et al.*, 2012). Também em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (PCI-1, PCI-9, PCI-13, PCI-52 e PCI-68) foi demonstrado, pela análise com RT-PCR, que os FGFR1-3 apresentaram maior expressão que os VEGFR1-3, e em todas essas linhagens celulares o tratamento com TKI-258 6 μ M por 72 h reduziu de forma significativa a quantidade de células viáveis (BRANDS *et al.*, 2017).

Neste estudo, através de ensaios de imunofluorescência para dois marcadores de proliferação celular, BrdU e KI-67, foi observado que o tratamento com TKI-258 (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) por 6 h, apresentou um efeito antiproliferativo depende da dose em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. As concentrações do TKI-258 utilizadas neste trabalho foram determinadas a partir de estudos anteriores (MAN *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2016). A proliferação celular foi avaliada tanto por meio da análise da síntese de DNA no ensaio de incorporação do BrdU, quanto pela detecção de um antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G₀, no ensaio de imunoexpressão de KI-67. Ambos os ensaios são amplamente utilizados para a avaliação da proliferação celular (ROTHAEUSLER e BAUMGARTH, 2007). Corroborando com esses resultados, em linhagens celulares FADU, SCC-1, SCC-6, SCC-22A, OSC-19 e Cal27 de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, foi observado através da contagem por citometria de fluxo que o tratamento com TKI-258 10 nM por 48 h também reduziu a proliferação celular (SWEENEY *et al.*, 2012).

Outros inibidores tirosina quinase, também, apresentaram atividade antiproliferativa em alguns tipos de câncer como, por exemplo, o Sunitinibe, inibidor dos PDGFRs e VEGFRs, que induziu a parada do ciclo em células TE13 e ECA109 de câncer esofágico (DING *et al.*, 2016) e em células MCF7 de câncer de mama (KORASHY *et al.*, 2017). Resultados semelhantes foram observados em linhagens celulares de osteosarcoma de humanos, ratos e camundongos, tratadas com o Imatinibe, inibidor de PDGFRs (GOBIN *et al.*, 2014). Curiosamente, após o insucesso terapêutico do Sunitinibe e/ou do Imatinibe em pacientes com tumores estromais

gastrointestinais metastáticos e/ou irressecáveis, o tratamento com Dovitinibe (TKI-258), inibidor dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, apresentou atividade antitumoral (KANG *et al.*, 2013).

A autofosforilação dos receptores FGFRs, PDGFRs e VEGFRs ativa algumas proteínas intracelulares importantes para que ocorra a transdução do sinal como, por exemplo, a PI3K, que está frequentemente associada à carcinogênese (SIMPSON *et al.*, 2015), inclusive no carcinoma epidermoide oral (MARTINS *et al.*, 2016). Além disso, a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR está relacionada ao desenvolvimento de resistência aos tratamentos antineoplásicos convencionais em pacientes com carcinoma de células escamosas orais (WANG *et al.*, 2017). Desta forma, a inibição desses receptores e/ou dessa via de sinalização pode apresentar um potencial terapêutico para essa neoplasia (FRANKSON *et al.*, 2017).

Neste estudo, o tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 60 μ M e Wortmannin 2 μ M, por 6 h, diminuiu a taxa de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. Estudos anteriores mostraram que o tratamento com LY294002 60 μ M apresentou efeito antiproliferativo em células A549 de câncer de pulmão (LIANG *et al.*, 2017), assim como o tratamento com Wortmannin 2 μ M em células OE19 de adenocarcinoma de Barrett (PAL *et al.*, 2012). Tanto o LY294002, quanto o Wortmannin, reduziram a proliferação em linhagens celulares KYSE150, HKESC-1, KYSE270 e T.Tn de câncer esofágico (LI *et al.*, 2014).

Os inibidores da PI3K têm sido muito utilizados em pesquisas oncológicas para desvendar o papel dessa proteína em vários processos celulares envolvidos na iniciação e progressão tumoral (LIU *et al.*, 2012). Neste estudo, o tratamento com Wortmannin, inibidor da PI3K, foi associado a uma redução mais significativa da taxa de proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, quando comparado ao tratamento com o também inibidor da PI3K, LY294002. Possivelmente isso pode ser atribuído ao fato do Wortmannin além de inibir a PI3K, também apresentar atividade inibitória sobre a quinase tipo polo 1 (PLK1) (LIU *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2012), proteína importante na regulação da mitose que quando desregulada está associada à carcinogênese (LIU *et al.*, 2017). Em estudo com amostras de tecidos de carcinoma epidermoide oral, foi demonstrado por meio de imunohistoquímica que a PLK1 foi expressa em 90% dos casos, enquanto em tecidos normais não houve expressão (VITTAL *et al.*, 2018). Todavia, em células 451Lu, SKMel28, 1205Lu, WM852 e SKMel19 e Mewo de melanoma metastático, o tratamento com LY294002 diminuiu mais significativamente o crescimento celular em relação ao tratamento com Wortmannin (SINNBERG *et al.*, 2009).

O tratamento com Wortmannin em diferentes concentrações (1; 6,25; 12,5; 25 e 50 nM), por 24, 48 e 72 h, reduziu significativamente a proliferação em células MCF-7 de câncer de mama (YUN *et al.*, 2012), assim como em células K562 de leucemia (WU *et al.*, 2009). E, em camundongos com xenoenxertos de células das linhagens de câncer esofágico KYSE150 e KYSE270, o tratamento com Wortmannin, 0,6 mg/kg, por 19 dias foi associado a uma redução de 59,2% e 77,3% do tamanho do tumor, respectivamente (LI *et al.*, 2014).

Neste estudo, o tratamento com LY294002 também reduziu a taxa de células proliferativas em carcinoma epidermoide oral, embora em menores proporções quando comparado com o tratamento com Wortmannin. Em concordância com esses resultados, em células BGC-823 de câncer gástrico, o tratamento com LY294002 (10, 20, 50 e 100 μ M), por 24 h e 48 h, diminuiu a taxa de proliferação celular (LU *et al.*, 2018). E, em camundongos, após a injeção intraperitoneal de LY294002, 25 mg/kg/dia, dos 2 aos 10 meses de idade, houve uma redução da imunexpressão de KI-67 em células tumorais na tireoide e um retardo estatisticamente significativo na progressão do ciclo celular em comparação ao dos camundongos não tratados (FURUYA *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo demonstraram que a PI3K possui um papel importante na regulação da proliferação em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, tendo em vista que a combinação dos seus dois inibidores, LY294002 e Wortmannin, resultou em uma diminuição significativa da taxa de células proliferativas, 70,78% no ensaio de incorporação do BrdU e 75,31% no ensaio de imunexpressão do KI-67, em comparação com a taxa de proliferação das células controle. Estudos anteriores demonstraram que a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR regula positivamente a proliferação em células SCC-25 de carcinoma epidermoide oral (SMOLENSKY *et al.*, 2017), assim como em células MCF7 câncer de mama (CHIKH *et al.*, 2016), em células MKN28 de câncer gástrico (LI *et al.*, 2016) e em células PC-3 de câncer de próstata (LIN *et al.*, 2012). Em concordância com estes resultados, em camundongos com xenoenxertos de carcinoma de células escamosas orais foi observado que a PI3K possui um papel essencial na proliferação celular, uma vez que sua inibição reduziu o crescimento tumoral (MIZRACHI *et al.*, 2017).

Interessantemente, os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a inibição simultânea da PI3K e dos receptores FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, reduziu ainda mais a proliferação celular, 71,54% no ensaio de incorporação do BrdU e 73,06% no ensaio de

imunoexpressão do KI-67, quando comparada ao tratamento com apenas o inibidor tirosina quinase TKI-258. Estes resultados sugerem que a proteína PI3K está envolvida na via de sinalização inibida pelo TKI-258 na regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral. A ligação de fatores de crescimento em receptores tirosina quinase localizados na membrana celular desencadeia a ativação de vias de sinalização intracelulares como a PI3K/AKT/mTOR, e alterações em proteínas que constituem essa via podem desencadear o aumento da proliferação celular e o desenvolvimento do câncer (REGAD, 2015). As principais modificações que desregulam a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR são: mutação, amplificação e/ou superexpressão que leva a diminuição da expressão ou da função da fosfatase e homólogo de tensinas (PTEN), principal proteína que regula negativamente a atividade da PI3K; pode haver também amplificação ou mutação da PI3K classe IA e da proteína AKT; e, se os receptores tirosina quinase que ativam essa via intracelular de sinalização tiverem mutados e/ou amplificados ou, ainda, superexpressos pode ocorrer ativação anormal e o aumento da proliferação celular (HASSAN *et al.*, 2013).

A combinação de inibidores que bloqueiam múltiplos receptores em que há o envolvimento da PI3K constitui uma opção promissora para o tratamento do câncer, tendo em vista que após sofrer mutações, a proteína PI3K está associada à aquisição de resistência aos quimioterápicos (BROWN e TOKER, 2015). Além disso, apesar dos benefícios relacionados ao tratamento com os inibidores tirosina quinase, já existem evidências que ocorre resistência a essas drogas devido a mutações pontuais, amplificação e/ou superexpressão de receptores tirosina quinase e também em decorrência da utilização de vias de sinalização intracelulares alternativas (SIERRA *et al.*, 2010). Neste estudo, a associação dos inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin, com o TKI-258, inibidor dos receptores tirosina quinase FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, não diminuiu totalmente a proliferação de células SCC-4 em carcinoma epidermoide oral, sendo assim possivelmente esse processo também é regulado por outras vias de sinalização intracelulares, mesmo que em menores proporções.

Em amostras de pacientes com tumores estromais gastrointestinais foi observado através de reações de imunohistoquímica, que a expressão das proteínas da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR foi maior em pacientes com resistência ao Imatinibe, inibidor dos PDGFRs (LI *et al.*, 2015). A ativação exacerbada desta via de sinalização também foi associada à

resistência ao Sorafenibe, inibidor dos PDGFRs e VEGFRs, em células de carcinoma hepatocelular (ZHANG *et al.*, 2018) e em leucemia mieloide aguda (LINDBLAD *et al.*, 2016).

O tratamento com o TKI-258 reduziu a migração e a invasão de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral (CARNEIRO *et al.*, 2016). E, a associação do TKI-258 com os inibidores da PI3K, LY294002 ou RAD001, potencializou a inibição da invasão celular em fibroblastos associados ao câncer de mama (ZANG *et al.*, 2015). Em células de câncer de próstata resistentes ao tratamento com Docetaxel, a inibição simultânea da PI3K e dos receptores tirosina quinase PDGFRs e VEGFRs, com os inibidores NVP-BEZ235 e Sunitinibe, respectivamente, apresentou um efeito antitumoral mais significativo (PARK *et al.*, 2014).

A associação entre os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin, com outras drogas antitumorais frequentemente utilizadas em quimioterapias, Cisplatina, Docetaxel ou 5-Fluorouracil, intensificou a apoptose em células HSC-2 de carcinoma epidermoide oral (IWASE *et al.*, 2007). O tratamento com LY294002 aumentou o efeito antiproliferativo da Gemcitabina em células PANC-1 de carcinoma pancreático (KE *et al.*, 2013). Em células e em camundongos com xenoenxertos de câncer gástrico, a combinação do LY294002 com a Oxaliplatina, também intensificou a inibição do crescimento celular (LIU *et al.*, 2011). O tratamento prévio com Wortmannin foi associado à sensibilização a radiação ionizante por meio de inibição da formação de colônias e parada do ciclo celular nas linhagens celulares A549 e H1650 de câncer de pulmão (ZHANG *et al.*, 2010). Em contrapartida, em células tumorais neuroendócrinas, o Wortmannin não aumentou a atividade antiproliferativa do Imatinibe, inibidor dos PDGFRs (LANKAT-BUTTGEREIT *et al.*, 2005).

Embora não tenha sido feito a caracterização da expressão molecular dos FGFRs, PDGFRs e VEGFRs após a inibição com TKI-258 nas células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o TKI-258 apresenta um efeito antiproliferativo nessas células e esse processo possivelmente pode ser regulado pelos receptores tirosina quinase bloqueados. Além disso, foi observado que a proteína PI3K está presente nessa via de sinalização, porém existem outras proteínas envolvidas na cascata intracelular que regula positivamente a proliferação celular nesse tipo de carcinoma. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a expressão dos receptores e proteínas envolvidas, bem como outros processos celulares *in vitro* e a atividade antiproliferativa do TKI-258 *in vivo*.

8. CONCLUSÃO

O tratamento com o inibidor tirosina quinase TKI-258 exerceu um efeito inibitório sobre a proliferação em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de língua humana moderadamente diferenciado, através do bloqueio de uma ou mais vias de sinalização: FGFRs e/ou PDGFRs e/ou VEGFRs.

- O tratamento com TKI-258 nas concentrações estudadas reduziu a taxa de células SCC-4 positivas para BrdU e KI-67 de maneira dependente da dose, indicando que uma ou mais vias de sinalização: FGFRs e/ou PDGFRs e/ou VEGFRs sejam importantes para a regulação da proliferação de células de carcinoma epidermoide oral.

- O tratamento com os inibidores da PI3K, LY294002 e Wortmannin, resultou em uma diminuição da taxa de células proliferativas, sugerindo que a PI3K possui um papel importante na regulação da proliferação em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

- A inibição simultânea da PI3K e dos receptores FGFRs, PDGFRs e VEGFRs, reduziu ainda mais a proliferação celular quando comparada ao tratamento com apenas um inibidor, provavelmente a proteína PI3K está envolvida na sinalização inibida pelo TKI-258 para a regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JABER, A.; AL-NASSER, L.; EL-METWALLY, A. Epidemiology of oral cancer in Arab countries. **Saudi Med J**, v. 37, n. 3, p. 249-55, Mar 2016. ISSN 0379-5284. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26905345> >.

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

ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 315, n. 3, p. 971-9, Dec 2005. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002463> >.

BHULLAR, K. S. et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. **Mol Cancer**, v. 17, n. 1, p. 48, Feb 2018. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29455673> >.

BRANDS, R. C. et al. Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. **Oncol Rep**, Jul 2017. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28714017> >.

BROWN, K. K.; TOKER, A. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. **F1000Prime Rep**, v. 7, p. 13, 2015. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750731> >.

CARNEIRO, A. C. et al. Tyrosine kinase inhibitor TKI-258 inhibits cell motility in oral squamous cell carcinoma in vitro. **J Oral Pathol Med**, Oct 2016. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27732737> >.

CHIKH, A. et al. Class II phosphoinositide 3-kinase C2 β regulates a novel signaling pathway involved in breast cancer progression. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 18325-45, Apr 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26934321> >.

CIERPIKOWSKI, P. et al. PDGFR α /HER2 and PDGFR α /p53 Co-expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Res**, v. 38, n. 2, p. 795-802, 02 2018. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29374704> >.

DE MORAIS, E. F. et al. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 75, n. 7, p. 1555-1566, Jul 2017. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061358> >.

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

DING, Y. Q. et al. Sunitinib modulates the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells in vitro. **Dis Esophagus**, v. 29, n. 8, p. 1144-1151, Nov 2016. ISSN 1442-2050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26542732> >.

ECONOMOPOULOU, P. et al. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 9, p. 173, May 2016. ISSN 2305-5839. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275486> >.

ELFERINK, L. A.; RESTO, V. A. Receptor-tyrosine-kinase-targeted therapies for head and neck cancer. **J Signal Transduct**, v. 2011, p. 982879, 2011. ISSN 2090-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776391> >.

FAES, S.; DORMOND, O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 9, p. 21138-52, Sep 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404259> >.

FRANKSON, R. et al. Therapeutic Targeting of Oncogenic Tyrosine Phosphatases. **Cancer Res**, v. 77, n. 21, p. 5701-5705, 11 2017. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855209> >.

FRUMAN, D. A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 2, p. 140-56, Feb 2014. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481312> >.

FURUYA, F. et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2451-8, Dec 2007. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660507> >.

GANESH, D. et al. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. **Anticancer Res**, v. 38, n. 6, p. 3223-3229, Jun 2018. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29848669> >.

GHEDINI, G. C. et al. Future applications of FGF/FGFR inhibitors in cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, Jun 2018. ISSN 1744-8328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29936878> >.

GOBIN, B. et al. Imatinib mesylate exerts anti-proliferative effects on osteosarcoma cells and inhibits the tumour growth in immunocompetent murine models. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90795, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599309> >.

GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 12, p. 1134-41, Dec 2004. ISSN 1368-5031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15646411> >.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HASSAN, B. et al. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 22, n. 4, p. 641-64, Oct 2013. ISSN 1558-5042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012393> >.

HELDIN, C. H.; LENNARTSSON, J.; WESTERMARK, B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. **J Intern Med**, v. 283, n. 1, p. 16-44, Jan 2018. ISSN 1365-2796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28940884> >.

HOLMES, D. PI3K pathway inhibitors approach junction. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 8, p. 563-4, Aug 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804582> >.

HU, H.; LIU, Y.; JIANG, T. Mutation-introduced dimerization of receptor tyrosine kinases: from protein structure aberrations to carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 36, n. 3, p. 1423-8, Mar 2015. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750036> >.

HUI, Q. et al. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 7, Jun 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29949887> >.

HÄNZE, J. et al. Epithelial mesenchymal transition status is associated with anti-cancer responses towards receptor tyrosine-kinase inhibition by dovitinib in human bladder cancer

cells. **BMC Cancer**, v. 13, p. 589, 2013. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325461> >.

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

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância: 128 p. 2017.

IWASE, M. et al. Enhanced susceptibility to apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells subjected to combined treatment with anticancer drugs and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. **Int J Oncol**, v. 31, n. 5, p. 1141-7, Nov 2007. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912441> >.

KADEMANI, D. Oral cancer. **Mayo Clin Proc**, v. 82, n. 7, p. 878-87, Jul 2007. ISSN 0025-6196. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17605971> >.

KANG, Y. K. et al. Phase II study of dovitinib in patients with metastatic and/or unresectable gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib. **Br J Cancer**, v. 109, n. 9, p. 2309-15, Oct 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084771> >.

KARAMAN, S.; LEPPÄNEN, V. M.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. **Development**, v. 145, n. 14, 07 2018. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030240> >.

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

KE, X. Y. et al. LY294002 enhances inhibitory effect of gemcitabine on proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 33, n. 1, p. 57-62, Feb 2013. ISSN 1672-0733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392708> >.

KNIGHT, Z. A. Small molecule inhibitors of the PI3-kinase family. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 347, p. 263-78, 2010. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473788> >.

KONG, D.; YAMORI, T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. **Cancer Sci**, v. 99, n. 9, p. 1734-40, Sep 2008. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616528> >.

KORASHY, H. M. et al. Sunitinib Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Inducing Apoptosis, Cell-cycle Arrest and DNA Repair While Inhibiting NF- κ B Signaling Pathways. **Anticancer Res**, v. 37, n. 9, p. 4899-4909, 09 2017. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870911> >.

KUMAR, V. et al. **Robbins e Cotran, Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LANKAT-BUTTGEREIT, B. et al. Effects of the tyrosine kinase inhibitor imatinib on neuroendocrine tumor cell growth. **Digestion**, v. 71, n. 3, p. 131-40, 2005. ISSN 0012-2823. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785039> >.

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

LI, B. et al. Suppression of esophageal tumor growth and chemoresistance by directly targeting the PI3K/AKT pathway. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11576-87, Nov 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344912> >.

LI, J. et al. PI3K/AKT/mTOR pathway is activated after imatinib secondary resistance in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). **Med Oncol**, v. 32, n. 4, p. 111, Apr 2015. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25757539> >.

LI, N. A. et al. miR-196b regulates gastric cancer cell proliferation and invasion via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Oncol Lett**, v. 11, n. 3, p. 1745-1749, Mar 2016. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26998071> >.

LIANG, J. X.; GAO, W.; CAI, L. Fucosyltransferase VII promotes proliferation via the EGFR/AKT/mTOR pathway in A549 cells. **Onco Targets Ther**, v. 10, p. 3971-3978, 2017. ISSN 1178-6930. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860805> >.

LIN, P. et al. ADAM17 regulates prostate cancer cell proliferation through mediating cell cycle progression by EGFR/PI3K/AKT pathway. **Mol Cell Biochem**, v. 359, n. 1-2, p. 235-43, Jan 2012. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21837402> >.

LINDBLAD, O. et al. Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. **Oncogene**, v. 35, n. 39, p. 5119-31, 09 2016. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26999641> >.

LIU, J. et al. LY294002 potentiates the anti-cancer effect of oxaliplatin for gastric cancer via death receptor pathway. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 2, p. 181-90, Jan 2011. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245990> >.

_____. Natural products as kinase inhibitors. **Nat Prod Rep**, v. 29, n. 3, p. 392-403, Mar 2012. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231144> >.

LIU, Y. et al. Wortmannin, a widely used phosphoinositide 3-kinase inhibitor, also potently inhibits mammalian polo-like kinase. **Chem Biol**, v. 12, n. 1, p. 99-107, Jan 2005. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664519> >.

LIU, Z.; SUN, Q.; WANG, X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. **Transl Oncol**, v. 10, n. 1, p. 22-32, Feb 2017. ISSN 1936-5233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888710> >.

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

LU, J. et al. LY294002 inhibits the Warburg effect in gastric cancer cells by downregulating pyruvate kinase M2. **Oncol Lett**, v. 15, n. 4, p. 4358-4364, Apr 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541204> >.

MACHIELS, J. P. et al. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 44, 2014. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991421> >.

MADANI, M.; BERARDI, T.; STOOPLER, E. T. Anatomic and examination considerations of the oral cavity. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 6, p. 1225-38, Nov 2014. ISSN 1557-9859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25443674> >.

MAHMOOD, N. et al. Impact of age at diagnosis on clinicopathological outcomes of oral squamous cell carcinoma patients. **Pak J Med Sci**, v. 34, n. 3, p. 595-599, 2018 May-Jun 2018. ISSN 1682-024X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30034422> >.

MAN, W. Y.; MAK, J. P.; POON, R. Y. Dovitinib induces mitotic defects and activates the G2 DNA damage checkpoint. **J Cell Mol Med**, v. 18, n. 1, p. 143-55, Jan 2014. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238094> >.

MARTINI, M. et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. **Ann Med**, v. 46, n. 6, p. 372-83, Sep 2014. ISSN 1365-2060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897931> >.

MARTINS, F. et al. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 10, p. 746-752, Nov 2016. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991907> >.

MIZRACHI, A. et al. Tumour-specific PI3K inhibition via nanoparticle-targeted delivery in head and neck squamous cell carcinoma. **Nat Commun**, v. 8, p. 14292, Feb 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28194032> >.

MORO, J. D. S. et al. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 16, n. 2, p. eAO4248, Jun 2018. ISSN 2317-6385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29898090> >.

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

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology Development, Structure and Function** 8^a edição. Montreal: 2013. 398.

OIKAWA, Y. 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. 256-266, Feb 2017. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889930> >.

PADMA, R. et al. The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 3, p. 461, 2017 Sep-Dec 2017. ISSN 0973-029X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29391735> >.

PAL, J. et al. Targeting PI3K and RAD51 in Barrett's adenocarcinoma: impact on DNA damage checkpoints, expression profile and tumor growth. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 55-66, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1790-6245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399496> >.

- PARK, H. S. et al. Synergistic antitumor effect of NVP-BEZ235 and sunitinib on docetaxel-resistant human castration-resistant prostate cancer cells. **Anticancer Res**, v. 34, n. 7, p. 3457-68, Jul 2014. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982354> >.
- PEREIRA, M. C. et al. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J Can Dent Assoc**, v. 73, n. 4, p. 339-44, May 2007. ISSN 1488-2159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17484800> >.
- PIANKA, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor isoforms: are they present in oral squamous cell carcinoma? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 5, p. 897-904, May 2015. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883000> >.
- PORTA, C. et al. Dovitinib (CHIR258, TKI258): structure, development and preclinical and clinical activity. **Future Oncol**, v. 11, n. 1, p. 39-50, 2015. ISSN 1744-8301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572783> >.
- PORTER, S. et al. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 125, n. 6, p. 603-611, Jun 2018. ISSN 2212-4411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29891084> >.
- QING, J. et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 5, p. 1216-29, May 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381019> >.
- REGAD, T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 1758-84, Sep 2015. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404379> >.
- RENHOWE, P. A. et al. Design, structure-activity relationships and in vivo characterization of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: a novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. **J Med Chem**, v. 52, n. 2, p. 278-92, Jan 2009. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19113866> >.
- ROTHAEUSLER, K.; BAUMGARTH, N. Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. **Curr Protoc Cytom**, v. Chapter 7, p. Unit7.31, Apr 2007. ISSN 1934-9300. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18770853> >.

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

SCHEID, C. et al. Phase 2 study of dovitinib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma with or without t(4;14) translocation. **Eur J Haematol**, v. 95, n. 4, p. 316-24, Oct 2015. ISSN 1600-0609. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25402977>>.

SCHÄFER, N. et al. Phase I trial of dovitinib (TKI258) in recurrent glioblastoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 142, n. 7, p. 1581-9, Jul 2016. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100354>>.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 4, Apr 2015. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25833940>>.

SHIMIZU, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor-A Exerts Diverse Cellular Effects via Small G Proteins, Rho and Rap. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Apr 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659486>>.

SIERRA, J. R.; CEPERO, V.; GIORDANO, S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. **Mol Cancer**, v. 9, p. 75, Apr 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385023>>.

SIMPSON, D. R.; MELL, L. K.; COHEN, E. E. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v. 51, n. 4, p. 291-8, Apr 2015. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532816>>.

SINNBERG, T. et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 6, p. 1500-15, Jun 2009. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078992>>.

SMOLENSKY, D. et al. Inhibition of the PI3K/AKT Pathway Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to Anthracycline-Based Chemotherapy In Vitro. **J Cell Biochem**, v. 118, n. 9, p. 2615-2624, 09 2017. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649518>>.

SWEENY, L. et al. 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. 1242-9, Dec 2012. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795534>>.

TANDON, P. et al. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra - a retrospective 10-year study. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 21, n. 2, p. 178-183, 2017. ISSN 1428-2526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28947890> >.

THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. **J Oral Pathol Med**, May 2018. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29752860> >.

THORPE, L. M.; YUZUGULLU, H.; ZHAO, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7-24, Jan 2015. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533673> >.

VITTAL, K. et al. Immunohistochemical expression of polo-like kinase 1 in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. **Indian J Dent Res**, v. 29, n. 2, p. 171-175, 2018 Mar-Apr 2018. ISSN 1998-3603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29652009> >.

WANG, Z. et al. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 36, n. 3, p. 491-502, 09 2017. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28822012> >.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990031> >.

WU, Q. et al. Wortmannin inhibits K562 leukemic cells by regulating PI3k/Akt channel in vitro. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 29, n. 4, p. 451-6, Aug 2009. ISSN 1672-0733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662361> >.

XIE, X. et al. Roles of FGFR in oral carcinogenesis. **Cell Prolif**, v. 49, n. 3, p. 261-9, Jun 2016. ISSN 1365-2184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27218663> >.

YANAMANDRA, M.; MITRA, S.; GIRI, A. Development and application of PI3K assays for novel drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 10, n. 2, p. 171-86, Feb 2015. ISSN 1746-045X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547459> >.

YING, H. et al. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 9, p. 2158-64, Sep 2006. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985048> >.

YUN, J. et al. Wortmannin inhibits proliferation and induces apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 33, n. 4, p. 367-9, 2012. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23091892> >.

ZANG, C. et al. Targeting multiple tyrosine kinase receptors with Dovitinib blocks invasion and the interaction between tumor cells and cancer-associated fibroblasts in breast cancer. **Cell Cycle**, v. 14, n. 8, p. 1291-9, 2015. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714853> >.

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

_____. Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway reverses sorafenib-derived chemoresistance in hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett**, v. 15, n. 6, p. 9377-9384, Jun 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928334> >.

ZHANG, T. et al. Inhibition of PI3 kinases enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation. **Oncol Rep**, v. 24, n. 6, p. 1683-9, Dec 2010. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042768> >.

ANEXO I



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

Memorando nº 47/2012/HISTOLOGIA/ICBN/UFTM

Uberaba, 04 de junho de 2012

Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP/UFTM

Prezada Coordenadora,

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

Atenciosamente,

Prof.ª Dra. Virgínia Oliveira Crema

Responsável pela Disciplina de Histologia dos
Cursos Biomedicina e Fisioterapia

*Aprovado em
15/6/2012*

Prof.ª Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP da UFTM