

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Guilherme Henrique Borges

**PAPEL FUNCIONAL DAS ROCKS SOBRE A PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

Uberaba
2017

Guilherme Henrique Borges

**PAPÉL FUNCIONAL DAS ROCKS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Coorientadora: Profa. Dra. Simone de Sales Costa Moreira Carboni

Uberaba
2017

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

B731p Borges, Guilherme Henrique
Papel funcional das ROCKs sobre a proliferação de células de carcinoma epidermoide oral *in vitro* / Guilherme Henrique Borges. -- 2017.
74 f. : il., fig.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema
Coorientadora: Profa. Dra. Simone de Sales C. Moreira Carboni

1. Neoplasias bucais. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Proliferação Celular. I. Crema, Virgínia Oliveira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.31-002.4

GUILHERME HENRIQUE BORGES

**PAPEL FUNCIONAL DAS ROCKS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL *IN VITRO***

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

Uberaba, 22 de novembro de 2017

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Nanci Mendes Pinheiro
Faculdade de Talentos Humanos

DEDICATÓRIA

- A Deus, pela fé que mantém vivo e fiel à vida honesta de trabalho e estudo;
- A minha família que soube entender a minha ausência;
- A todos os professores e alunos que ajudaram na pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema por me orientar, pela sua competência e comprometimento com a orientação científica, assim como pelas críticas e correções relevantes feitas durante a orientação.

À minha coorientadora Simone de Sales Costa Moreira Carboni pela competência científica e orientação dada, e que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

Aos amigos do laboratório: Arthur Silva Rezende, Anna Cecília Dias Maciel Carneiro, Bruna Raphaela Oliveira Silva, Isadora Caixeta da Silveira e Lorraine Stephanie Hiss, pelo incansável apoio moral, orientação e permanente disponibilidade, me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução desta tese.

Minha gratidão a todos os professores, funcionários e amigos da pós-graduação pelos ensinamentos e pela troca de experiência.

Ao André e a Tuânia, secretários do programa de pós-graduação, pela atenção e disponibilidade.

Agradeço em especial aqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria: minha família.

APOIO FINANCEIRO

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

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O carcinoma epidermoide oral é uma neoplasia epitelial responsável pela maioria das lesões malignas que acometem a região de cabeça e pescoço. O e o Y-27632 são inibidores das ROCKs, que são efetoras das GTPases Rho, e estão associadas à patogênese e progressão de tumores humanos. Este estudo visou avaliar o papel funcional das ROCKs na regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral *in vitro*. Foram quantificadas as células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral controle e tratadas com HA-1077 (25, 50 e 100 μM) por 6 e 24 horas; e HA-1077 (25, 50 e 100 μM), HA-1077 50 μM e/ou Y-27632 30 μM por 6 horas, em ensaios de incorporação de BrdU e imunexpressão de KI-67. Foi considerado significativo $p < 0,05$. O número de células SCC-4 tratadas com HA-1077 (25, 50 e 100 μM) que incorporaram BrdU foi significativamente menor que o de células controle em 6 horas [$F(3,11) = 107,461$, $p < 0,0001$] e 24 horas [$F(3,11) = 167,433$, $p < 0,0001$], de modo dose dependente. O número de células SCC-4 tratadas com HA-1077 (25, 50 e 100 μM), HA-1077 50 μM e/ou Y-27632, por 6 horas, que incorporaram BrdU [$F(5,17) = 443,818$, $p < 0,0001$], e o número que imunexpressaram KI-67, também, foi significativamente menor [$F(5,17) = 192,595$, $p < 0,0001$], que o de células controle. Os resultados obtidos sugerem que as proteínas ROCKs desempenham um papel funcional importante na regulação da proliferação celular em carcinoma epidermoide oral, uma vez que o HA-1077 e/ou o Y-27632, inibidores de ROCKs, têm um efeito inibitório sobre a proliferação de células SCC-4.

Palavras-chave: carcinoma de epidermoide oral; HA-1077; proliferação celular; ROCKs; Y-27632.

ABSTRACT

The oral carcinoma cell squamous (OSCC) is epithelial cancer responsible for the majority of malignant lesions affecting the head and neck region. The HA-1077 and the Y-27632 are inhibitors of the ROCKs which are effector of Rho GTPases, and are associated with pathogenesis and progression of human tumors. This study aimed to evaluate the functional role of the ROCKs in the regulation of cellular proliferation of SCC-4 cell line from OSCC. Control cells and cells treated with HA-1077 (25, 50 and 100 μ M) were quantified for 6 and 24 hours; and HA-1077 (25, 50 and 100 μ M), HA-1077 50 μ M and/or Y-27632 30 μ M for 6 hours, in BrdU assays and immunoexpression of KI-67 assays. Was considered significant $p < 0.05$. The number of SCC-4 cells treated with HA-1077 (25, 50 and 100 μ M) that incorporated BrdU was significantly lower than control cells in 6 hours [F (3.11) = 107.461, $p < 0.0001$] and 24 hours [F (3.11) = 167.433, $p < 0.0001$], therefore dose dependent. The number of proliferative SCC-4 cells treated with HA-1077 (25, 50 and 100 μ M), HA-1077 50 μ M and/or Y-27632, for 6 hours, in BrdU assay [F (5.17) = 443.818, $p < 0.0001$], and in immunoexpressaram KI-67 assay, also, was significantly less [F (5.17) = 192.595, $p < 0.0001$], than control cells. The results obtained suggest that the ROCKs play an important functional role in the regulation of cellular proliferation in OSCC, since both HA-1077 and/or the Y-27632, inhibitors of ROCKs, have an inhibitory effect on proliferation of SCC-4 cells.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; HA-1077; cell proliferation; ROCKs; Y-27632.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de imunexpressão com BrdU por 24 horas47
- Figura 2.** Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de imunexpressão com BrdU por 6 horas.....47
- Figura 3.** Efeito do HA-1077 associado ou não a Y-27632 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de imunexpressão com BrdU por 6 horas.....49
- Figura 4.** Efeito do HA-1077 associado ou não a Y-27632 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de imunexpressão de KI-67 por 6 horas.....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise da variância

BrdU - *Bromodeoxyuridine*

BSA - *Albumin solution from bovine sérum*

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

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

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

DMSO - Dimetilsulfóxido

D-PBS - Dulbecco's salina tamponada fosfatada

GAPs - Proteínas ativadoras de GTPases

GDIs - Inibidores de dissociação da GAP

GEFs - Fatores de troca de guanina

KI-67 - Antígeno nuclear da proliferação celular

LIMK - LIM-quinase

MEC - Matriz extracelular

ROCKs - Proteínas quinase associada a Rho

SFB - Soro fetal bovino

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1.	Aspectos anátomo-fisiológicos da boca	22
2.1.1	Cavidade oral	22
2.2.	Ciclo celular	23
2.4.	GTPases Rho	28
2.5.	Proteínas ROCKs	33
2.6.	HA- 1077 e outros inibidores ROCKs	35
3	HIPÓTESE	37
4	OBJETIVOS	39
4.1.	Objetivo geral	40
4.2.	Objetivos específicos	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1.	Reagentes	42
5.2.	Casuística	42
5.3.	Cultura das células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral	42
5.4.	Ensaio de proliferação celular	43
5.5.	Reações imunocitoquímicas	43
5.6.	Morfometria	44
5.7.	Análise Estatística	44
6	RESULTADOS	45
6.1.	Efeito da inibição das proteínas ROCKs com HA-1077 sobre a proliferação de células SCC-4	46
6.2.	Efeito da inibição das proteínas ROCKs com HA-1077 e/ou Y-27632 sobre a proliferação de células SCC-4	48
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	57
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10	ANEXOS	74

O câncer de boca está entre os dez mais comuns no Brasil e o terceiro no mundo. A doença registra 14 mil novos casos por ano, levando ao óbito mais de quatro mil brasileiros anualmente (Inca, 2016).

Os fatores de risco mais comum são o consumo de tabaco, bebidas alcoólicas e o vírus HPV de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Os homens acima de 40 anos são mais acometidos, provavelmente, devido a uma maior exposição aos fatores de risco. O consumo excessivo de tabaco e álcool propicia o surgimento do câncer de boca. O carcinoma epidermoide oral é o tipo mais comum de câncer de boca, representando um problema para a saúde pública devido à sua mortalidade, prevalência, incidência e sobrevida (Bagan e Scully, 2009; Pulte e Brenner, 2010).

É importante compreender os mecanismos que levam ao surgimento das neoplasias, para se ter melhores métodos para o tratamento do câncer. O bloqueio de atividades de proteínas e vias de transdução de sinal que promovem a carcinogênese são os alvos da terapia para o câncer (Kitajo *et al.*, 2003; Alberts, 2008; Pulte e Brenner, 2010).

As GTPases Rho regulam a mobilidade e adesão celular. Essas proteínas estão envolvidas na organização dos filamentos de actina e controlam processos biológicos como proliferação, migração, adesão, diferenciação, apoptose, citocinese, expressão gênica, tráfego intracelular e progressão do ciclo celular (Pinheiro, 2010; Tseliou *et al.*, 2016). As proteínas Rho mais bem caracterizadas são: Rho A, Rho B, Rac 1 e cdc42 (Heasman e Ridley, 2008; Hall, 2012).

Dentre as proteínas efetoras de Rho estão as proteínas quinases associadas a Rho, ou proteínas ROCKs, que são codificadas pelo gene *Rho-associated coiled-coil kinase* (ROCK) e são conhecidas duas formas homólogas, ROCK1 e ROCK2 (Shi *et al.*, 2013).

As ROCKs exibem atividade biológica através da fosforilação de uma série de alvos, sendo os principais: a cadeia leve da miosina (MLC), a fosfatase 1 (MYPT1), a miosina de cadeia leve 2 (MLC2) e as LIM quinases, que regulam a organização do citoesqueleto de actina, a formação de fibras de estresse e a contração celular (Kimura *et al.*, 1996; Ohashi *et al.*, 2000).

As proteínas ROCK1 e ROCK2 também estão envolvidas na regulação da proliferação celular e da citocinese e são ativadas durante o ciclo celular, tanto em G1 quanto na mitose (Izawa *et al.*, 1998). A superexpressão de ROCK1 e ROCK2 aumenta a proliferação celular e sua ativação induz um aumento na expressão de β -catenina, assim como de seu alvo de transcrição c-myc, acarretando também, um aumento da proliferação (Kosako *et al.*, 2000). Por outro lado, as proteínas ROCK são ativadas durante a citocinese, contribuindo para a formação dos sulcos de clivagem ricos em actina e a desmontagem dos filamentos intermediários abaixo do sulco de clivagem (Matsumura, 2005). A inibição de ROCKs causa um atraso na segregação das células filhas, sua regulação é muito importante na citocinese (Kosako *et al.*, 2000).

Portanto, ROCK1 e ROCK2 induzem inúmeras respostas celulares que envolvem a regulação de muitas proteínas associadas ao citoesqueleto. É cada vez mais evidente que tais respostas sinalizadas pelas proteínas ROCKs agravam muitos fenótipos associados ao câncer e outras doenças cardiovasculares, neurológicas, de insuficiência renal, asma, glaucoma, osteoporose e de resistência à insulina, podendo ser uma molécula promissora para o tratamento de inúmeras doenças (Olson, 2008; Pan *et al.*, 2013).

Estudos observaram que inibindo ROCKs com Y27632, a migração e a proliferação celular são inibidas *in vitro* e a metástase diminuída *in vivo* em osso humano (Liu *et al.*, 2009). Visto que a via de sinalização de ROCK é importante em doenças, além de estar envolvida em vários tipos de câncer, sua superexpressão induz a metástase de vários tipos de tumores; e a inibição da via de ROCK poderia diminuir significativamente o crescimento tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo* (Pan *et al.*, 2013). Este estudo visou avaliar o papel funcional das ROCKs na regulação da proliferação de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral *in vitro* a partir do uso das drogas HA-1077 e Y27632.

2.1. Aspectos anátomo-fisiológicos da boca

O conhecimento das estruturas normais da boca e seu funcionamento facilitam a compreensão das possíveis alterações dessa parte do organismo. A cavidade bucal é formada principalmente por estruturas internas, sendo constituída pelos lábios, cavidade oral, palato, língua, soalho da cavidade oral e orofaringe. O interior da região oral é conhecido como cavidade oral (Fehrenbach e Herring, 2005).

2.1.1 Cavidade oral

A cavidade oral é revestida pela mucosa oral, sendo, o epitélio oral constituído por: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans, células de Merckel (Squier e Kremer, 2001). Esse revestimento é semelhante ao do tubo digestivo e das vias aéreas, e são áreas úmidas, sendo a cavidade oral constantemente banhada pela saliva (Katchburian e Arana, 2012).

Algumas regiões da cavidade oral apresentam epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e outras, não queratinizado. É formada por uma mucosa de revestimento presente nos lábios, bochechas, mucosa alveolar, palato mole, ventral de língua e assoalho de boca; mucosa mastigatória que está presente no palato duro, gengiva e algumas regiões do dorso da língua e mucosa especializada presente no dorso e borda lateral da língua. (Katchburian e Arana, 2012; Nanci, 2013).

A mucosa oral participa em todas as funções da boca sendo elas a de defesa, absorção e sensorial (Grinspan, 1980). Diversas áreas da cavidade oral são denominadas ou identificadas de acordo com as suas relações com a língua, o palato, as bochechas, os lábios e a superfície da face. Assim, estruturas referentes à língua são denominadas linguais; ao palato, palatinas; à face interna das bochechas, julgais; aos lábios, labiais e à superfície da face, faciais (Fehrenbach e Herring, 2005).

2.2. Ciclo celular

O ciclo celular compreende uma sequência de eventos em cinco fases: G1, S, G2, M e G0. A duração de cada fase é variável, mas os processos ocorridos no interior das células são iguais para todas elas. Nas células eucariontes, o processo de gênese de novas células obedece a um padrão cíclico que começa com o crescimento celular. Esse é coordenado por milhares de moléculas diferentes que as células possuem, e culmina com a partição de seu núcleo e citoplasma em duas células-filhas. A proliferação celular é indispensável durante o desenvolvimento normal dos organismos e para repor células quando necessário (Junqueira e Carneiro, 2005; Alberts, 2008).

Existem quatro pontos de checagem bem caracterizados que modulam a progressão do ciclo celular em resposta aos sinais internos e externos (Pollard e Earnshaw, 2006). Os fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), agem em receptores específicos e ativam genes especializados em reparar o DNA, deter sua duplicação e parar a cariocinese ou estacionar o ciclo em qualquer uma de suas fases. Após completar a mitose, a célula para escolher entre as vias de proliferação ou de diferenciação, deve suprimir a tendência de proliferação do ciclo celular precedente pela inativação das quinases dependentes de ciclinas (Pollard e Earnshaw, 2006; Alberts, 2008).

As ciclinas receberam esse nome por serem produzidas e degradadas de forma cíclica nas diferentes etapas do ciclo celular. Cada complexo ciclina/cdk regula determinada fase do ciclo. São duas classes de proteínas Quinases: Cdk (*cyclin dependent kinases*); e ciclinas, que se ligam às cdk e controlam a taxa de fosforilação das proteínas responsáveis pelos inúmeros fenômenos que ocorrem na divisão celular. Na ausência de ciclinas, as Cdk são inativadas (Malumbres e Barbacid, 2009).

As Cdk são reguladas por duas famílias de inibidores: proteínas INK4 incluindo INK4A, INK4B, INK4C e INK4D e a Cip e família Kip, composta de p21, p27 e p57. Estes inibidores do ciclo celular foram mostrados para bloquear a proliferação de células-tronco adultas em vários tipos de tecidos (Malumbres *et al.*, 2008).

Em estudos, foi mostrado que a GTPase RhoA regula negativamente os níveis dos inibidores do ciclo celular p21cip1 e p27KIP1, no entanto, a via de sinalização exata que Rac e RhoA exerce essas funções ainda não estão claras, parece depender do tipo de célula e o contexto celular (Klein *et al.*, 2007).

O controle da progressão do ciclo celular em células cancerosas cancerígenas é considerado uma estratégia eficaz para a inibição do crescimento tumoral. O membro da família dos genes homólogos Ras, Rho A foi identificada como um regulador crítico do comportamento agressivo do tumor. Avaliando o papel de RhoA nos mecanismos subjacentes ao crescimento, migração e invasão do carcinoma de células escamosas de língua (TSCC). Os níveis de RhoA eram mais elevados em tumores primários e nódulos linfáticos metastáticos em comparação com os tecidos normais. O silenciamento de RhoA reduziu significativamente o crescimento tumoral, diminuindo os níveis de Gal-3, β -catenina, MMP-9 e ciclina D1/2, e aumentou os níveis de p21 e p27 levando a inibição da migração, invasão e proliferação celular (Yan *et al.*, 2014).

Existem evidências de que a ativação desregulada de proteínas Rho pode contribuir para a sobrevivência prolongada e inibe a apoptose. Isto é devido à capacidade das GTPases Rho afetar as CDKs envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular promovendo a iniciação e crescimento do tumor. Ciclina D1 é encontrada expressada em 50% dos cânceres de mama. As GTPases Rho correlacionam-se com a elevada expressão da ciclina D1 através da ativação do seu promotor. Rac1 regula uma variedade de vias de sinalização implicadas no fenótipo maligno. Tipicamente, Rac1 afeta a transcrição da ciclina D1 através da ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e ATF-2 que se ligam e ativam o promotor ciclina D1. Assim, as formas constitutivamente ativas de Rac1 estimularam o potencial de transformação e a proliferação celular através da superexpressão da ciclina D1. Além disso, a superexpressão de RhoA inibe p21. Dada a sua integração em várias vias envolvidas no câncer, as GTPases Rho e seus reguladores são considerados alvos terapêuticos importantes através da inibição da proliferação de células cancerígenas, motilidade e invasão (Hanna e El-Sibai, 2013).

A perda da atividade de múltiplas Cdk's aumenta a possibilidade de defeitos, mas não em uma perturbação geral do ciclo celular. Estudos anteriores demonstraram que Cdk4 é dispensável para a proliferação da maioria dos tipos celulares, uma observação

atribuída a um suposto papel de compensação por Cdk6 (Malumbres e Barbacid, 2009).

O controle do ciclo celular é essencial, uma vez que o câncer é caracterizado por um crescimento autônomo e ilimitado. Nas células em proliferação, os fatores de crescimento agem controlando a progressão da fase G1 a S (Alberts, 2008).

A atividade das Cdks no ciclo celular é desregulada em células cancerígenas, devido a alterações genéticas ou epigenéticas em suas atividades reguladoras ou vias de sinalização mitogênica (Malumbres e Barbacid, 2009).

Estudos mostraram que células epiteliais de cristalino humano tratadas com o LPA e EGF, b-FGF, TGF- β , IGF-1, aumentam significativamente a atividade das GTPases Rho e ainda participam da reorganização do citoesqueleto, formação de adesões focais e podem desempenhar um papel crucial na proliferação, migração e sobrevivência das células (Maddala *et al.*, 2003).

A sinalização pelo EGFR ativa uma variedade de percursos, tais como aqueles de sobrevivência, proliferação e motilidade celular, angiogênese e a expressão de proteínas da matriz extracelular. Entretanto, a inibição do EGFR leva a indução da parada do ciclo celular entre as fases G1-S (Massagué, 2004).

A replicação semiconservativa do DNA pode ser estudada usando um análogo estrutural da timidina, a *bromodeoxyuridine* (BrdU), que se incorpora ao DNA em substituição no momento da replicação. A presença desse análogo na molécula de DNA pode ser detectada pela coloração diferencial das cromátides-irmãs em cromossomos que alcançam a segunda mitose após a incorporação (Junqueira e Carneiro, 2005).

Givan (1992) relatou que o BrdU é seletivamente incorporado ao DNA de células na fase S do ciclo celular. O uso de BrdU como um análogo da timidina, tornou possível a identificação de síntese de DNA em células em suspensão e de esfregaço e também em secções de tecido.

2.3. Carcinoma epidermoide oral

A carcinogênese é um processo complexo de muitas fases e depende de fenômenos genéticos e epigenéticos que culminam com o surgimento de clones de células imortais que adquirem a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e originar metástases em órgãos distantes (Filho, 2004).

Nas últimas décadas, os avanços no campo da pesquisa sobre a progressão e a patogênese do carcinoma epidermoide da cavidade oral foram significativos, levando a uma melhor compreensão da patogênese molecular e celular e a progressão do câncer na cavidade oral (Massano *et al.*, 2006).

Segundo dados divulgados pela OMS, o câncer oral e o de orofaringe são as neoplasias de cabeça e pescoço mais frequentes, com cerca de 390 mil novos casos por ano. A taxa de incidência está aumentando e a OMS prevê a continuidade desse aumento nas próximas décadas (Massano *et al.*, 2006).

O carcinoma epidermoide oral é o quinto tipo de câncer mais comum no mundo. Os fatores etiológicos são o uso de tabaco, associação álcool e tabaco e as infecções pelo papiloma vírus humano (HPV) principalmente pelos tipos 16 e 18 (López *et al.*, 2014; Inca, 2016). No entanto, cerca de 15% a 20% de todos os casos de câncer bucal ocorre em pacientes sem os fatores de risco tradicionais (Vargas-Ferreira *et al.*, 2012).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Foram estimados cerca de 300 mil casos novos no mundo, em 2012, sendo que, desses, aproximadamente dois terços são no sexo masculino. Para a mortalidade, foram estimados 145 mil óbitos por câncer no mundo, em 2012, com cerca de 80% ocorrendo em regiões menos favorecidas (Inca, 2016).

Para 2020, as estimativas são de que quase 60% dos novos casos de carcinoma epidermoide oral serão diagnosticados em países em desenvolvimento como o Brasil e é importante considerar que, pelo menos, 1/3 dos novos casos são evitáveis (Inca 2010).

Há um crescente interesse no estudo dos fatores moleculares de tumor, e alguns têm sido fortemente correlacionados com o resultado, mostrando caminhos promissores para o desenvolvimento futuro de sistemas mais eficazes de prognóstico e terapias anticâncer (Massano *et al.*, 2006).

Em estudos foi demonstrado que para um câncer se desenvolver são necessários algumas características celulares, como, auto sinalização para proliferação; insensibilidade a inibidores de crescimento; evasão de apoptose; replicação ilimitada – células imortais; angiogênese; aquisição da habilidade de invadir os tecidos (Hanahan e Weinberg, 2011).

Histopatologicamente, lesões morfológicamente semelhantes podem seguir cursos clínicos diferentes e mostrar diferentes respostas frente a mesma terapia, provavelmente como resultado de etiologia e heterogeneidade molecular e fatores ambientais. Essas lesões são frequentemente diagnosticadas numa fase tardia da doença, quando as chances de cura são menores e os tratamentos são mais agressivos. Vários fatores têm sido associados com o prognóstico do carcinoma epidermoide oral, dentre esses, a presença de metástases linfáticas, modificação anormal do gene, expressão alterada de genes e proteínas envolvidas em processos celulares (Chen e Myers, 2001; Montoro *et al.*, 2008).

Os tratamentos disponíveis atualmente para o carcinoma epidermoide oral incluem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, tratamentos combinados e prevenção da recidiva tumoral, sendo o objetivo final do tratamento erradicar o tumor, preservar ou restaurar forma e função, minimizar as sequelas do tratamento e evitar qualquer novo tumor primário (Sciubba, 2001; Barnes *et al.*, 2005; Bagan e Scully, 2008; Scully e Bagan, 2009).

Nas etapas biológicas das células, há vários fatores que atuam em conjunto que propiciam o desenvolvimento da neoplasia. Fatores tanto biológicos, quanto químicos ou físicos levam a uma modificação genética, fazendo com que a célula perca sua capacidade de proliferação, ocorrendo assim à formação de um tecido atípico e neoformação vascular (angiogênese), o que auxilia no desenvolvimento da neoplasia (Kumar *et al.*, 2005).

As GTPases Rho estão envolvidas no processo da formação das neoplasias e tem sido relatadas por contribuírem com a iniciação e progressão do câncer incluindo um potencial ilimitado de proliferação, sobrevivência, apoptose, invasão de tecidos e o estabelecimento de metástases (Vega e Ridley, 2008; Ridley, 2015).

Em neoplasias, diversos fatores de crescimento têm sido envolvidos na regulação da proliferação das células neoplásicas ativando a sinalização das GTPases Rho, Como: EGF, FGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator transformante beta (TGF β) e ácido lisofosfatídico (LPA) (Liu *et al.*, 2004).

Células epiteliais em cultura têm mostrado que Rho, Rac e Cdc42 podem contribuir para a progressão do ciclo celular em G1. Essas proteínas podem promover a progressão para a fase S (Olson, 2008).

A proteína Rho é necessária para impedir a expressão da p21, um inibidor do complexo ciclina G1/CDK. Considerando que Rac e Rho promovem a transcrição e tradução da ciclina D durante o ciclo, Rho e Cdc42 são necessários no final do ciclo celular para a formação de actina e miosina que separam as células-filhas (Mettouchi *et al.*, 2001).

2.4. GTPases Rho

As GTPases Rho são proteínas pertencentes à família das GTPases Rho, membros da superfamília RAS-Homology que são proteínas de baixo peso molecular que regulam vários processos biológicos das células como a morfogênese e citodiferenciação, migração, proliferação, polarização celular, apoptose, adesão célula-célula e adesão célula-matriz extracelular (MEC) (Etienne-Manneville e Hall, 2002; Boueux *et al.*, 2007). Uma mudança nessas proteínas, induzida mediante vinculação ao GTP, promove uma interação com proteínas alvo (efetoras) para gerar uma resposta celular (Hall, 2012). A desregulação das GTPases Rho está associado a inúmeras desordens e doenças humanas (Hall, 2012).

São aproximadamente 20 proteínas divididas em cinco grupos de acordo com a sequência primária e suas funções conhecidas: Rho-like (RhoA, RhoB e RhoC), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), Cdc42-like (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp/Wrch2), Rac-like (Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG) e Rho BTB. Alguns membros são menos conhecidos, se

enquadrando em outro grupo como: RhoD, Rif, e RhoH/TTF (Burrige e Wennerberg, 2004; Heasman e Ridley, 2008).

As proteínas Rho mais bem caracterizadas e amplamente encontradas expressas são: RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 (Hall, 2012). A participação dessas proteínas pode variar de acordo com o tipo celular e a composição da matriz extracelular (MEC) (Chiou *et al.*, 2003).

As proteínas Rho ciclam entre um estado ativo, onde ela está ligada ao GTP (activating proteins) e um estado inativo que está ligada ao GDP (Dissociation Inhibitors). Este ciclo é regulado por Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs), responsável pelo estímulo para a troca do GDP por GTP, e por GTPase- activating proteins (GAPs), que ativadas estimulam a hidrólise do GTP (Van Aelst e D'souza-Schorey, 1997; Kjoller e Hall, 1999; Hall, 2005; Ridley, 2015; Mishra e Lambright, 2016).

Quando as proteínas Rho estão na sua forma inativa as Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors (GDIs) se ligam a elas, formando um complexo que impede a troca do GDP por GTP (Takai *et al.*, 2001; Vega e Ridley, 2008).

A proteína Rho na forma ativa, ou seja, ligada ao GTP interage com suas várias efetoras (por exemplo: PAKs, efetor de Rac1 e Cdc42; ROCK efetor de RhoA, RhoB e RhoC) para obter as respostas celulares (Bishop e Hall, 2000).

A ativação da proteína Cdc42 pela proteína Rho na forma ativa leva à formação de filopódios e Rac1 a formação de lamelipódios na célula (Nobes e Marsh, 2000). A proteína RhoA quando ativada leva à formação de fibras de estresse e adesão focal da matriz extracelular. Enquanto RhoB regula a organização da actina e o transporte vesicular (Prendergast, 2001; Mazieres *et al.*, 2004). As proteínas RhoA e RhoB exibem uma atividade biológica divergente (Wheeler e Ridley, 2004).

As regulações das GTPases Rho são essenciais para a dinâmica do citoesqueleto de actina para manter a forma celular e permitir a motilidade celular e são críticas também durante a progressão do ciclo celular e mitose. As GTPases Rho e seus efetores estão envolvidos no arredondamento das células no início da mitose, no alinhamento dos cromossomos e são necessários para a contração do anel de actomiosina que separa as células filhas no final da mitose. Estudos recentes revelaram

como um número de fatores de troca de nucleotídeos e proteínas ativadoras de GTPase regulam a atividade das GTPases Rho durante estes processos (David et al., 2012).

Existem evidências das GTPases Rho na participação em processos relacionados com o câncer como a migração celular, proliferação celular, sobrevivência, crescimento, invasão e metástase. Mas, são responsáveis também pela contribuição em processos fisiológicos da célula (Bishop e Hall, 2000; Merajver e Usmani, 2005; Vega e Ridley, 2008; Feng e Lograsso, 2014; Ridley, 2015).

A Família das GTPases Rho (RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3 e Cdc42) estão envolvidas em transmitir fenótipos metastáticos em células cancerosas localizadas nos órgãos origem (Gómez Del Pulgar *et al.*, 2005; Kleer *et al.*, 2006).

Em células cancerígenas, a expressão das proteínas Rho pode estar desreguladas, mas parecem não estar mutadas, isso promove fenótipos malignos e também pode promover respostas terapêuticas (Prendergast, 2001).

A modulação de GTPases Rho (ativação e inativação) controla a expressão de genes progenitores da retina e a proliferação celular, respectivamente, nas células progenitoras epiteliais ciliares adultas/células-tronco de olhos de roedores. A modulação desses dois mecanismos diferentes (proliferação e reprogramação) pode fornecer uma nova abordagem potencial na reparação da retina (Del Debbio et al., 2014).

A proteína RhoA desregulada tem sido associada a todos os estágios de progressão do câncer. Essa proteína talvez desempenhe um papel na proliferação e sobrevivência das células neoplásicas. Quando ativada, RhoA, pode estimular a transformação *in vitro* (Jaffe e Hall, 2005). A proteína RhoB pode limitar a proliferação celular, sobrevivência, invasão e metástase. Durante a progressão maligna seus níveis geralmente são diminuídos demonstrando que RhoB apresenta uma função contrária as outras proteínas Rho (Prendergast, 2001). Essa proteína é pouco expressa em carcinoma pulmonar o que reforça seu papel supressor (Mazieres *et al.*, 2004). Já em carcinoma de mama, as GTPases RhoA e RhoB, foram relatados superexpressas e podem estar associadas com a progressão da doença (Fritz *et al.*, 2002). A expressão de RhoB é detectável em epitélio normal; no carcinoma *in situ* e bem diferenciado; e nos tumores

indiferenciados a expressão de RhoB é diminuída ou indetectável, o que sugere que RhoB pode ter um papel supressor de tumor em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (Adnane *et al.*, 2002).

Além de regular a resposta ao dano do DNA, RhoB pode afetar a proliferação celular e o crescimento tumoral regulando o movimento intracelular; por exemplo, RhoB é responsável pela triagem de EGFR para lisossomos e reciclagem, modulando assim as respostas mediadas por EGF. Também influencia o movimento de outras moléculas sinalizadoras incluindo as quinases Akt e Src. Os efetores que medeiam essas funções de Rho B ainda não são conhecidos. Em resumo, RhoB contribui para a progressão do câncer de várias maneiras, através da regulação das respostas ao dano do DNA, apoptose, progressão do ciclo celular, migração e invasão (Vega e Ridley, 2016).

Experimentos feitos por Western Blotting em imunohistoquímica verificaram o nível de expressão e atividade da proteína RhoC, e os resultados demonstraram que quando comparadas ao epitélio normal, essa proteína está altamente expressa em linhagem de células neoplásicas de cabeça e pescoço (Kleer *et al.*, 2006). Ainda por análise de imunohistoquímica, RhoC foi expressa em carcinoma epidermoide de esôfago, porém sua expressão não foi relacionada com grau de diferenciação (Zhang *et al.*, 2007). Estudos sugerem que RhoA e RhoC estejam envolvidos na progressão do carcinoma epidermoide de esôfago e sejam úteis como marcadores de prognóstico (Faried *et al.*, 2007).

A proteína Rac1 pode contribuir com a proliferação das células cancerígenas, estimulando a expressão de ciclina D1 e induzindo a transformação *in vitro* (Jaffe e Hall, 2005). A intensidade de marcação de Rac1 está relacionada com a progressão do carcinoma epidermoide oral (Liu *et al.*, 2004). Rac1 é pouco expressa em neoplasias benigna de mama (Schnelzer *et al.*, 2000). Em linhagens de células de carcinoma epidermoide oral, as proteínas GTPases Rho Rac1 e Cdc42 parecem ser importantes para a modulação da invasão celular através da regulação específica da via de sinalização de Vav2 (GEFs)(Lai *et al.*, 2008).

As GTPases Rho, incluindo Rac, Cdc42 e Rho, têm sido implicadas no estabelecimento de contatos de célula-célula e das interações célula-matriz cruciais para atingir um estado epitelial totalmente polarizado, e eles são conhecidos por sua regulação do

citoesqueleto de actina e ativação transcricional. As proteínas GTPases Rho em condições anormais, têm sido implicados na motilidade, invasão e alguns aspectos da metástase. São ativados por diferentes classes de receptores transmembranares e que transmitem sinais através de proteínas efetoras, na qual, levam à expressão de genes necessários para a mudança que acompanham esses processos (Schmitz *et al.*, 2000; Hanna e El-Sibai, 2013).

As funções das GTPases foram investigadas principalmente no que se refere a seus efeitos nos filamentos de actina (Kühn e Geyer, 2014). Rac e Cdc42 desempenham um papel na adesão célula-célula em células epiteliais em adição aos seus efeitos sobre o citoesqueleto de actina e a motilidade (Schmitz *et al.*, 2000). A família GTPases Rho também modulam a polaridade dinâmica dos microtúbulos das células (Amano, Nakayama, *et al.*, 2010).

As células migram de várias maneiras diferentes dependendo do seu ambiente, o que inclui a composição da matriz extracelular, interações com outras células e estímulos químicos. Para todos os tipos de migração celular, as GTPases Rho desempenham um papel central, embora a contribuição relativa de cada GTPases Rho dependa do ambiente e tipo de célula (Ridley, 2015).

Embora os papéis das proteínas Rho na progressão do tumor não serem completamente esclarecidos, diversos estudos têm indicado papéis contraditórios para as proteínas Rho (Karlsson *et al.*, 2009). Esses papéis podem ser conciliados se proteínas Rho possuírem funções diferentes em diferentes fases de desenvolvimento do tumor, podendo comprometer a validade da inibição da função da proteína Rho como uma estratégia antitumoral (Merajver e Usmani, 2005; Heasman e Ridley, 2008).

As GTPases Rho associadas as ROCKs promovem a fosforilação da cadeia leve da miosina o que resulta na contração do músculo liso e na interação da actina e miosina em células não musculares (Kimiura *et al.*, 1996). As ROCKs atuam inibindo a atividade da fosfatase e com isso promovem a fosforilação da miosina de cadeia leve e ocorre a contratilidade da actomiosina o que resulta na formação de fibras de estresse e adesão focal (Honjo *et al.*, 2001).

As ROCKs, efetoras das GTPases Rho, são os principais alvos terapêuticos na modulação da dinâmica do citoesqueleto da célula. Ao interromper essa dinâmica por meio da modulação das GTPases Rho, a integridade do tecido e a migração das células passam a ser influenciadas (Biro *et al.*, 2014).

Os resultados dos estudos com as GTPases Rho podem fornecer uma contribuição importante para a compreensão das vias de transdução de sinal reguladoras de processos biológicos envolvidos nas neoplasias (Vega e Ridley, 2008).

2.5. Proteínas ROCKs

As proteínas Rho associadas as quinases (ROCKs) são as efetoras mais bem caracterizadas das proteínas Rho, se ligam a uma forma ativada de Rho e participam da organização do citoesqueleto de actina, da formação das fibras de estresse e adesão focal e também estão associadas à patogênese e progressão de tumores humanos (Kamai *et al.*, 2003).

As ROCKs são cada vez mais reconhecidas como coordenadoras críticas de uma resposta tecidual frente a lesões, devido à sua capacidade de modular uma ampla gama de processos biológicos. Fazem parte da família de serina-treonina quinases e são as principais efetoras das proteínas GTPases Rho. A atividade de ROCKs desregulada tem sido implicada em várias condições fisiopatológicas humanas que variam de doenças cardiovasculares e renais a doenças fibróticas. Nos últimos anos, um papel importante para ROCKs na regulação de respostas imunes está sendo estudado (Pernis *et al.*, 2016).

As ROCKs, apresentam um papel importante em várias funções celulares, possui funções múltiplas através da fosforilação de um substrato específico, incluindo a regulação da contração celular, motilidade, morfologia, polaridade, divisão celular e expressão gênica. Existem dois membros de Rho-quinase, Rho-quinase ROCK1 ou ROCK2 que quando referenciados no coletivo chamamos de Rho-quinase (Amano, Nakayama, *et al.*, 2010).

Experimentos de silenciamento de genes, sugerem diferentes funções celulares para ROCK1 e ROCK2. ROCK1 parece ser essencial para a formação de fibras de estresse, e

ROCK2 parece ser necessário para a contração de fagocitose (Amano, Nakayama, *et al.*, 2010). As ROCKs participam da organização do citoesqueleto de actina, migração e manutenção do córtex celular e estão associadas à patogênese e progressão de tumores humanos (Kühn e Geyer, 2014; Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015).

A ativação de Rho, uma das proteínas da GTPases, promovem o desenvolvimento do câncer e metástases. Estudos mostraram que o aumento da expressão de Rho e a expressão ROCK, foram associados com a invasão tumoral, metástase e um prognóstico desfavorável em pacientes com câncer urotelial da bexiga ou do trato urinário superior (Abe *et al.*, 2014).

Vários substratos de ROCKs foram caracterizados, incluindo miosina de cadeia leve, fosfatases de cadeias leves da miosina, GAPs, proteínas de neurofilamentos (NF-1), e LIM quinases (LIMK1 e LIMK2), muito dos quais estão envolvidos na contratilidade da célula e organização do citoesqueleto, sugerindo o envolvimento da via Rho/ROCKs na migração celular, invasão, adesão célula-célula, contração da actomiosina, mitose e citocinese (Redowicz, 1999; Amano *et al.*, 2000; Somlyo e Somlyo, 2003; Amano *et al.*, 2010).

Além de seu papel na migração celular, ROCKs, foram relatados para modular a apoptose (Sebbagh *et al.*, 2005) e proliferação celular (Samuel *et al.*, 2011). O papel preciso das ROCKs na proliferação celular não é claro; alguns relatórios sugerem que ROCK é necessário para a progressão do ciclo celular na fase G1/S (Croft e Olson, 2006; Zhang *et al.*, 2009); mas, outros sugerem que ROCK é necessária apenas para a ancoragem independente do crescimento de células em transformação (Vigil *et al.*, 2012).

ROCK1 e ROCK2 desempenham os mesmos papéis, e as proteínas ROCK são indispensáveis para a proliferação celular e, portanto, para o desenvolvimento do tumor (Kümper *et al.*, 2016).

2.6. HA- 1077 e outros inibidores ROCKs

Os inibidores químicos mais utilizados de ROCKs são Fasudil® (Asano *et al.*, 1987) e Y-27632 (Uehata *et al.*, 1997). Estes inibidores têm mostrado efeitos benéficos numa variedade de modelos de doenças em animais, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativa e doenças inflamatórias, juntamente com vários tipos de câncer (Fukumoto e Shimokawa, 2013; Huang *et al.*, 2013; Morgan-Fisher *et al.*, 2013; Shi e Wei, 2013; Sawada e Liao, 2014; Watzlawick *et al.*, 2014; Knipe *et al.*, 2015).

O Fasudil® (HA-1077) [1-(5 Isoquinolinasulfonil)-homopiperazina] derivado de isoquinolona, é um inibidor de ROCKs bastante estudado e aprovado para tratamento clínico no Japão em 1995 (Li *et al.*, 2013). O HA-1077 é o princípio ativo do Fasudil®, um medicamento indicado para tratamento de doenças vasculares como vasoespasma cerebral ocorrido após hemorragia subaracnoidea, associado a sintomas isquêmicos em infarto cerebral (Olson, 2008), bem como hipertensão pulmonar (Fukumoto *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2015).

O Fasudil® atua na inibição das ROCKs, alguns estudos relatam a sua atividade antitumoral (Sasaki *et al.*, 2002; Takeba *et al.*, 2012). O HA-1077 bloqueia atividade das ROCKs por competir com o sítio de ligação do ATP (Amano, Nakayama, *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a expressão de ROCK 1 e ROCK 2 é diminuída significativamente por HA-1077 (Abe *et al.*, 2014).

A elevação da expressão de Rho e ROCK foi associada à invasão tumoral, metástase e prognóstico desfavorável em pacientes com câncer urotelial da bexiga ou do trato urinário superior. O ácido lisofosfatídico (LPA) e o geranylgeraniol (GGOH) induziram o aumento da proliferação e migração celular em associação com a promoção da atividade de RhoA e a regulação positiva da expressão de ROCK. O inibidor de ROCK Fasudil® (HA-1077) suprimiu a proliferação e migração celular, e também induziu a apoptose de forma dependente da dose. O HA-1077 suprimiu a expressão de ROCK 1 e ROCK 2, mas não afetou a atividade de RhoA (Abe *et al.*, 2014).

Previamente, nosso laboratório relatou o efeito inibitório de HA-1077 sobre a migração e a invasão celular, sugerindo que o HA-1077 possa ter um potencial

terapêutico na prevenção de metástases de carcinoma epidermoide oral, provavelmente por exercer um papel importante nos processos da via de transdução de sinal Rho/ROCK (Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015).

O Fasudil® inibe a proliferação, migração, apoptose e síntese de colágeno através da supressão da via Rho/ROCK e pode ter potencial terapêutico na doença da estenose uretral (Xu *et al.*, 2017).

O Y-27632 dicloridrato de [(+) - (R) - *trans*-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida] é usado como um inibidor específico da família de ROCKs por explorar uma variedade de papéis das ROCKs na fisiopatologia, incluindo as neoplasias (Xue *et al.*, 2012). O Y-27632 tem sido amplamente utilizado como um inibidor de ROCK para identificar e avaliar o envolvimento e os papéis de ROCK em uma variedade de sistemas, incluindo a ativação de plaquetas (Fu *et al.*, 1998; Klages *et al.*, 1999), respostas induzidas por trombina de células do músculo liso aórtico (Seasholtz *et al.*, 1999), hipertrofia de cardiomiócitos (Kuwahara *et al.*, 1999), contração do músculo liso brônquico (Yoshii *et al.*, 1999), a ativação de canais de aniões regulados por volume (Nilius *et al.*, 1999), a retração neurítica (Hirose *et al.*, 1998), a quimiotaxia de neutrófilos e cicatrização de feridas (Niggli, 1999), invasão tumoral (Itoh *et al.*, 1999) e transformação celular (Sahai *et al.*, 1999).

As proteínas ROCKs desempenham um papel funcional importante na regulação da proliferação celular em carcinoma epidermoide oral, uma vez que a inibição das ROCKs com HA-1077 e/ou o Y-27632 têm um efeito inibitório sobre a proliferação de células da linhagem SCC-4.

4.1. Objetivo geral

Avaliar o papel funcional das ROCKs na regulação da proliferação de células de carcinoma epidermoide oral SCC-4 *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar o número de células SCC-4, controle e tratadas com HA-1077 e/ou Y-27632 (inibidores das ROCKs), que incorporam BrdU, um marcador de proliferação celular.
- Comparar o número de células SCC-4, controle e tratadas com HA-1077 e/ou Y-27632, que imunoexpressam KI-67, um marcador de proliferação celular.

5.1. Reagentes

HA-1077 O [1-(5 *Isoquinolinasulfonil*)-homopiperazina], bromodeoxyuridine (BrdU), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Penicilina/Estreptomicina, *Dimethylsulfoxide* (DMSO), *bovine serum albumin* (BSA), Triton X-100 0,2%, paraformaldeído e os sais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O Y-27632 foi adquirido do Calbiochem (San Diego, CA, USA). O anticorpo contra KI-67 (MIB-1, sc-101861) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), e o anticorpo contra BrdU, da Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). O anticorpo secundário Alexa-488-labeled foi obtido da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultilab (Campinas, SP). A hidrocortisona foi obtida da Ariston (São Paulo, SP).

5.2. Casuística

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

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

As células SCC-4 foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium F-12* (DMEM-F12), contendo SFB 10%, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina e 400 ng/mL de Hidrocortisona, em incubadora úmida com atmosfera 5% CO₂/95% ar a 37°C. O meio foi trocado a cada dois dias. Após as células atingirem a semi-confluência, foram realizados os experimentos.

5.4. Ensaios de proliferação celular

Os experimentos de incorporação de BrdU e imunexpressão de KI-67, para análise do efeito do HA-1077 e do Y-27632 sobre a taxa de proliferação celular em carcinoma epidermoide oral, foram realizados em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais.

Cerca de 1×10^4 células SCC-4 foram semeadas em placas de seis poços contendo lamínulas de vidro e cultivadas por 24 h em incubadora úmida com atmosfera 5% CO₂/95% ar a 37°C.

Para o ensaio de incorporação de BrdU, foi trocado o meio das células controle e foram adicionados ao meio das células tratadas: HA-1077 em três concentrações 25 µM, 50 µM e 100 µM; Y-27632 30 µM; e HA-1077 50 µM associado ao Y-27632 30 µM. E, foi adicionado 0,5 µg/mL de BrdU ao meio das células SCC-4 controle e tratadas. As células foram incubadas por 6 e 24 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO₂/95% ar a 37°C.

Para o ensaio de imunexpressão de KI-67, nos poços com células controle foi adicionado apenas meio. Nos poços com células tratadas, foram adicionados ao meio os tratamentos: HA-1077 em três concentrações 25 µM, 50 µM e 100 µM; Y-27632 30 µM; e HA-1077 50 µM associado ao Y-27632 30 µM. As células foram incubadas por 6 horas em incubadora úmida com atmosfera 5% CO₂/95% ar a 37°C.

5.5. Reações imunocitoquímicas

Após o período de tratamento, as células foram lavadas 2x/5min com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) com cálcio e magnésio. Logo após, a fixação foi feita com paraformaldeído 4% por 1 h. As células foram lavadas 2x/5min em D-PBS. No ensaio de incorporação de BrdU, foi feita a incubação com HCl 1 N por 1 h a 37°C. Após lavagem com D-PBS 2x/5 min, 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. A incubação com os anticorpos primários contra BrdU e contra KI-67 na diluição 1:50 em D-PBS/BSA 0,1% foi realizada por 16 h em câmara úmida em temperatura ambiente. Após lavagem com D-PBS 2x/10min, as amostras foram incubadas com anticorpo

secundário marcado com Alexa 488, 1:1000 em DPBS/BSA 0,1% por 2 h em ambiente escuro, câmara úmida a temperatura ambiente. Após lavagem com D-PBS 2x/10min, a evidenciação dos núcleos foi feita com DAPI 1:500 à temperatura ambiente. Após lavagem com D-PBS 2x/5min, as lâminas foram montadas com glicerol-carbonato.

5.6. Morfometria

As células controle e as células tratadas foram avaliadas em dez campos aleatórios em microscópio de fluorescência. Foram quantificados os núcleos de todas as células marcados com DAPI (100%) e das células positivas para BrdU e KI-67. O percentual de células positivas para BrdU e KI-67 foram calculados utilizando o programa Excel®.

5.7. Análise Estatística

Os resultados foram analisados com o programa SPSS 16.0® e os gráficos feitos com o programa Graphpad Prism®. A distribuição foi analisada por meio do teste de variância de Levene. Foram utilizados testes paramétricos: análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6.1. Efeito da inibição das proteínas ROCKs com HA-1077 sobre a proliferação de células SCC-4

O tratamento com HA-1077 por 6 h inibiu a taxa de proliferação das células SCC-4 [$F(3,11) = 107,461$, $p < 0,0001$]. Quando comparado com o número de células que incorporaram de BrdU (proliferativas) controle ($50,98 \pm 4,32$ células), o número de células proliferativas foi significativamente menor nas três concentrações de HA-1077 estudadas: 25 μM ($37,22 \pm 1,29$ células, $p < 0,001$), 50 μM ($25,73 \pm 2,61$ células, $p < 0,0001$) e 100 μM ($13,54 \pm 1,18$ células, $p < 0,0001$); de modo dependente da dose: 25 vs 50 μM ($p < 0,01$), 25 vs 100 μM ($p < 0,0001$) e 50 vs 100 μM ($p < 0,01$), (Figura 1).

Do mesmo modo, o tratamento com HA-1077 por 24 horas inibiu a taxa de proliferação das células SCC-4 [$F(3,11) = 167,433$, $p < 0,0001$]. O número de células proliferativas foi significativamente reduzido após tratamento com HA-1077 nas concentrações estudadas: 25 μM ($15,56 \pm 0,99$ células, $p < 0,0001$), 50 μM ($13,14 \pm 0,89$ células, $p < 0,0001$) e 100 μM ($10,19 \pm 0,09$ células, $p < 0,0001$), em comparação com o número de células controle ($25,45 \pm 1,15$ células); de modo dependente da dose: 25 vs 50 μM ($p < 0,05$), 25 vs 100 μM ($p < 0,0001$) e 50 vs 100 μM ($p < 0,05$), (Figura 2).

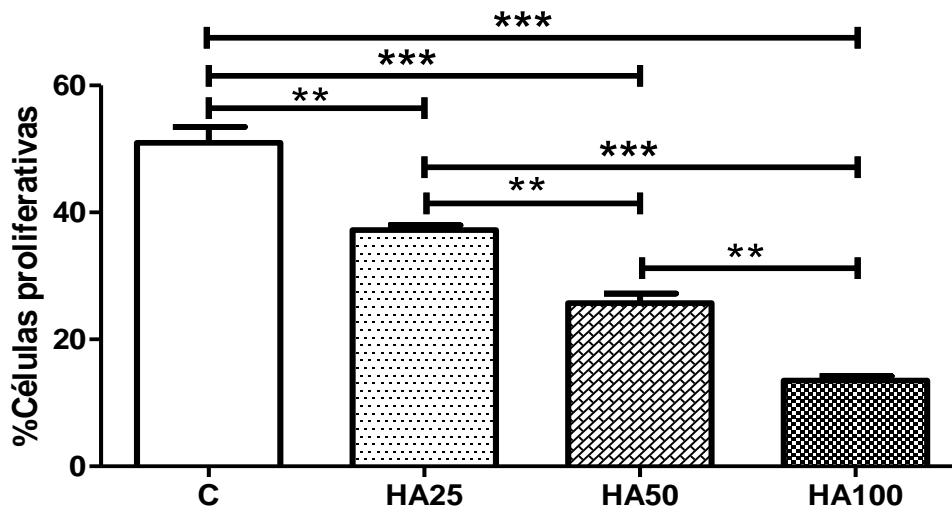


Figura 1 - Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de incorporação de BrdU por 6 horas. Porcentagem de células SCC-4 proliferativas controle (C) e células SCC-4 tratadas com HA-1077: 25 μ M (HA25), 50 μ M (HA50) e 100 μ M (HA100). * p <0,05, ** p <0,001 e *** p <0,0001.

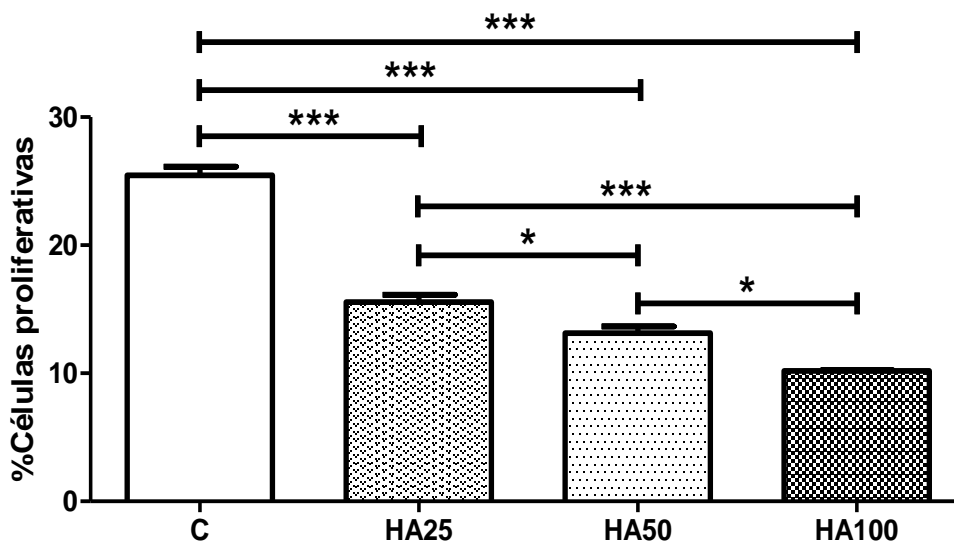


Figura 2 - Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de incorporação de BrdU por 24 horas. Porcentagem de células SCC-4 proliferativas controle (C) e células SCC-4 tratadas com HA-1077: 25 μ M (HA25), 50 μ M (HA50) e 100 μ M (HA100). * p <0,05, ** p <0,001 e *** p <0,0001.

6.2. Efeito da inibição das proteínas ROCKs com HA-1077 e/ou Y-27632 sobre a proliferação de células SCC-4

O tratamento com HA-1077 e/ou Y-27632 por 6 h inibiu a taxa de proliferação das células SCC-4 [$F(5,17) = 443,818$, $p < 0,0001$], nas concentrações estudadas. Quando comparado com o número de células controle ($49,22 \pm 1,68$ células) que incorporaram BrdU (proliferativas), a quantidade de células proliferativas foi significativamente menor nas amostras tratadas com HA-1077, nas concentrações: 25 μM ($32,07 \pm 1,76$ células, $p < 0,0001$), 50 μM ($23,02 \pm 1,07$ células, $p < 0,0001$) e 100 μM ($13,07 \pm 0,75$ células, $p < 0,0001$). Também, foi significativamente menor que o controle, o número de células proliferativas tratadas com HA-1077 50 μM associado com Y-27632 30 μM ($12,73 \pm 1,07$ células, $p < 0,0001$) e, com Y-27632 30 μM ($11,80 \pm 0,18$ células, $p < 0,0001$), (Figura 3).

A imunexpressão de KI-67 (marcador de proliferação celular) em células SCC-4 controle e tratadas HA-1077 e/ou Y-27632 por 6 h demonstrou resultados similares aos observados por meio de ensaio de incorporação de BrdU. O tratamento com HA-1077 e/ou Y-27632 inibiu a taxa de proliferação das células SCC-4 [$F(5,17) = 192,595$, $p < 0,0001$], nas concentrações estudadas. Quando comparado com o número de células controle ($35,01 \pm 1,67$ células), o número de células que imunexpressaram KI-67 (proliferativas) foi significativamente menor nas amostras tratadas com HA-1077, nas concentrações: 25 μM ($20,76 \pm 0,70$ células, $p < 0,0001$), 50 μM ($19,04 \pm 0,42$ células, $p < 0,0001$), 100 μM ($13,46 \pm 0,49$ células, $p < 0,0001$). Também, foi significativamente menor que o controle, o número de células proliferativas tratadas com HA-1077 50 μM associado com Y-27632 30 μM ($16,81 \pm 0,98$ células, $p < 0,0001$) e, com Y-27632 30 μM ($12,64 \pm 1,23$ células, $p < 0,0001$), (Figura 4).

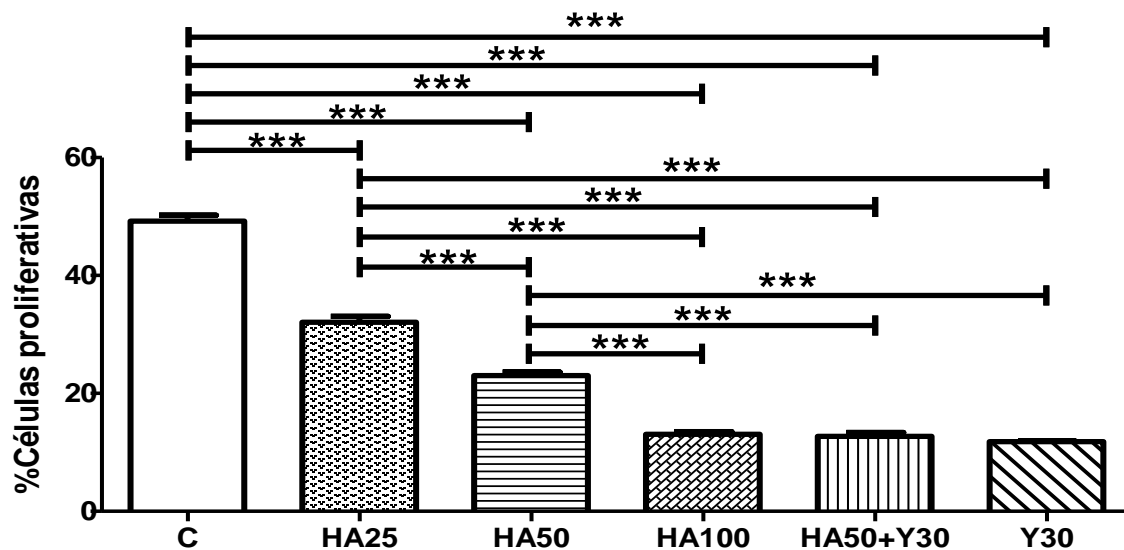


Figura 3 - Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de incorporação de BrdU por 6 horas. Porcentagem de células SCC-4 proliferativas controle (C) e células SCC-4 tratadas com HA-1077: 25 μ M (HA25), 50 μ M (HA50), 100 μ M (HA100), HA-1077 50 μ M associado ao Y-27632 30 μ M (HA50+Y30) e Y-27632 30 μ M (Y30). * p <0,05, ** p <0,001 e *** p <0,0001.

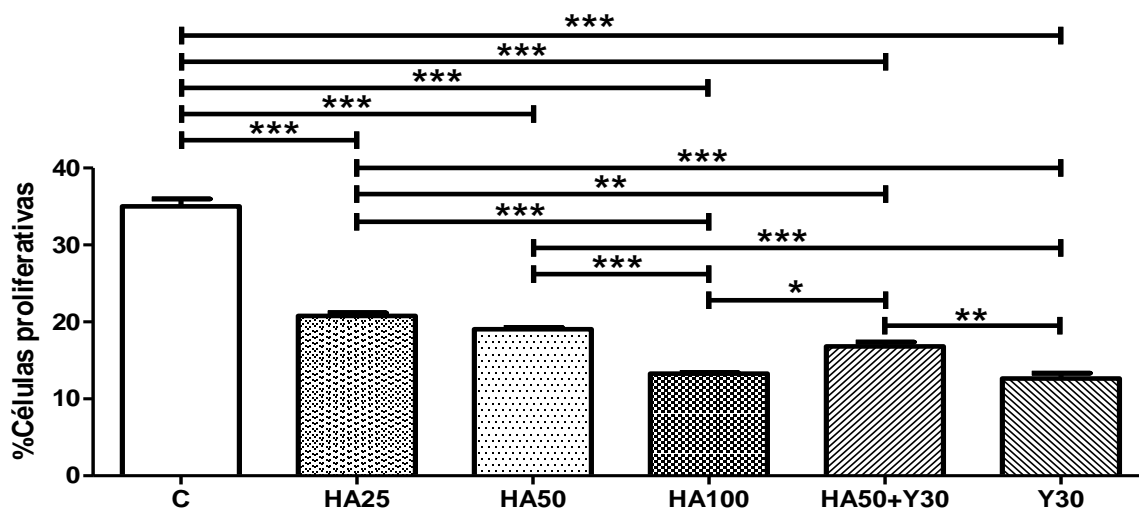


Figura 4 - Efeito do HA-1077 sobre a proliferação celular de células de carcinoma epidermoide oral, *in vitro*. Ensaio de imunexpressão de KI-67 por 6 horas. Porcentagem de células SCC-4 proliferativas controle (C) e células SCC-4 tratadas com HA-1077: 25 μ M (HA25), 50 μ M (HA50), 100 μ M (HA100), HA-1077 50 μ M associado ao Y-27632 30 μ M (HA50+Y30) e Y-27632 30 μ M (Y30). * p <0,05, ** p <0,001 e *** p <0,0001.

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral humano, para avaliar a proliferação celular. Demonstramos os efeitos inibitórios de HA-1077 na proliferação celular, sugerindo que o HA-1077 possa ter um potencial terapêutico na inibição da proliferação celular, provavelmente por exercer um papel importante nos processos da via de transdução de sinal Rho/ROCKs.

As GTPases Rho estão envolvidas com a progressão do câncer em vários órgãos, incluindo mama (Liao *et al.*, 2012), pulmão (Ma *et al.*, 2010) e colorretal (Wang *et al.*, 2010). Contribuem para a regulação de vários processos biológicos, incluindo morfologia, adesão, polaridade celular, progressão do ciclo celular, apoptose sobrevivência, e o tráfego na membrana (Etienne-Manneville e Hall, 2002; Boureux *et al.*, 2007; Ridley, 2015).

A desregulação de proteína Rho, tem sido associada a estágios de progressão do câncer. A proteína RhoA possivelmente desempenha um papel na proliferação e sobrevivência das células neoplásicas (Jaffe e Hall, 2005). A proteína RhoB pode limitar a proliferação celular, sobrevivência, invasão e metástase. Durante a progressão tumoral, seus níveis geralmente estão diminuídos demonstrando que RhoB apresenta uma função contrária as outras proteínas Rho (Prendergast, 2001; Vega e Ridley, 2016). Em carcinoma de mama, as GTPases RhoA e RhoB, estão superexpressas e podem estar associadas com a progressão da doença (Fritz *et al.*, 2002). A expressão de RhoB é detectável em epitélio normal, carcinoma *in situ* bem diferenciado, já em tumores indiferenciados sua expressão é diminuída ou indetectável, sugerindo que essa proteína possua um papel supressor de tumor em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (Adnane *et al.*, 2002). A proteína Rac1 pode contribuir com a proliferação das células cancerígenas, estimulando a expressão de ciclina D1 e induzindo a transformação maligna *in vitro* (Jaffe e Hall, 2005).

As GTPases Rho, Rac1 e Cdc42 parecem ser importantes para a modulação da invasão celular através da regulação específica da via de sinalização de Vav2 (GEFs) (Lai *et al.*, 2008). São capazes de interagir com diferentes proteínas em uma forma dependente do GTP, indicando que cada uma regula numerosos sinais distintos nas vias de transdução (Hall, 2012). Os resultados deste estudo sugerem que a via de sinalização

Rho/ROCKs pode ter um papel importante nas vias de sinalização que regulam a proliferação celular.

Devido às funções atribuídas às proteínas ROCKs e suas relações na tumorigênese e prognóstico de diversos tumores, inibidores de ROCKs têm sido amplamente utilizados em estudos científicos para avaliar sua ação antitumoral. Estas moléculas afetam processos como proliferação, invasão e migração dos mais variados tipos tumorais, além de já terem sido descritos como potencializadores de agentes quimioterápicos e da radioterapia (Chin *et al.*, 2015).

No presente trabalho foram HA-1077 e Y-27632, que são inibidores específicos de ROCKs. Essas drogas já foram descritas por possuir alta eficácia e por agirem no sítio de ATP das proteínas ROCKs, impedindo que as proteínas fosforilem seus alvos (Abe *et al.*, 2014; Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016).

Neste estudo foi observado que o tratamento com HA-1077 diminuiu o número de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral proliferativas de modo dependente da dose. Estes achados concordam com estudos que demonstraram o efeito inibitório sobre a proliferação e migração celular em células de câncer urotelial, sugerindo que HA-1077 possa ter um potencial terapêutico na prevenção de metástases, provavelmente por exercer um papel importante nos processos da via de transdução de sinal Rho/ROCKs (Abe *et al.*, 2014).

As células SCC-4 tratadas com Y-27632, também apresentaram uma redução do número de células que proliferaram. Em acordo com o estudo que utilizou as linhagens celulares Tca8113 e CAL-27 de carcinoma escamoso de língua, inibindo crescimento do carcinoma *in vitro* (Wang *et al.*, 2016).

Em outros estudos foi demonstrado que o Fasudil®, medicamento que tem como princípio ativo o HA-1077, inibiu a proliferação e síntese de colágeno e induziu a apoptose de fibroblastos humanos derivados da cicatriz uretral através da via de sinalização Rho/ROCK (Xu *et al.*, 2017); já em estudos que utilizou o HA-1077 reduziu a proliferação, migração e induziu a apoptose de células de câncer urotelial (Abe *et al.*, 2014), além de inibir a migração e invasão de células de carcinoma epidermoide oral (Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015).

A presença de alteração significativa após o tratamento com as drogas pode ser consequência da superexpressão de ROCK1 e ROCK2, ou simplesmente pelo fato que diferentes tipos celulares respondem a drogas de formas distintas. A atividade de ROCKs pode promover a proliferação em alguns tipos celulares assim como pode ter papel anti-proliferativo em outros, citando como exemplo a inibição de ROCKs em queratinócitos humanos que resulta no aumento da proliferação celular e diminuição da diferenciação celular (Julian e Olson, 2014).

Vários autores demonstraram que a inibição da via de ROCKs diminuiu proliferação, migração e invasão celular em diferentes tumores (Reymond *et al.*, 2015), citam a via RhoC/ROCK como alvo terapêutico para redução de metástase a partir da interação com células endoteliais (Sun *et al.*, 2016), encontraram a atenuação da via RhoA/ROCK/MMPs a partir do tratamento com curcumina em linhagem de células de câncer de mama, inibindo assim a invasão celular.

O inibidor específico das ROCKs, Y-27632, reduziu a capacidade de migração e invasão de linhagens celulares de carcinoma hepatocelular, de forma dose dependente (Zhang *et al.*, 2015). Similarmente, em linhagens celulares de câncer de próstata, observaram a diminuição da migração e invasão celular por meio da transfecção do microRNA-135a, que diminuiu a expressão das proteínas ROCK1 e ROCK2 (Kroiss *et al.*, 2015).

Neste estudo, ao associar os inibidores HA-1077 e Y-27632, a diminuição da proliferação celular nas células SCC-4 foi semelhante às tratadas apenas com Y-27632, no entanto, não foi encontrado na literatura estudos com ensaios de associação dos dois inibidores para proliferação celular, mas, para migração e invasão celular mostrou efeitos semelhantes (Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015).

ROCK1 e ROCK2 apresentam diferenças funcionais na regulação da adesão, migração, proliferação e expressão gênica, mas os mecanismos subjacentes não são totalmente compreendidos (Inaba *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2013; Rochelle *et al.*, 2013; Mertsch e Thanos, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Em estudo avaliando efeitos diferentes na deleção de ROCK1 e ROCK2 na proliferação e migração celular em células *Knockdown* encontraram diferentes efeitos: a deleção de ROCK1 diminuiu a migração celular e a deleção de ROCK2 aumentou a migração

celular. Quanto a proliferação celular, a deleção de ROCK1 levou a uma diminuição da proliferação, ao contrário da deleção de ROCK2, que resultou num aumento da proliferação celular (Mertsch e Thanos, 2014).

Em células de retinoblastoma, a inibição de ROCK 1 com siRNA aumentou a adesão e diminuiu a capacidade invasiva de forma semelhante à inibição de ROCK por Y-27632, mas, não foi observado efeito após a inibição de ROCK2, possivelmente devido a uma menor expressão de ROCK2 do que ROCK1 nessas células (Wang *et al.*, 2014). Em contrapartida, houve a redução da proliferação e migração celular em células de glioblastoma com a diminuição de ROCK1 por siRNA de forma semelhante à inibição de ROCK por Y-27632. Já a inibição de ROCK2 aumentou a proliferação e migração celular (Mertsch e Thanos, 2014). Estes estudos sugerem que a inibição de uma isoforma ROCK em células tumorais pode inibir a tumorigenicidade de forma semelhante à inibição geral de ROCK (Mertsch e Thanos, 2014; Wang *et al.*, 2014).

O papel da via Rho/ROCK no desenvolvimento de tumores tem sido descrito utilizando inibidores específicos de ROCK, Y-27632 ou Fasudil® (Takeba *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). Portanto, nosso estudo sugere que a via de Rho/ROCK participa de processos celulares que regulam a proliferação celular em células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral.

O controle da progressão do ciclo celular em células cancerígenas é considerado uma estratégia eficaz para a inibição do crescimento tumoral (Graña e Reddy, 1995). Para compreender os mecanismos de progressão do ciclo celular, estudos associaram a ciclina D1/2 como promotora da aceleração da transição da fase G1 para S e também por promover o crescimento e divisão celular, a sua expressão é considerada um fator importante para a promoção de ocorrência e desenvolvimento do tumor (Raisova *et al.*, 2000; Sauter *et al.*, 2002). A superexpressão de p27 foi associada com a inibição da ativação de quinase dependente de ciclina (CDK) e a entrada na fase S do ciclo celular (Leethanakul *et al.*, 2000). A perda da sua função pode, subsequentemente, contribuir para a tumorigênese (Choi *et al.*, 2003).

A expressão reduzida de p27 foi encontrada nos cânceres gástricos, de mama e de células do pulmão (Kuropkat *et al.*, 1999), e correlacionada com o mau prognóstico nos

canceres de cabeça e pescoço (Mineta *et al.*, 1999). A ativação de RhoA, degrada p27 induzindo a proliferação celular do câncer, estando também relacionado com a via de sinalização de VEGFA/NRP1 formando um complexo GIPC1/Syx que ativa RhoA (Yoshida *et al.*, 2015).

Alguns estudos indicaram que RhoA regula principalmente a progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Mammoto *et al.*, 2004), e tem sido associada à transcrição de p21 e ciclina D1 e degradação de p27 através da regulação da atividade da ciclina E/CDK (David *et al.*, 2012).

Em concordância, estudos mostram que a ativação de RhoA/ROCK nas células do estroma que rodeiam células estaminais de câncer de mieloma múltiplo apresentaram um maior potencial de contração celular, levando a uma remodelação da matriz de colágeno promovendo interação célula-célula, aumento de proliferação, migração e metástase (Choi *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015). O silenciamento de RhoA reduziu significativamente o crescimento tumoral, diminuindo os níveis de Gal-3, β -catenina, MMP-9 e ciclina D1/2, e aumentou os níveis de p21 e p27 levando a inibição da migração, invasão e proliferação celular (Yan *et al.*, 2014).

De acordo com alguns estudos, foi demonstrado que o Fasudil® induz mudanças na proliferação em células de câncer de bexiga e pulmão (Zhu *et al.*, 2011; Abe *et al.*, 2014) e em células de glioblastoma (Deng *et al.*, 2010). Como também, o Y-27632 causa mudanças morfológicas em células de carcinoma epidermoide oral SCC-4, Tca8113 e CAL-27 (Moreira Carboni, S. S. *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016), assim, estando Fasudil® e Y-27632, relacionado com a inibição da invasão tumoral e transformação celular (Feng e Lograsso, 2014).

Em concordância, entre os estudos recentes, o tratamento com Y-27632 reduziu a invasão e migração de células de câncer da mama in vitro e metástase in vivo em modelos experimentais de camundongos (Liu *et al.*, 2009); invasão e migração das linhagens celulares CaOV3 e SKOV-3 de câncer do ovário (Jeong *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2012); diminuiu o potencial invasivo das células da linhagem SW620 de câncer do colorretal (De Toledo *et al.*, 2012). E Fasudil® suprimiu a proliferação, migração e invasão de células da linhagem A-549 de câncer de pulmão (Zhu *et al.*, 2011) e de

carcinoma hepatocelular (Mikuriya *et al.*, 2015). Tal modo neste estudo, HA-1077 e também Y-27632 inibiram a proliferação celular de células SCC-4 de carcinoma epidermoide oral de modo dose dependente.

Em contrapartida, Y-27632 ativou células da linhagem MCF-7 quiescentes de câncer da mama ativadas através da desintegração de junções de células acopladas com a perda de E-caderina e p-catenina da membrana celular, levando ao aumento da migração e invasão em substratos bidimensionais e tridimensionais (Yang e Kim, 2014). Em concordância, o aumento da invasão de células da linhagem SW620 de câncer de cólon em matriz de colágeno tridimensional, mas não em matriz bidimensional (Vishnubhotla *et al.*, 2012). Juntos, estes estudos revelam que a contribuição da sinalização Rho/ROCK para a migração das células cancerígenas varia dependendo da linhagem celular testada e do microambiente circundante o que pode acontecer também com a proliferação celular (Vishnubhotla *et al.*, 2012; Yang e Kim, 2014).

Vários relatos indicam que a inibição de ROCKs diminui a proliferação de células tumorais e a angiogênese (Chen *et al.*, 2014). Em células da linhagem 95D de carcinoma de pulmão, o tratamento com Fasudil® inibiu a proliferação (Yang *et al.*, 2010); assim como reduziu significativamente a angiogênese de células endoteliais condicionadas por carcinoma de pulmão (Zhang *et al.*, 2012).

As diferenças funcionais para ROCK1 e ROCK2 em células tumorais e não tumorais podem ser explicadas por variações em seus níveis de expressão, localizações subcelulares e parceiros de interação em tipos de células individuais (Amano, Tsumura, *et al.*, 2010; Morgan-Fisher *et al.*, 2013; Schofield e Bernard, 2013; Wei *et al.*, 2016). Mais investigações sobre a função das isoformas ROCKs no câncer são necessárias para elucidar os mecanismos subjacentes das suas diferenças funcionais e determinar a isoforma funcional predominante nos tipos de tumor relevantes e na via relacionada com a proliferação celular. Estudos futuros serão necessários para avaliar os efeitos do HA-1077 em outros processos que envolvem carcinogênese.

Os resultados obtidos sugerem as proteínas ROCKs desempenham um papel funcional importante na regulação da proliferação celular em carcinoma epidermoide oral.

- O tratamento com HA-1077 e/ou o Y-27632, inibidores de ROCKs, têm um efeito inibitório sobre o número de células SCC-4 que incorporaram o BrdU (marcador de células proliferativas), portanto reduzem a taxa de proliferação.

- O tratamento com HA-1077 e/ou o Y-27632 têm um efeito inibitório sobre o número de células SCC-4 que imunoexpressam KI-67 (marcador de células proliferativas), portanto reduzem a taxa de proliferação.

ABE, H. et al. The Rho-kinase inhibitor HA-1077 suppresses proliferation/migration and induces apoptosis of urothelial cancer cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 412, 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24908363> >.

ADNANE, J. et al. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 7, p. 2225-32, Jul 2002. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114424> >.

ALBERTS, B. E. A. **Molecular Biology of The Cell** 5^a. 2008. 1268.

AMANO, M.; NAKAYAMA, M.; KAIBUCHI, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 67, n. 9, p. 545-54, Sep 2010. ISSN 1949-3592. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803696> >.

AMANO, M. et al. A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8704, Jan 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090853> >.

ASANO, T. et al. Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 241, n. 3, p. 1033-40, Jun 1987. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3598899> >.

BAGAN, J. V.; SCULLY, C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. **Oral Oncol**, v. 44, n. 2, p. 103-8, Feb 2008. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252251> >.

_____. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. **Oral Oncol**, v. 45, n. 7, p. e45-8, Jul 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196543> >.

BARNES, L.; EVERSON, J. W.; REICHART, P. **World health organization**

classification of tumours pathology and genetics of head and neck tumours. 2005.

BIRO, M.; MUNOZ, M. A.; WENINGER, W. Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 24, p. 5491-506, Dec 2014. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24571448> >.

BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem J**, v. 348 Pt 2, p. 241-55, Jun 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816416> >.

BOUREUX, A. et al. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 1, p. 203-16, Jan 2007. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035353> >.

- BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 167-79, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744429> >.
- CHEN, A. Y.; MYERS, J. N. Cancer of the oral cavity. **Dis Mon**, v. 47, n. 7, p. 275-361, Jul 2001. ISSN 0011-5029. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477373> >.
- CHEN, W. et al. The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). **Oncol Lett**, v. 8, n. 5, p. 1907-1911, Nov 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25289078> >.
- CHIN, V. T. et al. Rho-associated kinase signalling and the cancer microenvironment: novel biological implications and therapeutic opportunities. **Expert Rev Mol Med**, v. 17, p. e17, Oct 2015. ISSN 1462-3994. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26507949> >.
- CHIOU, W. F. et al. Piperlactam S suppresses macrophage migration by impeding F-actin polymerization and filopodia extension. **Eur J Pharmacol**, v. 458, n. 1-2, p. 217-25, Jan 2003. ISSN 0014-2999. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498929> >.
- CHOI, D. S. et al. SDF-1 α stiffens myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells through the activation of RhoA-ROCK-Myosin II. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E219-29, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25137150> >.
- CHOI, H. R. et al. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. **Int J Oncol**, v. 22, n. 2, p. 409-14, Feb 2003. ISSN 1019-6439. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527941> >.
- CROFT, D. R.; OLSON, M. F. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 12, p. 4612-27, Jun 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738326> >.
- DAVID, M.; PETIT, D.; BERTOGLIO, J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. **Cell Cycle**, v. 11, n. 16, p. 3003-10, Aug 2012. ISSN 1551-4005. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825247> >.
- DE TOLEDO, M. et al. Cooperative anti-invasive effect of Cdc42/Rac1 activation and ROCK inhibition in SW620 colorectal cancer cells with elevated blebbing activity. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48344, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144867> >.

DENG, L. et al. Rho-kinase inhibitor, fasudil, suppresses glioblastoma cell line progression in vitro and in vivo. **Cancer Biol Ther**, v. 9, n. 11, p. 875-84, Jun 2010. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364104> >.

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

FARIED, A. et al. Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 14, n. 12, p. 3593-601, Dec 2007. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896152> >.

FEHRENBACH, M. J.; HERRING, S. W. **ANATOMIA ILUSTRADA DA CABEÇA E PESCOÇO ANATOMIA ILUSTRADA DA CABEÇA E PESCOÇO** 2ª edição: 2005.

FENG, Y.; LOGRASSO, P. V. Rho kinase inhibitors: a patent review (2012 - 2013). **Expert Opin Ther Pat**, v. 24, n. 3, p. 295-307, Mar 2014. ISSN 1744-7674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283930> >.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FRITZ, G. et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **Br J Cancer**, v. 87, n. 6, p. 635-44, Sep 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237774> >.

FU, X. et al. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. **FEBS Lett**, v. 440, n. 1-2, p. 183-7, Nov 1998. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862451> >.

FUKUMOTO, Y. et al. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. **Heart**, v. 91, n. 3, p. 391-2, Mar 2005. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710736> >.

FUKUMOTO, Y.; SHIMOKAWA, H. Rho-kinase inhibitors. **Handb Exp Pharmacol**, v. 218, p. 351-63, 2013. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092347> >.

GRAÑA, X.; REDDY, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, n. 2, p. 211-9, Jul 1995. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624138> >.

GRINSPAN, D. **Enfermedades de la boca**. Buenos Aires: 1980.

GÓMEZ DEL PULGAR, T. et al. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. **Bioessays**, v. 27, n. 6, p. 602-13, Jun 2005. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892119> >.

HALL, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 891-5, Nov 2005. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246005> >.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. 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> >.

HANNA, S.; EL-SIBAI, M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. **Cell Signal**, v. 25, n. 10, p. 1955-61, Oct 2013. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669310> >.

HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 690-701, Sep 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719708> >.

HIROSE, M. et al. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. **J Cell Biol**, v. 141, n. 7, p. 1625-36, Jun 1998. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647654> >.

HUANG, H. et al. Metabolic actions of Rho-kinase in periphery and brain. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, n. 10, p. 506-14, Oct 2013. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938132> >.

INABA, N. et al. Effect of inhibition of the ROCK isoform on RT2 malignant glioma cells. **Anticancer Res**, v. 30, n. 9, p. 3509-14, Sep 2010. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944130> >.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2016.

ITOH, K. et al. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. **Nat Med**, v. 5, n. 2, p. 221-5, Feb 1999. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930872> >.

IZAWA, I. et al. Possible involvement of the inactivation of the Rho-Rho-kinase pathway in oncogenic Ras-induced transformation. **Oncogene**, v. 17, n. 22, p. 2863-71, Dec 1998. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879992> >.

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

JEONG, K. J. et al. The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. **Oncogene**, v. 31, n. 39, p. 4279-89, Sep 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249252> >.

JULIAN, L.; OLSON, M. F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. **Small GTPases**, v. 5, p. e29846, 2014. ISSN 2154-1256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25010901> >.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8ª ed. 2005.

KAMAI, T. et al. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 7, p. 2632-41, Jul 2003. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855641> >.

KARLSSON, R. et al. Rho GTPase function in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 2, p. 91-8, Dec 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327386> >.

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

KIMURA, K. et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, n. 5272, p. 245-8, Jul 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662509> >.

KITAJO, H. et al. Rho regulates the hepatocyte growth factor/scatter factor-stimulated cell motility of human oral squamous cell carcinoma cells. **Oncol Rep**, v. 10, n. 5, p. 1351-6, 2003 Sep-Oct 2003. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883706> >.

KJOLLER, L.; HALL, A. Signaling to Rho GTPases. **Exp Cell Res**, v. 253, n. 1, p. 166-79, Nov 1999. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579921> >.

KLAGES, B. et al. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. **J Cell Biol**, v. 144, n. 4, p. 745-54, Feb 1999. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037795> >.

KLEER, C. G. et al. RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4485-90, Aug 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899593> >.

KLEIN, E. A. et al. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. **Cell Cycle**, v. 6, n. 9, p. 1115-21, May 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426454> >.

KNIPE, R. S.; TAGER, A. M.; LIAO, J. K. The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 1, p. 103-17, 2015. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395505> >.

KOSAKO, H. et al. Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. **Oncogene**, v. 19, n. 52, p. 6059-64, Dec 2000. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146558> >.

KROISS, A. et al. Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2. **Oncogene**, v. 34, n. 22, p. 2846-55, May 2015. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25065599> >.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7ª Edição Rio de Janeiro: 2005.

KUROPKAT, C. et al. Proliferation marker Ki-S11--a prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Virchows Arch**, v. 435, n. 6, p. 590-5, Dec 1999. ISSN 0945-6317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628801> >.

KUWAHARA, K. et al. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes--possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. **FEBS Lett**, v. 452, n. 3, p. 314-8, Jun 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386613> >.

KÜHN, S.; GEYER, M. Formins as effector proteins of Rho GTPases. **Small GTPases**, v. 5, p. e29513, 2014. ISSN 2154-1256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914801> >.

KÜMPER, S. et al. Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. **Elife**, v. 5, p. e12994, Jan 2016. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26765561> >.

LAI, S. Y. et al. Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 44, n. 7, p. 683-8, Jul 2008. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996485> >.

LEETHANAKUL, C. et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. **Oncogene**, v. 19, n. 28, p. 3220-4, Jun 2000. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10918578> >.

LI, M. et al. Intravitreal administration of HA-1077, a ROCK inhibitor, improves retinal function in a mouse model of huntington disease. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56026, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409115> >.

LIAO, Y. C. et al. Overexpressed hPTTG1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by regulating GEF-H1/RhoA signalling. **Oncogene**, v. 31, n. 25, p. 3086-97, Jun 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002306> >.

LIU, S. et al. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. **Cancer Res**, v. 69, n. 22, p. 8742-51, Nov 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19887617> >.

LIU, S. Y. et al. Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 6, p. 702-7, Jun 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170282> >.

LÓPEZ, R. V. et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer Causes Control**, v. 25, n. 4, p. 461-71, Apr 2014. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474236> >.

MA, Z. et al. p66(Shc) restrains Ras hyperactivation and suppresses metastatic behavior. **Oncogene**, v. 29, n. 41, p. 5559-67, Oct 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676142> >.

MADDALA, R. et al. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. **Mol Vis**, v. 9, p. 329-36, Jul 2003. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876554> >.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-66, Mar 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238148> >.

MALUMBRES, M. et al. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 1, p. 16-21, Jan 2008. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054800> >.

MAMMOTO, A. et al. Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition. **J Biol Chem**, v. 279, n. 25, p. 26323-30, Jun 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096506> >.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 298-306, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549091> >.

MASSANO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 1, p. 67-76, Jul 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831675> >.

MATSUMURA, F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 371-7, Jul 2005. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935670> >.

MAZIERES, J. et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 8, p. 2742-50, Apr 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102679> >.

MERAJVER, S. D.; USMANI, S. Z. Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 291-8, Oct 2005. ISSN 1083-3021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900393> >.

MERTSCH, S.; THANOS, S. Opposing signaling of ROCK1 and ROCK2 determines the switching of substrate specificity and the mode of migration of glioblastoma cells. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 2, p. 900-15, Apr 2014. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170433> >.

METTOUCHI, A. et al. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. **Mol Cell**, v. 8, n. 1, p. 115-27, Jul 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511365> >.

MIKURIYA, Y. et al. Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells. **Int J Cancer**, v. 136, n. 4, p. E3-13, Feb 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053237> >.

MINETA, H. et al. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 85, n. 5, p. 1011-7, Mar 1999. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091782> >.

MISHRA, A. K.; LAMBRIGHT, D. G. Invited review: Small GTPases and their GAPs. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 431-48, Aug 2016. ISSN 1097-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26972107> >.

MONTALVO, J. et al. ROCK1 & 2 perform overlapping and unique roles in angiogenesis and angiosarcoma tumor progression. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 205-19, Jan 2013. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934846> >.

MONTORO, J. R. et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 6, p. 861-6, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 1808-8694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582342> >.

- MOREIRA CARBONI, S. E. S. et al. HA-1077 inhibits cell migration/invasion of oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Drugs**, v. 26, n. 9, p. 923-30, Oct 2015. ISSN 1473-5741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181228> >.
- MOREIRA CARBONI, S. S. et al. HA-1077 inhibits cell migration/invasion of oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Drugs**, Jul 2015. ISSN 1473-5741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181228> >.
- MORGAN-FISHER, M.; WEWER, U. M.; YONEDA, A. Regulation of ROCK activity in cancer. **J Histochem Cytochem**, v. 61, n. 3, p. 185-98, Mar 2013. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204112> >.
- NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology Development, Structure and Function 8^a edição**. Montreal: 2013. 398.
- NIGGLI, V. Rho-kinase in human neutrophils: a role in signalling for myosin light chain phosphorylation and cell migration. **FEBS Lett**, v. 445, n. 1, p. 69-72, Feb 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069376> >.
- NILIUS, B. et al. Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. **J Physiol**, v. 516 (Pt 1), p. 67-74, Apr 1999. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066923> >.
- NOBES, C.; MARSH, M. Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? **Curr Biol**, v. 10, n. 20, p. R739-41, Oct 2000. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069097> >.
- OHASHI, K. et al. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. **J Biol Chem**, v. 275, n. 5, p. 3577-82, Feb 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652353> >.
- OLSON, M. F. Applications for ROCK kinase inhibition. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20, n. 2, p. 242-8, Apr 2008. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282695> >.
- PAN, P. et al. Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 23-24, p. 1323-33, Dec 2013. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076262> >.
- PENG, J. et al. ROCK cooperated with ET-1 to induce epithelial to mesenchymal transition through SLUG in human ovarian cancer cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 76, n. 1, p. 42-7, 2012. ISSN 1347-6947. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232246> >.
- PERNIS, A. B. et al. Rho Kinases in Autoimmune Diseases. **Annu Rev Med**, v. 67, p. 355-74, 2016. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26768244> >.

PINHEIRO, N. M. **Papel Funcional das GTPases Rho na proliferação e Diferenciação Celular em Carcinoma Epidermóide Oral**. 2010. 109 Universidade Federal do Triângulo Mineiro

POLLARD, T., D.; EARNSHAW, W. C. **Biologia Celular**. 2006.

PRENDERGAST, G. C. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 2, p. 162-8, Nov 2001. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905808> >.

PULTE, D.; BRENNER, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **Oncologist**, v. 15, n. 9, p. 994-1001, 2010. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798198> >.

RAISOVA, M. et al. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. **FEBS Lett**, v. 473, n. 1, p. 27-32, May 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802053> >.

REYMOND, N. et al. RhoC and ROCKs regulate cancer cell interactions with endothelial cells. **Mol Oncol**, v. 9, n. 6, p. 1043-55, Jun 2015. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677806> >.

RIDLEY, A. J. Rho GTPase signalling in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**, v. 36, p. 103-112, Sep 2015. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26363959> >.

ROCHELLE, T. et al. p210bcr-abl induces amoeboid motility by recruiting ADF/destrin through RhoA/ROCK1. **FASEB J**, v. 27, n. 1, p. 123-34, Jan 2013. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23047898> >.

SAHAI, E. et al. Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. **Curr Biol**, v. 9, n. 3, p. 136-45, Feb 1999. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10021386> >.

SAMUEL, M. S. et al. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. **Cancer Cell**, v. 19, n. 6, p. 776-91, Jun 2011. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21665151> >.

SASAKI, Y.; SUZUKI, M.; HIDAKA, H. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. **Pharmacol Ther**, v. 93, n. 2-3, p. 225-32, 2002 Feb-Mar 2002. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191614> >.

SAUTER, E. R. et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 11, p. 3200-6, Jun 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036934> >.

SAWADA, N.; LIAO, J. K. Rho/Rho-associated coiled-coil forming kinase pathway as therapeutic targets for statins in atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 8, p. 1251-67, Mar 2014. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919640> >.

SCHMITZ, A. A. et al. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. **Exp Cell Res**, v. 261, n. 1, p. 1-12, Nov 2000. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082269> >.

SCHNELZER, A. et al. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. **Oncogene**, v. 19, n. 26, p. 3013-20, Jun 2000. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871853> >.

SCHOFIELD, A. V.; BERNARD, O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 48, n. 4, p. 301-16, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1549-7798. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601011> >.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. **J Am Dent Assoc**, v. 132 Suppl, p. 12S-18S, Nov 2001. ISSN 0002-8177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803647> >.

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

SEASHOLTZ, T. M. et al. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. **Circ Res**, v. 84, n. 10, p. 1186-93, May 1999. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347093> >.

SEBBAGH, M. et al. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. **J Exp Med**, v. 201, n. 3, p. 465-71, Feb 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699075> >.

SHI, J. et al. Dissecting the roles of ROCK isoforms in stress-induced cell detachment. **Cell Cycle**, v. 12, n. 10, p. 1492-500, May 2013. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598717> >.

SHI, J.; WEI, L. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 62, n. 4, p. 341-54, Oct 2013. ISSN 1533-4023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921309> >.

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

- SUN, K. et al. Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells. **Clin Exp Med**, v. 16, n. 1, p. 37-47, Feb 2016. ISSN 1591-9528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25596714> >.
- TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 153-208, Jan 2001. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152757> >.
- TAKEBA, Y. et al. The Rho kinase inhibitor fasudil is involved in p53-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 69, n. 6, p. 1545-55, Jun 2012. ISSN 1432-0843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481618> >.
- TSELIIOU, M. et al. The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 1, p. 94-109, 2016. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26741994> >.
- UEHATA, M. et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-4, Oct 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353125> >.
- VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev**, v. 11, n. 18, p. 2295-322, Sep 1997. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9308960> >.
- VARGAS-FERREIRA, F. et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. **Braz Dent J**, v. 23, n. 5, p. 586-90, 2012. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306239> >.
- VEGA, F. M.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 2093-101, Jun 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460342> >.
- _____. The RhoB small GTPase in physiology and disease. **Small GTPases**, p. 1-10, Nov 2016. ISSN 2154-1256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875099> >.
- VIGIL, D. et al. ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. **Cancer Res**, v. 72, n. 20, p. 5338-47, Oct 2012. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22942252> >.
- VISHNUBHOTLA, R. et al. Treatment with Y-27632, a ROCK Inhibitor, Increases the Proinvasive Nature of SW620 Cells on 3D Collagen Type 1 Matrix. **Int J Cell Biol**, v. 2012, p. 259142, 2012. ISSN 1687-8884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690219> >.

WANG, H. et al. Silencing of RhoA and RhoC expression by RNA interference suppresses human colorectal carcinoma growth in vivo. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 123, Sep 2010. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828398> >.

WANG, J. et al. The effect of ROCK-1 activity change on the adhesive and invasive ability of Y79 retinoblastoma cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 89, Feb 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24528629> >.

WANG, Z. M. et al. ROCK inhibitor Y-27632 inhibits the growth, migration, and invasion of Tca8113 and CAL-27 cells in tongue squamous cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 37, n. 3, p. 3757-64, Mar 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468018> >.

WATZLAWICK, R. et al. Effect and reporting bias of RhoA/ROCK-blockade intervention on locomotor recovery after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 1, p. 91-9, Jan 2014. ISSN 2168-6157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297045> >.

WEI, L. et al. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 64, n. 4, p. 259-78, Aug 2016. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725045> >.

WHEELER, A. P.; RIDLEY, A. J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. **Exp Cell Res**, v. 301, n. 1, p. 43-9, Nov 2004. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501444> >.

WONG, S. Y. et al. Constitutive activation of myosin-dependent contractility sensitizes glioma tumor-initiating cells to mechanical inputs and reduces tissue invasion. **Cancer Res**, v. 75, n. 6, p. 1113-22, Mar 2015. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25634210> >.

XIAO, J. W. et al. Acute effects of Rho-kinase inhibitor fasudil on pulmonary arterial hypertension in patients with congenital heart defects. **Circ J**, v. 79, n. 6, p. 1342-8, 2015. ISSN 1347-4820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797071> >.

XU, N. et al. Fasudil inhibits proliferation and collagen synthesis and induces apoptosis of human fibroblasts derived from urethral scar via the Rho/ROCK signaling pathway. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 3, p. 1317-1325, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386357> >.

XUE, Z. W. et al. Rho-associated coiled kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal-like differentiation of adult human adipose tissue-derived stem cells. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 18, p. 3332-5, Sep 2012. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964332> >.

YAN, G. et al. Silencing RhoA inhibits migration and invasion through Wnt/ β -catenin pathway and growth through cell cycle regulation in human tongue cancer. **Acta**

Biochim Biophys Sin (Shanghai), v. 46, n. 8, p. 682-90, Aug 2014. ISSN 1745-7270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001480> >.

YANG, S.; KIM, H. M. ROCK inhibition activates MCF-7 cells. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88489, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523903> >.

YANG, X. et al. Effect of fasudil on growth, adhesion, invasion, and migration of 95D lung carcinoma cells in vitro. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 88, n. 9, p. 874-9, Sep 2010. ISSN 1205-7541. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921973> >.

YOSHIDA, A. et al. VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells. **Biol Open**, v. 4, n. 9, p. 1063-76, Jul 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26209534> >.

YOSHII, A. et al. Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 20, n. 6, p. 1190-200, Jun 1999. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340938> >.

ZHANG, H. Z. et al. Expression of G3BP and RhoC in esophageal squamous carcinoma and their effect on prognosis. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 30, p. 4126-30, Aug 2007. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696235> >.

ZHANG, J. et al. Overexpression of ROCK1 and ROCK2 inhibits human laryngeal squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 1, p. 244-51, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755711> >.

ZHANG, S. et al. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 570-80, Apr 2009. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372585> >.

ZHANG, Z. et al. Fasudil inhibits lung carcinoma-conditioned endothelial cell viability and migration. **Oncol Rep**, v. 27, n. 5, p. 1561-6, May 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22344855> >.

ZHU, F. et al. Rho kinase inhibitor fasudil suppresses migration and invasion through down-regulating the expression of VEGF in lung cancer cell line A549. **Med Oncol**, v. 28, n. 2, p. 565-71, Jun 2011. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300976> >.

Anexo 1



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,

Profa. Dra. Virginia Oliveira Crema

Responsável pela Disciplina de Histologia dos
Cursos Biomedicina e Fisioterapia

Aprovado em
15/6/2012

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