

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**Papel Funcional das GTPases Rho na Proliferação e Diferenciação Celular
em Carcinoma Epidermóide Oral**

Nanci Mendes Pinheiro

Uberaba-MG
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nanci Mendes Pinheiro

**Papel Funcional das GTPases Rho na Proliferação e Diferenciação Celular
em Carcinoma Epidermóide Oral**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do *Título de Mestre*

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Uberaba-MG
Dezembro/2010

DEDICATÓRIA

Meu pai, minha mãe e
meu irmão pelo incentivo
e amor incondicional

AGRADECIMENTOS

A Profa. Virgínia por ter me acompanhado em todos os passos dados na Universidade, incentivado a estudar e a dedicar ao curso e ter sempre acreditado no meu potencial. Exerce funções de professora, pesquisadora, orientadora com competência. É forte, determinada e acima de tudo leal, exemplo a ser seguido por todos nós. Levarei sempre comigo sua dedicação companheirismo e nossa amizade. Um simples obrigada não retrata a minha gratidão.

A Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta por ter cedido o laboratório de Farmacologia para a realização dos experimentos e a colaboração de Douglas Cobo Micheli, sempre com paciência, dedicação e ensinamentos.

A Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos pela colaboração na obtenção de imagens com o microscópio confocal do ICB/USP.

Ao IPON e ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta e à Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin, por sempre ter nos recebido com disponibilidade.

Aos professores Dr. Eurípedes de Oliveira Marinho e Dr. Antônio Francisco Durighetto Júnior pela colaboração neste estudo.

A Profa. Dra. Patrícia Helena Zanier Gomes pela revisão do texto e pela amizade.

Aos amigos do laboratório, o convívio foi um grande aprendizado e prazeroso com todos: Artur, Carina, Fabrízio, Karime, Marco Aurélio, Nathália, Nayara, Rodolfo, Sérgio e em especial a Simone.

As técnicas Maria Aparecida Oliveira Tito e Luzia Maria Eugênia pela boa vontade de servir e ajudar o próximo.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos e aos colegas pela troca de aprendizado.

A Denise e Nelma pela atenção, carinho e disponibilidade.

Aos pacientes pela contribuição fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A Faculdade de Talentos Humanos (FACTHUS) por ter concedido minha licença das atividades docentes durante minha formação.

Ao meu pai e minha mãe pela incansável vontade em me verem feliz, por sempre acreditarem em mim, pelo amor e cuidado.

Ao meu querido irmão pelo exemplo de determinação, garra e vontade de vencer.

A todos os meus familiares e amigos pela força e paciência.

APOIO FINANCEIRO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU)
- Bolsa REUNI-CAPES

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Mucosa Oral	17
1.2. Ciclo Celular	18
1.3. Neoplasia	22
1.4. Neoplasia Oral	23
1.5. Carcinoma Epidermóide Oral	26
1.6. Família das GTPases Rho e seus Efeitores	29
1.6.1. GTPases Rho	29
1.6.2. ROCK	34
1.6.3. PI 3-Kinase	35
1.6.4. Outros efetores	35
1.6.5. As GTPases na Tumorigênese	36
2. HIPÓTESE	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Reagentes	44
4.2. Casuística	45
4.3. Cultura Primária das Células	46
4.4. Ensaio de Proliferação Celular	46

4.5. Reação de Imunofluorescência para Citometria de Fluxo	47
4.6. Análise por Citometria de Fluxo	47
4.7. Ensaio de Diferenciação Celular	48
4.8. Reação de Imunofluorescência	48
4.9. Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS	51
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	77
8. RESUMO.....	79
9. ABSTRACT.....	81
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética mostrando a superfamília de GTPases Ras de mamíferos. Os 20 membros da família Rho são agrupados em oito subfamílias

Figura 2. Expressão de citoqueratina em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 3. Expressão da GTPase RhoA em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 4. Expressão da GTPase RhoB em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral

Figura 5. Expressão da GTPase Cdc42 em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 6. Expressão da GTPase Rac1 em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 7. Papel funcional das GTPases Rho na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 8. Análise por citometria de fluxo da marcação de BrdU em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral tratadas com LPA e/ou Toxina A sem SFB.

Figura 9. Papel funcional das ROCKs na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

Figura 10. Papel funcional das PI 3-Kinase na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral tratadas.

Figura 11. Efeito do tratamento com Toxina A, inibidor das GTPases Rho em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise da variância

BrdU - *bromodeoxyuridine*

BSA - *albumin solution from bovine serum*

Cdk- *cyclin dependent kinases*

CEO - carcinoma epidermóide oral

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

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

DMEM-F12 - *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/HAM F-12 50/50 Mix*

DMSO - *Dimethylsulfoxide*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

EGF – *Epidermal Growth Factor*

EGFR - *Receptor Epidermal Growth*

FGF- *Fibroblast Growth Factor*

F-actina - *actina filamentosa*

GAPs - *GTPase-activating proteins*

GDIs - *GDP- Dissociation Inhibitors*

GEFs - *Guanine Nucleotide exchange Factors*

GTPase- *Guanosine triphosphate*

HBSS - *Hank's Solution Balanced Salt Solution*

HGF - *Hepatocyte Growth Factor*

IGF-1 - *Insulin-like Growth Factor*

LPA - *ácido lisofosfatídico*

MEC - *matriz extracelular*

PAK - *P21-Activated Kinase*

PI 3-Kinase - *fosfatidilinositol-3 quinase*

ROCK – *Rho Kinase*

SFB - Soro fetal bovino

TA - Temperatura Ambiente

TGF β - *Fator transformante beta*

WASP - *Wiskott-Aldrich syndrome protein family*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mucosa Oral

O processo digestivo começa na cavidade oral com a ingestão, fragmentação e umedecimento do alimento, mas além do seu papel digestivo a cavidade oral está envolvida na fala, na expressão facial, na percepção sensitiva e na respiração. Participam dessas funções: os lábios, os dentes, a língua, a mucosa oral e as glândulas salivares associadas (YOUNG *et al.*, 2007).

A cavidade oral é revestida por mucosa, sendo umidificada constantemente pela saliva. É constituída por: epitélio derivado do ectoderma e lâmina própria de tecido conjuntivo originada do ectomesênquima. Suas funções são: proteger os tecidos mais profundos; atuar como órgão sensorial; secretar saliva; e regular a temperatura. Apresenta diferenças regionais dependendo da localização, grau de mobilidade e função específica. Pode ser três tipos: de revestimento, mastigatória e especializada (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

O epitélio oral é constituído por: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans, células de Merckel. Enquanto, algumas regiões da cavidade oral apresentam epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, outras não queratinizado. Suas células mais profundas proliferam constantemente e sofrem um processo de diferenciação para formar uma camada protetora na superfície (SQUIER e KREMER, 2001; TEN CATE, 2001).

A lâmina própria presente subjacente ao epitélio possui duas camadas: uma superficial constituída por tecido conjuntivo frouxo, e outra mais profunda de tecido conjuntivo denso não modelado. Apresenta dois componentes: células e matriz extracelular (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

1.2. Ciclo Celular

Nas células eucariontes, o processo básico 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; POLLARD e EARNSHAW, 2006; ALBERTS *et al.*, 2008).

O ciclo celular pode ser dividido em duas grandes etapas: a primeira compreendida entre duas divisões sucessivas, em que a célula cresce e se prepara para nova divisão denominada interfase; e segunda define a etapa da divisão propriamente dita, pela qual se originam duas células filhas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005). Existem quatro pontos de controle ou 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 ativando genes especializados em reparar o DNA, deter sua duplicação e parar a cariocinese ou estacionar o ciclo em qualquer de suas fases. Após completar a

mitose, para escolher entre as vias de proliferação ou de diferenciação, a célula deve suprimir a tendência de proliferação do ciclo celular precedente pela inativação das quinases dependentes de ciclinas (BRASILEIRO FILHO, 2004; POLLARD e EARNSHAW, 2006; ALBERTS *et al.*, 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 Kinases: Cdk (de *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 Cdks são inativadas (MALUMBRES, 2007).

As Cdks 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 e BARBACID, 2005).

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).

A perda da atividade de múltiplas Cdks 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 *et al.*, 2004).

O controle do ciclo celular é essencial, uma vez que o câncer é uma perturbação anormal. A regulação rígida do momento e local da proliferação celular é essencial para evitar a doença (POLLARD E EARNSHAW, 2006). Nas células em proliferação, os fatores de crescimento agem controlando a progressão da fase G1 a S (ALBERTS *et al.*, 2008).

A atividade das Cdks no ciclo celular é desregulada em células cancerosas 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 inibição de LPA e ROCK induz ativação da GTPase Rho, Rac, justificando a migração celular e formação de lamelipódio (CHENG *et al.*, 2010).

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 (CIARDELLO e TORTORA, 2001). Entretanto, a inibição do EGFR leva a indução da parada do ciclo celular entre as fases G1-S. A regulação do ciclo é importante para o crescimento controle celular, portanto, a sua desregulação tem sido implicada na carcinogênese (MASSAGUE, 2004).

A duração do ciclo celular é variável, depende do tipo celular. Varia também com as condições fisiológicas em que a célula se encontra, como idade celular, disponibilidade de hormônios de crescimento, temperatura, pressões osmótica, hidrostática e de oxigênio externas, e mesmo com ritmo circadiano (ritmo de cerca de um dia) que ocorre em animais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

As GTPases Rho 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).

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 ($TGF\beta$) e ácido lisofosfatídico (LPA) (LIU *et al.*, 2001; ZONDAG *et al.*, 2000).

As GTPases Rho através de inúmeras outras proteínas alvos, participam de vias de sinalizações com notável relevância na biologia do citoesqueleto e microtúbulos. Essas proteínas desempenham papel de destaque no câncer, pois contribuem para o ciclo celular, morfogênese e migração (HALL, 2009).

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 e HALL 1995).

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 (METOUCHI *et al.*, 2001).

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.

1.3. Neoplasia

Nos organismos multicelulares, a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a replicação apenas dentro dos estreitos limites que mantém a população normal em níveis homeostáticos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Importante causa de doença e morte no Brasil, as neoplasias malignas

constituem-se a segunda causa de morte na população desde 2003, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

Inicialmente se chamava de tumor qualquer aumento de volume localizado em um órgão. Atualmente, o termo para designar a proliferação celular anormal e descontrolada, é definido por neoplasia. Na prática, as neoplasias são chamadas de tumores, podendo ser causadas por vários processos patológicos, ou seja, lesão expansiva causada por proliferação celular. Todos os tumores malignos e benignos apresentam dois comportamentos básicos ao qual é identificado o tecido ou a células que estão proliferando (BRASILEIRO FILHO, 2004; KUMAR, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas individuais do estilo de vida. A utilização correta dos recursos disponíveis para: planejamento, execução e avaliação das estratégias de controle da doença são essenciais

A prevenção e o controle do câncer estão entre os mais importantes desafios, científicos e de saúde pública da nossa época (INCA, 2009).

1.4. Neoplasia Oral

No Brasil, o câncer bucal é considerado o sétimo tipo de neoplasia mais prevalente entre homens e mulheres, segundo a localização primária; é o quinto

tipo de neoplasia mais prevalente entre os homens, enquanto nas mulheres ocupa o sétimo lugar. São consideradas neoplasias muito frequentes na população brasileira e comum em pessoas brancas. É o tipo de neoplasia que afeta os lábios e o interior da cavidade oral. Dentro da boca devem ser observados gengivas, mucosa jugal, palato duro, língua (principalmente as bordas), assoalho e amígdalas (INCA, 2010).

Entre os fatores de risco correlacionados a esta doença, podem-se citar os fatores extrínsecos como: tabaco, álcool, luz solar, dieta, infecções virais entre outros; e fatores intrínsecos como: estados sistêmicos e a predisposição genética.

Os tumores da cavidade bucal podem ser epiteliais, mesenquimáticos ou hematolinfóides. Os epiteliais podem ser classificados como aqueles que se originam do epitélio que reveste a cavidade bucal, a orofaringe e aqueles derivados de tecido glandular salivar (WHO, 2005). Cerca de 90% das malignidades orais são carcinomas epidermóides. São tumores de origem epitelial, de fácil identificação e tratamento nas fases iniciais (SILVERMAN, 2001; CONCEIÇÃO PEREIRA *et al*, 2007).

Dentre tantos carcinomas, o risco do carcinoma bucal aumenta com a idade, principalmente entre os homens. Em relação ao gênero, os homens caucasianos têm um risco maior após os 65 anos de idade quando comparados aos outros grupos. No entanto, a maior incidência entre as pessoas de meia idade é verificada entre os homens afro-descendentes. As mulheres, em geral, apresentam uma incidência menor que os homens, em qualquer faixa etária (NEVILLE *et al.*, 2004).

As terapias usadas com frequência para o tratamento do câncer de boca são baseadas na excisão completa do tumor, radioterapia e quimioterapia. A decisão pela opção do tratamento depende de fatores como: estadiamento tumoral, relação com as estruturas anexas, envolvimento da cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão (LUNG *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos por estes tipos de tratamento apesar de proporcionarem um bom prognóstico ao paciente, apresentam complicações pós-tratamento, como por exemplo, defeitos estéticos e funcionais podendo comprometer a qualidade de vida dos pacientes. Além disto, pode ocasionar danos às estruturas do complexo estomatognático remanescentes, levando a um quadro de mucosite, candidíase, hipossalivação, disfagia, trismo muscular ou perda do paladar. Complicações mais graves podem chegar a alterações vasculares e osteoradionecrose (SANNOMIYA, 2000). Essas terapias debilitantes levam a procura de novos recursos para as neoplasias orais. É neste cenário que algumas inovações no tratamento são propostas (REIBEL, 2003).

O diagnóstico precoce das neoplasias orais aumenta a probabilidade de cura com redução dos danos aos pacientes (JOSEPH, 2002). Sendo assim, muitas lesões malignas da cavidade oral podem ser semelhantes a condições benignas, evoluindo com dificuldade de diagnóstico, prognóstico e escolha de melhor tratamento (KAUGARS *et al.*, 1998).

A carcinogênese bucal, assim como as demais, está associada a alterações genéticas cumulativas e a superexpressão e/ou atividade de receptores de superfície celular. Como exemplo, os receptores de crescimento epidermóide

(EGFR), receptores de citocinas e receptores de proteína G, têm sido associados diretamente ao início e progressão do carcinoma epidermóide bucal (MOLINOLO *et al.*, 2008).

1.5. Carcinoma Epidermóide Oral

Carcinoma epidermóide oral é o mais comum tumor maligno da região de cabeça e pescoço e em geral lidera mais 90% de todos os cânceres da cavidade oral (MAO *et al.*, 2004). É uma neoplasia epitelial invasiva com vários graus de diferenciação e propensão para metástases precoces e numerosas em linfonodos (WHO, 2005).

Em relação à localização, esse tumor pode desenvolver em qualquer região da cavidade oral. Porém, surge com grande frequência no o lábio inferior. Dentro da cavidade bucal pode se localizar em gengivas superior e inferior, palato duro, língua, incluindo a superfície dorsal, ventral, lateral e o assoalho da boca (WHO, 2005). Diversos fatores devem ser observados incluindo: sítio, extensão, estágio do tumor, grau histológico de diferenciação, espessura e invasão perineural (KUROKAWA *et al.*, 2002).

Porém, a causa desse carcinoma epidermóide é multifatorial. Não há um agente causador (carcinógeno) isolado e claramente definido. Os fatores extrínsecos incluem: fumo, tabaco, álcool e raios solares. Os intrínsecos: estado sistêmico ou generalizados, como desnutrição geral ou anemia ferropriva. A hereditariedade não parece ser um fator etiológico importante (NEVILLE, 2004).

Muitas investigações mostraram a tendência do aparecimento de carcinoma epidermóide oral em pacientes com menos de 60 anos, idade média para esta doença no mundo ocidental. A doença se manteve estável nos últimos quarenta anos, porém, tem havido um aumento de pacientes acima dos 45 anos com o diagnóstico (ANNERTZ *et al.* 2002). Esse carcinoma é tipicamente visto em homens de meia idade a idosos. Recentemente houve um aumento no número de adultos jovens e em mulheres afetados por essa neoplasia (KUMAR, 2005).

Na literatura, são encontradas diversas controversas quanto à incidência do carcinoma oral em pacientes jovens, sendo caracterizado por um comportamento mais agressivo em pacientes mais velhos (ANNERTZ *et al.*, 2002; GARAVELLO *et al.*, 2008).

O índice de sobrevivência de cinco anos ao primeiro tumor primário é consideravelmente maior que 50% porém em alguns indivíduos o segundo tumor primário é a causa mais comum de morte. Portanto a detecção precoce de todas as lesões pré-malignas é crítica para a sobrevivência em longo prazo desses pacientes (KUMAR, 2005).

Das neoplasias de cavidade oral o carcinoma epidermóide é o sexto e mais frequente, permanecendo com prognóstico insatisfatório. Recentes estudos mostram o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) tem sido alvo de tratamento juntamente com a radioterapia e a cirurgia com limitados sucessos (DANG *et al.*, 2010).

O avanço em técnicas cirúrgicas e agentes anticancer tem sido demonstrado para melhorar a regressão do tumor e a qualidade de vida dos pacientes com

carcinoma epidermóide oral, visto que, as ressecções feitas nesses casos evoluem para disfunções orais, porém novos tratamentos são necessários (YAMADA *et al.*, 2010).

A função do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está desregulada em vários tipos de malignidade, como resultado da amplificação do gene, mutações, ou aumento anormal do ligante. Portanto, a atividade da proteína tirosina Kinase do EGFR é um alvo terapêutico promissor (TAKEUCHI e FUMIAKI, 2009).

A presença de metástase por nódulos linfáticos é fortemente relatada (GONZÁLES-GARCIA *et al.*, 2008) assim como alterações na expressão de moléculas de adesão, estão associados a um prognóstico ruim desses pacientes com carcinoma epidermóide oral (YANAMOTO *et al.*, 2007).

Amplificação genética, direcionando um aumento no número de cópias do DNA e a super expressão de oncogenes de muitos tumores, contribui para o crescimento desordenado de células, mudando seu comportamento e causando carcinogênese (LIN *et al.*, 2006).

Os oncogenes e genes supressores de tumor são capazes de ser influenciados por uma variedade de agentes etiológicos. Os genes normais ou proto-oncogenes são transformados em oncogenes ativados em certas malignidades através da ação de vírus, irradiação ou carcinógenos químicos (KUMAR, 2005). Até agora, as anormalidades dos oncogenes *ras*, *myc* e *c-erbB*, assim como dos genes supressores de tumor p53, pRb e E-caderinas têm sido relacionados com os carcinomas bucais (NEVILLE *et al.*, 2008). Em carcinoma epidermóide de boca,

essa amplificação é a primeira alteração genética e frequentemente observada, sendo associada com o crescimento agressivo do tumor (FREIER *et al.*, 2006).

Para confirmação e diagnóstico do carcinoma epidermóide oral, além da parte clínica e exames complementares, a biopsia ainda permanece sendo o exame mais importante para confirmação do diagnóstico (BSOUL *et al.*, 2005).

1.6. Família das GTPases Rho e seus Efeitores

1.6.1. GTPases Rho

A família das pequenas proteínas GTPases Rho compreendem uma parte da subfamília da super família Ras-GTPases, composta por 22 membros. São classificadas em cinco subgrupos, de acordo com sua sequência primária e funções conhecidas: Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd e RhoBTB (BURRIDGE e WENNERBERG, 2004).

As proteínas Rho mais bem caracterizadas e amplamente expressas são: RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42. Em fibroblastos, RhoA é responsável pela formação de feixes contráteis de actina e miosina; e adesões focais (HALL, 1998). A participação dessas proteínas pode variar de acordo com o tipo celular e composição da MEC (CHIOU *et al.*, 2003).

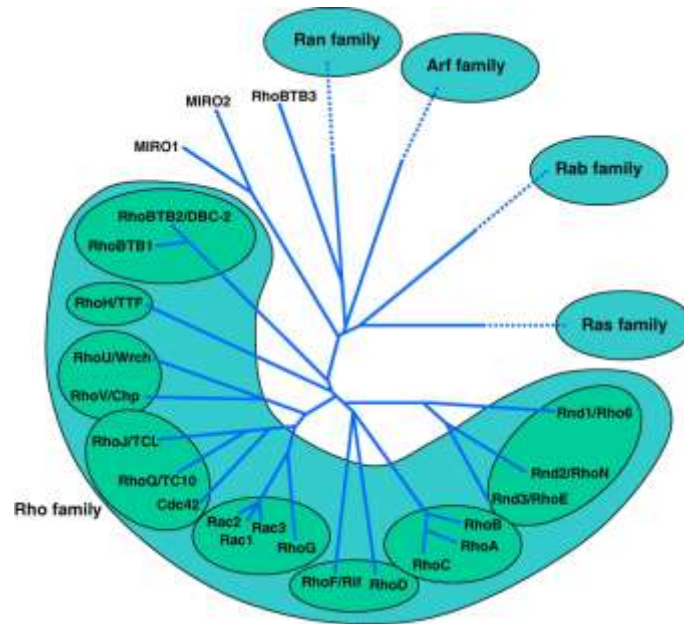


Figura 1: Árvore filogenética mostrando a superfamília de GTPases Ras de mamíferos. Os 20 membros da família Rho são agrupados em oito subfamílias (VEGA e RIDLEY, 2008).

Em mamíferos, Rac1 e Cdc42 são conhecidas por induzir as saliências de membrana plasmática conhecidas como lamelipódios e filopódios, estimulando a polimerização da actina (BOETTNER e AELST, 2002). Estudos mostram que a proteína Cdc42 pode contribuir para a formação e progressão do tumor ativando a proteína Rac (KARLSSON *et al.*, 2009).

O aumento na expressão de RhoA é relacionado com um aumento em sua atividade contribuindo para um prognóstico ruim e recorrências em carcinoma epidermóide de esôfago. Avaliados em conjunto, estes dados sugerem fortemente o papel da RhoA na progressão da malignização de vários tumores (FARIED *et al.*, 2007; FARIED *et al.*, 2006).

Algumas investigações sugerem que RhoB pode ser um supressor de tumor uma vez que sua expressão está diminuída em carcinoma epidermóide pouco diferenciado e altamente invasivo (ADNANE *et al.*, 2002).

A pouca expressão de RhoB reforça seu papel supressor quando relacionado com a carcinogênese pulmonar (MAZIERES *et al.*, 2004) e inibindo a malignidade e o crescimento de tumores em estudos feito em camundongos (CHEN *et al.*, 2000). Em contrapartida, as GTPases RhoA e RhoB foram relatadas sendo superexpressas em câncer de mama e podem estar associadas com a progressão da doença (FRITZ *et al.*, 2002).

Em células em cultura, a expressão RhoB é induzida por vários estímulos, tais como: radiação UV, citocinas ou fatores de crescimento, ao contrário de RhoA ou RhoC. A expressão dessas proteínas variam durante o ciclo celular de acordo com o tempo de transcrição, indicando que suas funções requerem uma regulação dos genes das três isoformas da família Rho (PRENDERGAST, 2001; JIANG *et al.*, 2004; ZALCMAN *et al.*, 1995).

A proteína RhoC é superexpressa em câncer de mama e carcinoma epidermóide de pele. Em contraste com RhoC, a expressão de RhoA e RhoB não se correlacionam com um mau prognóstico no câncer de pâncreas (SUWA *et al.*, 1998).

O aumento da expressão de RhoC correlaciona com a progressão e prognóstico do adenocarcinoma ductal de pâncreas, câncer hepatocelular, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer gástrico, carcinoma epidermóide esofágico, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, câncer de próstata e

carcinoma de pulmão não-pequenas células (FARIED *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; KLEER *et al.*, 2006; KONDO *et al.*, 2004; HORIUCHI *et al.*, 2003; KAMAI *et al.*, 2003; SHIKADA *et al.*, 2003 CLEVERLEY *et al.*, 2000; FRITZ *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004; SUWA *et al.*, 1998).

As proteínas GTPase Rho estão envolvidas na organização da rede de microfilamentos, interação célula-célula e transformação maligna. Estudos sugerem que RhoA e RhoC estejam envolvidos na progressão do carcinoma epidermóide de esôfago e sejam úteis como marcadores de prognóstico (FARIED *et al.*, 2007).

A proteína Rac1 parece ser superexpressa em tumores de testículo (KAMAI *et al.*, 2004), carcinomas gástricos (PAN *et al.*, 2004) e em carcinoma ductal *in situ*, câncer de mama e metástase linfonodais. Em neoplasia benigna de mama foi descrito que Rac1 é pouco expressa (SCHNELZER *et al.*, 2000). No carcinoma epidermóide oral, sua intensidade de marcação está relacionada com a progressão desses tumores (LIU *et al.*, 2004).

As GTPases Rho, são responsáveis por diversos estímulos, sendo pontos chaves para o controle de processos biológicos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico, regulação do citoesqueleto, tráfego de membrana, adesão célula-matriz, migração e polarização célula-célula (AZNAR *et al.*, 2004; BOETTNER e AELST, 2002).

Além de ser responsável pela organização dos filamentos de actina, este grupo de proteínas também regula a transcrição dos genes, tráfego intracelular, sobrevivência das células e são essenciais mediadoras na progressão do ciclo

celular, principalmente na fase G1 em diversos tipos celulares, (ASPENSTROM *et al.*; 2004; VILLALONGA e RIDLEY, 2006).

A GTPases tem se mostrado importantes em via de sinalização na diferenciação de queratinócitos enquanto que, as proteínas Rho (RhoA, RhoB e RhoC) são mediadoras de mudanças na expressão de gene, levando a progressão do ciclo celular ou na diferenciação de modelos de queratinócitos (NARUMIYA *et al.*, 2009; CALAUTTI *et al.*, 2002)

A ativação e inativação das proteínas Rho é, em grande parte, regulada por três grupos de proteínas *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), *GTPase-activating proteins* (GAPs) e GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). As GEFs são capazes de ativar as GTPases Rho ao estimular a troca do GDP ligado à forma inativa da proteína Rho por um GTP. Já as GAPs atuam intensificando a taxa de hidrólise do GTP, inativando-as (VEGA e RIDLEY, 2008).

As GDIs são proteínas capazes de se ligar à porção C-terminal das GTPases Rho, que possui um grupo prenil, impedindo sua associação à membrana. Como consequência, a interação das GTPases com suas proteínas efetoras é inibida (DOVAS e COUCHMAN, 2005). Ao se ligar a uma molécula de GTP, as proteínas Rho sofrem uma alteração conformacional e interagem com proteínas efetoras, mediadoras de suas funções celulares. Diversos efetores das GTPases Rho já foram identificados, sendo a sua expressão dependente do tipo celular. Isso explica as diferentes funções apontadas para as proteínas Rho em tipos celulares diferentes (BENITAH *et al.*, 2004).

A alta incidência de uma super expressão de membros das GTPases Rho em humanos com tumores sugerem que essas proteínas são importantes no processo de carcinogênese e potencial candidatas à intervenção terapêutica (AZNAR *et al.*, 2004).

As GTPases Rho e seus efetores são classificados de acordo com suas funções biológicas e alguns estão envolvidos diretamente com alguns aspectos de indução e interferência de Rho à tumorigênese e supostamente alvo antineoplásico (AZNAR *et al.*, 2004).

1.6.2. ROCK

A família das proteínas ROCK de Serina treonina Kinase medeia à maioria de mudança no citoesqueleto obtida por RhoA, incluindo formação de fibras de stress e adesão focal (BISHOP e HALL, 2000).

Diversas proteínas efetoras de Rho como ROCK e Citron-K podem afetar em diferentes aspectos a formação e contração de actina durante a citocinese (VILLALONGA e RIDLEY, 2006) e podem estar envolvidas no desenvolvimento de drogas como alvo de tratamentos em câncer, particularmente PAK e ROCK (SAHAI e MARSHAL, 2002).

As proteínas ROCK tem ação antagonista em relação à mDia uma efetora das GTPases potencialmente ligada a Rac em eventos biológicos como: formação dos filamentos de actina, rearranjo do citoesqueleto e formação de membrana (NARUMIYA *et al.*, 2009).

1.6.3. PI 3-Kinase

A PI3-Kinase é uma importante proteína na via de sinalização de Rac1 e Cdc42 tendo função reguladora e efetora no citoesqueleto de actina e migração celular. A adesão celular mediada por integrinas ativa vários efetores de sinalização, incluindo a PI 3-Kinase, um mediador central da motilidade e sobrevivência celular.

Pesquisadores estudaram o papel das isoformas catalisadoras de PI 3-Kinase em $\beta 1$ integrina induzindo a protusão de lamelipódios e ativação da Akt em fibroblastos e mostraram que PI 3-Kinase é necessária na polimerização de actina (ZELLER *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostram o inibidor de ROCK, Y-27632 causou uma redução significativa nos níveis de RhoA, PI-3Kinase e proteínas *downstream* de PI 3-Kinase, sugerindo que RhoA pode regular a expressão das proteínas relacionadas à PI 3-Kinase (CHANG *et al.*, 2010).

1.6.4. Outros Efetores

Os efetores como *Wiskott-Aldrich syndrome protein family* (WASP), interage com Rac1 especificamente com Cdc42 implicando na polimerização de actina (PADRICK e ROSEN, 2010; PADRICK *et al.*, 2008).

IQGAP/2 interage com Cdc42 e Rac 1. Apesar de apenas Rac 1 e Cdc42 ligarem a IQGAP/2, RhoA também pode regular indiretamente a ativação de E-caderina possibilitando a reorganização do citoesqueleto de actina (NATALE e WATSON, 2002).

As P21-Activated Kinase (PAK) uma serina/treonina Kinase são importantes proteínas efetoras, ativadas a partir da ligação de RAC1 e Cdc42 (WADLAMUDI e KUMAR, 2003; SZCZEPANOWSKA, 2009).

As PAKs estão associadas às GTPases Rho por mediarem a tumorigênese, e estão envolvidas em diversos aspectos de tumores biológicos (WADLAMUDI e KUMAR, 2003).

A sinalização das PAKs interferem na formação de filopódios e a perda nesta formação sugere que em células transformadas oncogenicamente podem interferir nas sinalização das GTPases Rho (HECHMAN *et al.*, 2009).

1.6.5. As GTPases Rho na Tumorigênese

A alta incidência de uma super expressão de alguns membros da família das GTPases Rho em humanos com tumores, sugerem que essas proteínas são importantes no processo de carcinogênese e também potencial candidatas para uma intervenção terapêutica.

Em estudos, a caracterização dos efetores *downstream* das GTPases Rho tem aumentado o entendimento sobre esses efetores celulares permitindo o estudo de proliferação anormal e a motilidade de células tumorais. Além disso, alteração nos fatores de transcrição tem sido identificada como importante papel de níveis variados na indução tumorigênica das GTPases Rho (AZNAR *et al.*, 2003).

Entretanto, a super expressão de GTPases Rho do tipo selvagem resulta em aumento de renovação de GTP, com o mesmo resultado final, aumentando subsequentemente a sinalização *downstream*. A super expressão de uma ou outra GTPases ou algum de seus elementos são detectadas em muitos tumores humanos sugerindo serem elementos chaves no processo de tumorigênese (GOMES DEL PULGAR *et al.*, 2005; BOETTNER e AELST, 2002).

As GTPases Rho influenciam na tumorigênese em vários níveis. Elas promovem a transição independente de G1 para S ou por componentes *downstream* de outros sinais pró-tumorigênicos de muitos tipos celulares. Rho A inibe p21Cip1, p27Kip e P16nk4 ativas ao qual permite uma correta progressão do ciclo celular (VIDAL *et al.*, 2002).

O estado de ativação da GTPases Rho em tumores não foi investigado sistematicamente. As alterações na expressão de reguladores das GTPases Rho afetam a formação do tumor. De fato, níveis elevados de expressão de Rho, GEFs, Vav, Trio e Tiam-1 foram encontrados em tumores de mama com prognóstico ruim (LANE *et al.*, 2008).

As funções da GTPases Rho estão intimamente relacionadas em vários aspectos da progressão do câncer, por exemplo RhoA antagonizando RhoB (VEGA e RIDLEY, 2008). Além disso, efetores tais como PAK e ROCK, elementos *downstream* Rac, Cdc42, Rho, respectivamente, são superregulados em alguns tipos de câncer (KAMAI *et al.*, 2004).

Com os estudos das GTPases Rho na invasão de células cancerosas vieram os estudos dos membros RhoA, Rac1 e Cdc42 e RhoC, porém pouco se sabe a

respeito de outros membros da família, embora são conhecidos por influenciarem no citoesqueleto da actina. e necessários para esclarecer suas funções destes na tumorigênese *in vivo* (VEGA e RIDLEY, 2008).

Proteínas RhoBTB têm sido sugeridas como supressores de tumor, uma vez que RhoBTB2 foi identificado como um gene suprimido homozigóticos de neoplasias de cabeça e pescoço e quase 50% das linhagens celulares do câncer de mama (KNOWLES *et al.*, 2005).

Evidências têm mostrado que a proteína Kinase C (PKC) é um oncogene e tem um papel na progressão do carcinoma epidermóide oral e indicam RhoA e RhoC estão *downstream* de PKC e são responsáveis pela regulação e ativação respectivamente de PKC (PAN *et al.*,2006).

Os resultados deste estudo podem fornecer uma contribuição importante para a compreensão das vias de transdução de sinal reguladoras de processos biológicos envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide oral. Uma vez que as proteínas GTPases Rho parecem estar envolvidas na regulação de processos biológicos em outras neoplasias.

2. HIPÓTESE

As proteínas GTPases Rho exercem um papel funcional na regulação da proliferação e diferenciação celular, por meio de via de sinalização envolvendo os efetores PI 3-Kinase e ROCK, em carcinoma epidermóide oral, *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel funcional das proteínas GTPases Rho na proliferação e na diferenciação celular de carcinoma epidermóide oral, *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a expressão das GTPases Rho (RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1) em células de carcinoma epidermóide oral por citometria de fluxo.
2. Avaliar o papel funcional das GTPases Rho na proliferação celular, por meio da sua inativação com Toxina A de *Clostridium difficile* e verificar o envolvimento de suas proteínas efetoras: ROCKs (por meio da sua inativação com Y-27632) e PI 3-kinase (por meio da sua inativação com Wortmannin de *Penicillium fumiculosum* e LY 294002). E, se as GTPases Rho participam da via de transdução de sinal iniciada pelo ácido L- α -lisofosfatídico (LPA), pelo tratamento simultâneo com LPA e Toxina A de *Clostridium difficile* em células de carcinoma epidermóide oral.
3. Avaliar o papel funcional das GTPases Rho na diferenciação celular, por meio da sua inativação com Toxina A de *Clostridium difficile* em células de carcinoma epidermóide oral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Mixture/HAM F-12* (DMEM-F12), *Penicilin Streptomycin* e *bromodeoxyuridine* (BrdU), *L- α -lysophosphatidic acid* (LPA), *bromodeoxyuridine* (BrdU), *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), Wortmannin de *Penicillium fumiculosum*, LY 294002, dimethylsulfoxide (DMSO) e os sais foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). *Hank's Solution Balanced Salt Solution* (HBSS), tripsina e colagenase foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY). O soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Cultilab (Campinas, SP). O Matrigel[®] foi obtido da Beston Dickenson Bioscience (Bedford, MA). Os inibidores Toxina A de *Clostridium difficile* e Y-27632 foram obtidos da List biological (Campbell, CA) e da Calbiochem (San Diego, CA), respectivamente. Os anticorpos policlonais de coelho anti-RhoA, anti-RhoB, anti-Rac1, anti-Cdc42 foram obtidos Santa Cruz Biotechnology. O anticorpo monoclonal de rato anti-BrdU (OBT 0030) e o monoclonal de camundongo clone anti-humano AE1/AE3 de citoqueratina foram obtidos, respectivamente, da Accurate Chemical (New York, NY) e DAKO (North América, USA). Rodamina conjugada à faloidina, anticorpo cabra anti-IgG de coelho-Alexa 488 e Cabra anti-IgG de mouse-Alexa 488 foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, OR).

4.2. Casuística

Foram utilizados oito casos de carcinoma epidermóide oral (CEO). As amostras foram obtidas de indivíduos submetidos à biopsia por necessidade diagnóstica ou tratamento cirúrgico. Todos os indivíduos assinaram um termo de esclarecimento que consta no Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da UFTM (Protocolo nº 804, Anexo 1).

Foram observados como critérios para inclusão dos casos: confirmação do diagnóstico de CEO por laudo anátomo-patológico; dimensão do material suficiente para análise anátomo-patológica e para a cultura de células quando provenientes de uma biopsia incisional e possibilidade de seleção da área de forma a não comprometer a integridade da peça cirúrgica nos casos obtidos no tratamento cirúrgico de CEO. As amostras coletadas para este estudo foram compostas exclusivamente por área lesional sem aspecto macroscópico de necrose ou degeneração tecidual. Foram excluídas 10 amostras cujas culturas primárias de células apresentaram contaminação por bactérias ou fungos.

4.3. Cultura Primária das Células

As células de carcinoma epidermóide oral foram coletadas em meio DMEM/10% Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina).

As amostras foram levadas para capela com fluxo laminar em condições estéreis, lavadas com HBSS e incubadas com tripsina 2% por 2h e com colagenase 2% por 2h, centrifugadas a 1600 rpm por 5 min.

As células foram semeadas em garrafa T75 e cultivadas em meio DMEM-F12/SFB 10%, 1% antibióticos de 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em estufa.

4.4. Ensaio de Proliferação Celular

Cerca de 1×10^5 células foram semeadas em tubos para citometria de fluxo de 5 mL. Foram adicionados aos tubos 0,5 µg/mL de BrdU, os inibidores: Toxina A de *Clostridium difficile* 4 µg/mL, Wortmannin de *Penicillium fumiculosum* 0,2 µM, LY294002 60 µM, Y-27632 30 µM e controle do veículo DMSO em DMEM/SFB 20%/ antibióticos 1%. As células foram cultivadas com LPA 100 µM com /sem Toxina A de *Clostridium difficile* 4 µg/mL, diluídos em DMEM sem SFB. As células com/sem tratamento foram cultivadas com inibidores e LPA por 12 h em estufa úmida, com atmosfera 5% CO₂/ 95% ar a 37 °C.

4.5. Reação de Imunofluorescência para Citometria de fluxo

Os tubos para citometria de fluxo foram lavados com D-PBS com cálcio e magnésio por 5 min e em D-PBS sem cálcio e magnésio, por 5 min. A fixação foi feita por paraformaldeído 4% por 30 min. Após duas lavagens com D-PBS por 5 min, foi feita a permeabilização com Triton X-100 0,2% por 5 min. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com BSA 1% por 20 min. A incubação com anticorpos primários contra RhoA, RhoB, Rac1, Cdc42 e citoqueratina na diluição 1:50 em D-PBS/BSA 0,1% foi feita por 2 h. Após duas lavagens com D-PBS por 5 min, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário cabra anti-coelho ou anti-camundongo marcado com Alexa 488 diluído 1:1000 em D-PBS por 2h.

Os controles da imunofluorescência foram incubados com anticorpo secundário de cabra anti-coelho controle ou com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo.

4.6. Análise por Citometria de Fluxo

Os experimentos de expressão das GTPases Rho e incorporação de BrdU foram analisados no citômetro de fluxo Facs Calibur BD Biosciences.

Os resultados foram analisados de forma adaptada ao descrito por WILSON *et al.* (1988). Como a quantidade de imunofluorescência aumenta proporcionalmente à

incorporação de BrdU pelas células durante a síntese de DNA, foram analisadas as quantidades de células de dois Gates.

4.7. Ensaio de Diferenciação Celular

As células foram cultivadas até semi-confluência para realização dos experimentos. Após tripsinização, as células foram centrifugadas a 1600 rpm por 5min, ressuspensas em DMEM-F12 contendo SFB 10% e contadas em câmara de Neubauer.

Cerca de $1,0 \times 10^4$ células foram ressuspensas com Matrigel[®] adicionando ou não os inibidores: para GTPases Rho, Toxina A de *Clostridium difficile* em três concentrações 2 µg/mL, 4 µg/mL e 8 µg/mL; para PI 3-kinase, Wortmannin de *Penicillium fumiculosum* 0,4 µM e LY294002 60 µM; para ROCK, Y-27632 30 µM. O DMSO foi usado como controle de veículo nos mesmos volumes incluídos de Wortmannin e LY 294002. As células foram cultivadas sem SFB em Matrigel[®] adicionando LPA 100 µM sem/com Toxina A de *Clostridium difficile* 4 µg/mL. Os géis foram colocados em placas de cultura com seis poços contendo lamínulas.

4.8. Reação de Imunofluorescência

Após 48 h de cultivo, as células foram lavadas com D-PBS (KCL 2,67 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 138 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,1 mM) com cálcio e magnésio

(CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂-6H₂O 0,5 mM) por 5 min e em D-PBS sem cálcio e magnésio por 5min.

A fixação foi feita por paraformaldeído 4% por 30 min. Após a lavagem com D-PBS por 5 min, foram permeabilizadas com Triton X-100 0,2% por 5 min. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com BSA 1% por 20 min.

A incubação com anticorpos primários anti-RhoA, anti-RhoB, anti-Rac1, anti-Cdc42 e anti-citoqueratina na diluição 1:50 em D-PBS/BSA 0,1% foi feita *overnight*. Após duas lavagens com D-PBS por 5 min, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa 488 diluído 1:1000 em D-PBS/BSA 0,1% por 2h em TA. Evidenciação de F-actina com rodamina conjugada à faloidina, 1:100 foi feita por 30min e a evidenciação dos núcleos com DAPI 1:100 por 15min.

O controle negativo consistiu da incubação apenas com anticorpo secundário cabra anti-coelho ou com cabra anti-camundongo. Após duas lavagens com DPBS as lâminas foram montadas com glicerol-carbonato.

4.9. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados com o programa eletrônico GraphPad InStat[®]. As variáveis foram analisadas com o teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar se a distribuição das amostras foi normal. Foram utilizados os testes: análise de variância (ANOVA) e *two way* ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização celular de cultura primária CEO

O isolamento das células neoplásicas obtidas de cultura primária de CEO foi monitorado por meio de análise no citômetro de fluxo de reações de imunofluorescência para citoqueratina de baixo e alto peso molecular das amostras utilizadas nos ensaios de diferenciação e proliferação celular (Figura 2).

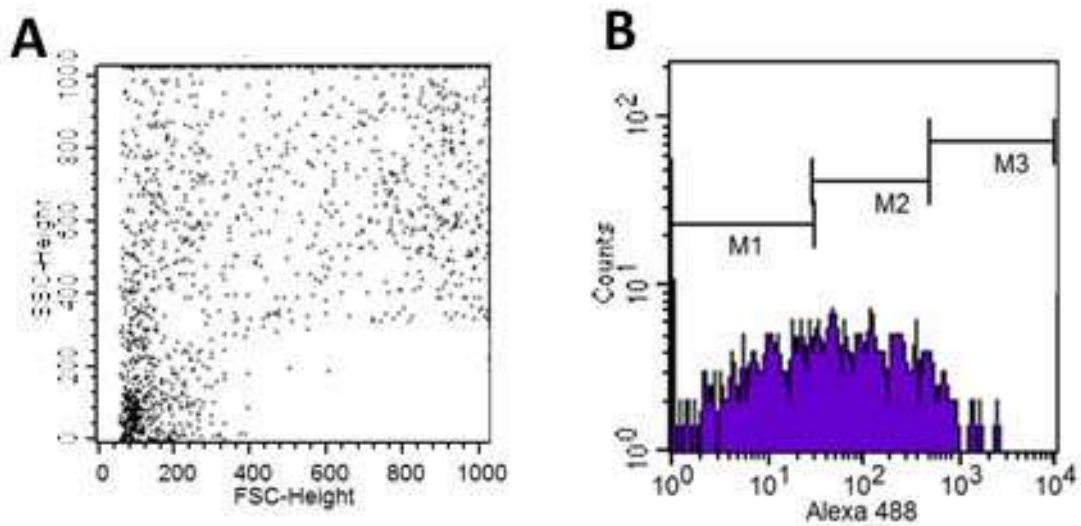


Figura 2 - Expressão de citoqueratina em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise por citometria de fluxo. (A) População de células analisadas, (B) Marcação para citoqueratina de baixo e alto peso molecular.

5.2. Perfil de expressão das GTPases Rho células de cultura primária de CEO

As células de CEO de todas as amostras expressaram as GTPases RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 com grande variabilidade de intensidade de marcação.

As células apresentaram marcação para proteína RhoA, no entanto não houve diferença significativa ($p = 0,974$) entre a quantidade de células de carcinoma epidermóide oral com imunomarcação fraca ($32,36 \pm 19,64$), moderada ($39,81 \pm 3,18$) e intensa ($29,07 \pm 22,57$), Figura 3.

Não houve diferença significativa ($p = 0,3649$) entre a quantidade de células de carcinoma epidermóide oral com imunomarcação fraca ($19,44 \pm 13,38$), moderada ($42,83 \pm 2,02$) e intensa ($39,00 \pm 14,51$) para a proteína RhoB (Figura 4).

Do mesmo modo, não houve diferença significativa ($p = 0,7064$) entre quantidade de células de carcinoma epidermóide oral com imunomarcação para Cdc42 nas intensidades: fraca ($23,56 \pm 11,76$), moderada ($32,37 \pm 12,52$) e intensa ($44,30 \pm 24,21$), Figura 5.

Também não houve diferença significativa ($p = 0,9850$) entre a quantidade de células de carcinoma epidermóide oral que expressaram Rac1 nas intensidades: fraca ($36,03 \pm 18,95$), moderada ($31,11 \pm 12,35$) e intensa ($33,50 \pm 26,25$), Figura 6.

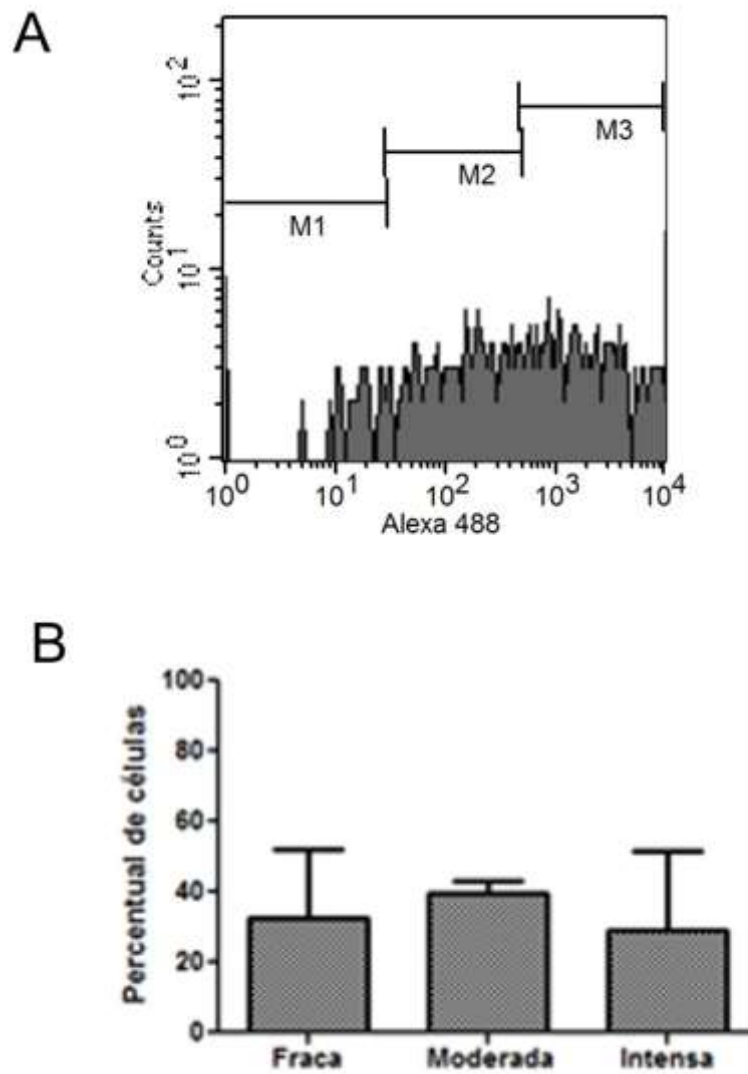


Figura 3 - Expressão da GTPase RhoA em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise por citometria de fluxo. Quantificação das células com marcação: fraca (Gate 1), moderada (Gate 2) e intensa (Gate 3). Resultado representativo de três experimentos independentes.

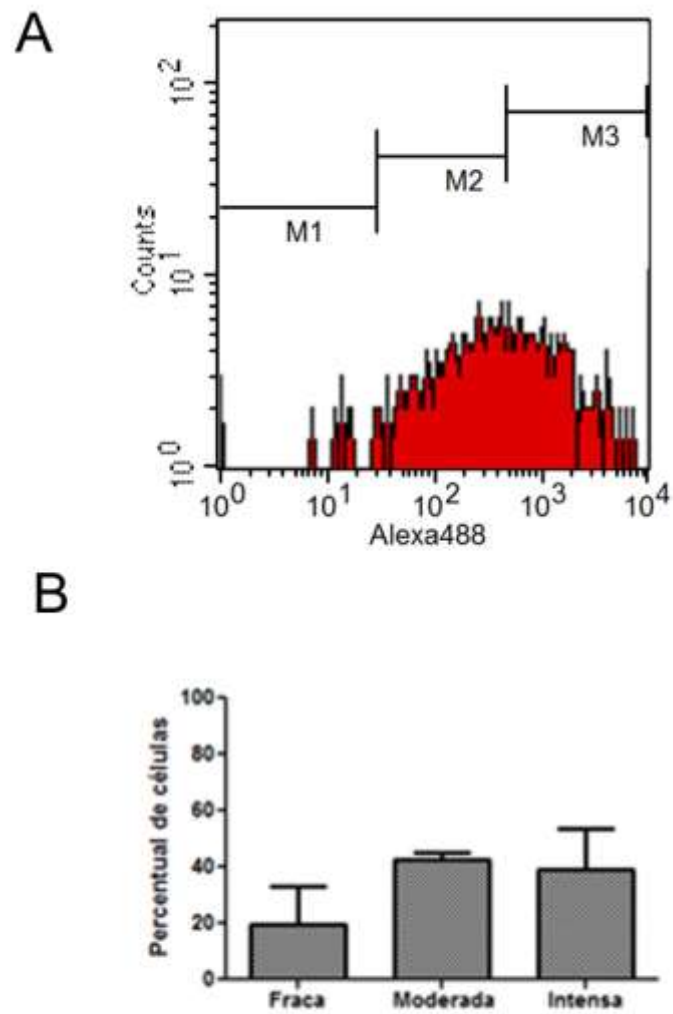


Figura 4 - Expressão da GTPase RhoB em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise por citometria de fluxo. Quantificação das células com marcação: fraca (Gate 1), moderada (Gate 2) e intensa (Gate 3). Resultado representativo de três experimentos independentes.

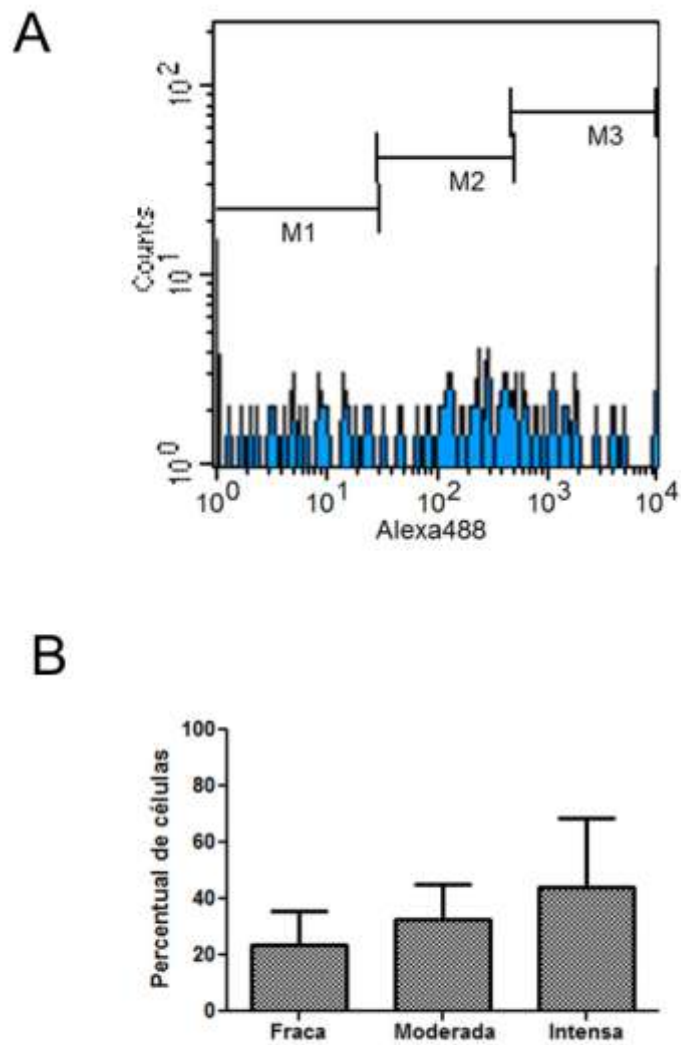


Figura 5 - Expressão da GTPase Cdc42 em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise por citometria de fluxo. Quantificação das células com marcação: fraca (Gate 1), moderada (Gate 2) e intensa (Gate 3). Resultado representativo de três experimentos independentes.

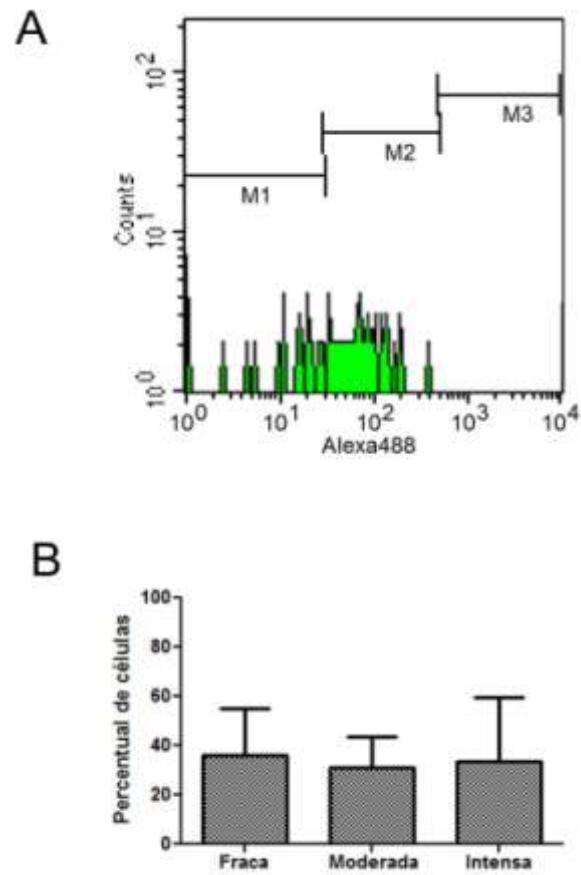


Figura 6 - Expressão da GTPase Rac1 em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise por citometria de fluxo. Quantificação das células com marcação: fraca (Gate 1), moderada (Gate 2) e intensa (Gate 3). Resultado representativo de três experimentos independentes.

5.4. Papel funcional das GTPases Rho na proliferação celular de CEO

A regulação da proliferação celular por GTPases Rho e a participação dessas proteínas na via de sinalização iniciada pelo LPA em células de cultura primária de CEO foram analisadas por meio de ensaios de incorporação de BrdU e análise por citometria de fluxo.

O perfil de marcação para BrdU em células controle (Gate 1 = $67,637 \pm 9,443$ e Gate 2 = $32,553 \pm 9,289$) e em células tratadas com o inibidor de amplo espectro das GTPases Rho Toxina A de *Clostridium difficile* (Gate 1 = $58,317 \pm 12,206$ e Gate 2 = $41,863 \pm 12,275$) foi similar ($p = 0,4176$). Para o fator tratamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,9996$), mas foi significativa entre os Gates 1 e 2 ($p = 0,0456$), Figura 7.

Como esperado, o LPA estimulou a proliferação celular em células de CEO com SFB suprimido, quando comparado com as células controle, no entanto não houve diferença significativa ($p = 0,4525$). Embora os resultados tenham mostrado uma tendência de variação, na via de sinalização iniciada pelo LPA, não houve diferença ($p = 0,5259$) entre o perfil de marcação para BrdU de células controle e células tratadas com LPA e nem nas células tratadas com LPA associado à Toxina A de *Clostridium difficile*. Para o fator tratamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p = 1,0000$) nem entre os Gates 1 e 2 ($p = 0,8542$), Figura 8.

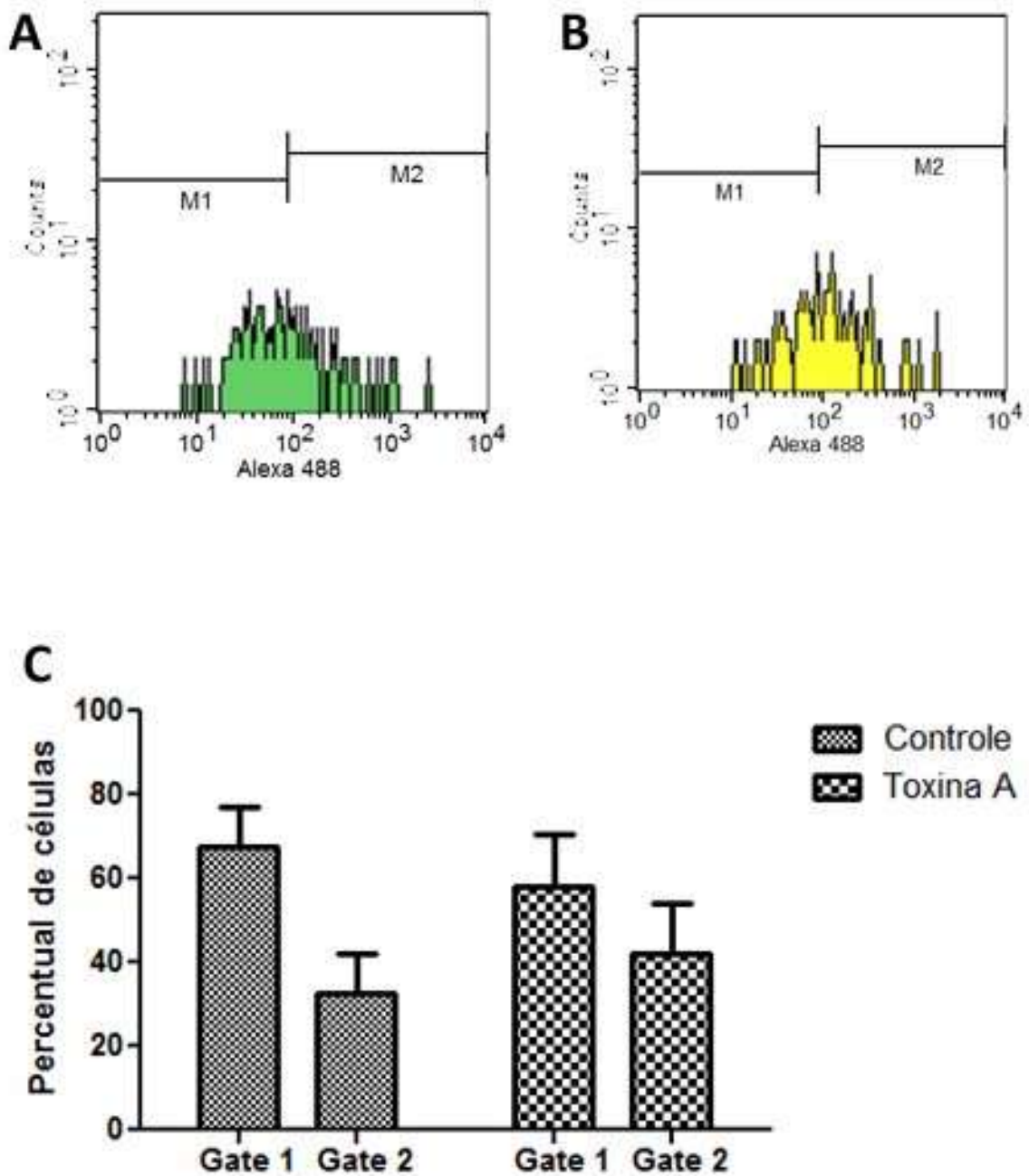


Figura 7 - Papel funcional das GTPases Rho na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Tratamento com BrdU por 12 horas. Quantificação das células imunomarcadas para BrdU por análise por citometria de fluxo. (A) Células controle; (B) células tratadas com 4 $\mu\text{g/mL}$ de Toxina A de *Clostridium difficile*; e (C) Gráfico da média do percentual de células nos Gates 1 e 2. Resultado representativo de três experimentos independentes. Teste *two-way* ANOVA, fator tratamento $p > 0,05$ e fator Gates $p < 0,05$.

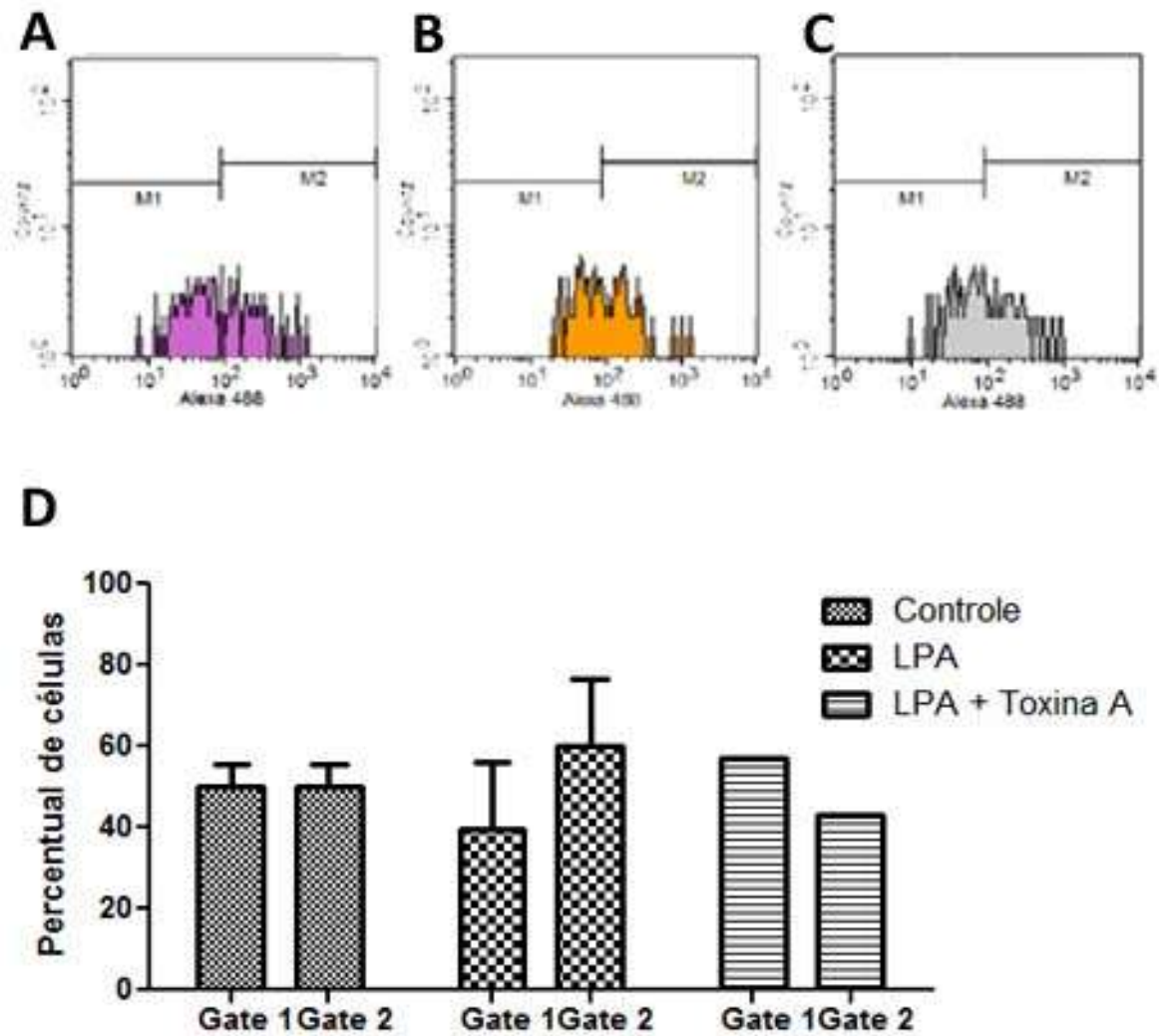


Figura 8 - Análise por citometria de fluxo da marcação de BrdU em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral tratadas com LPA e/ou Toxina A sem SFB. Tratamento com BrdU por 12 horas. Resultado representativo de dois experimentos independentes. (A) Células não tratadas cultivadas sem SFB; (B) Células tratadas com LPA 100 μ M cultivadas sem SFB; (C) Células tratadas com LPA 100 μ M e 4 μ g/mL de Toxina A de *Clostridium difficile* cultivadas sem SFB; e (D) Gráfico da média do percentual de células nos Gates 1 e 2. Resultado representativo de dois experimentos independentes. Teste *two way* ANOVA, fator tratamento $p > 0,05$ e fator Gates $p > 0,05$.

5.5. ROCKs na proliferação celular de CEO

A regulação da proliferação celular pelas proteínas ROCKs em células de cultura primária de CEO foi analisada por meio de sua inativação com Y27632, ensaios de incorporação de BrdU e análise por citometria de fluxo.

Com a inibição das proteínas ROCKs pelo tratamento das células com o inibidor Y27632 não houve diferenças ($p = 0,1429$) do perfil de marcação para BrdU entre as células controle (Gate 1 = $58,205 \pm 0,795$ e Gate 2 = $41,830 \pm 0,830$) e as células tratadas (Gate 1 = $48,245 \pm 7,795$ e Gate 2 = $52,830 \pm 7,820$). Para o fator tratamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,9844$), nem entre os Gates 1 e 2 ($p = 0,3187$), Figura 9.

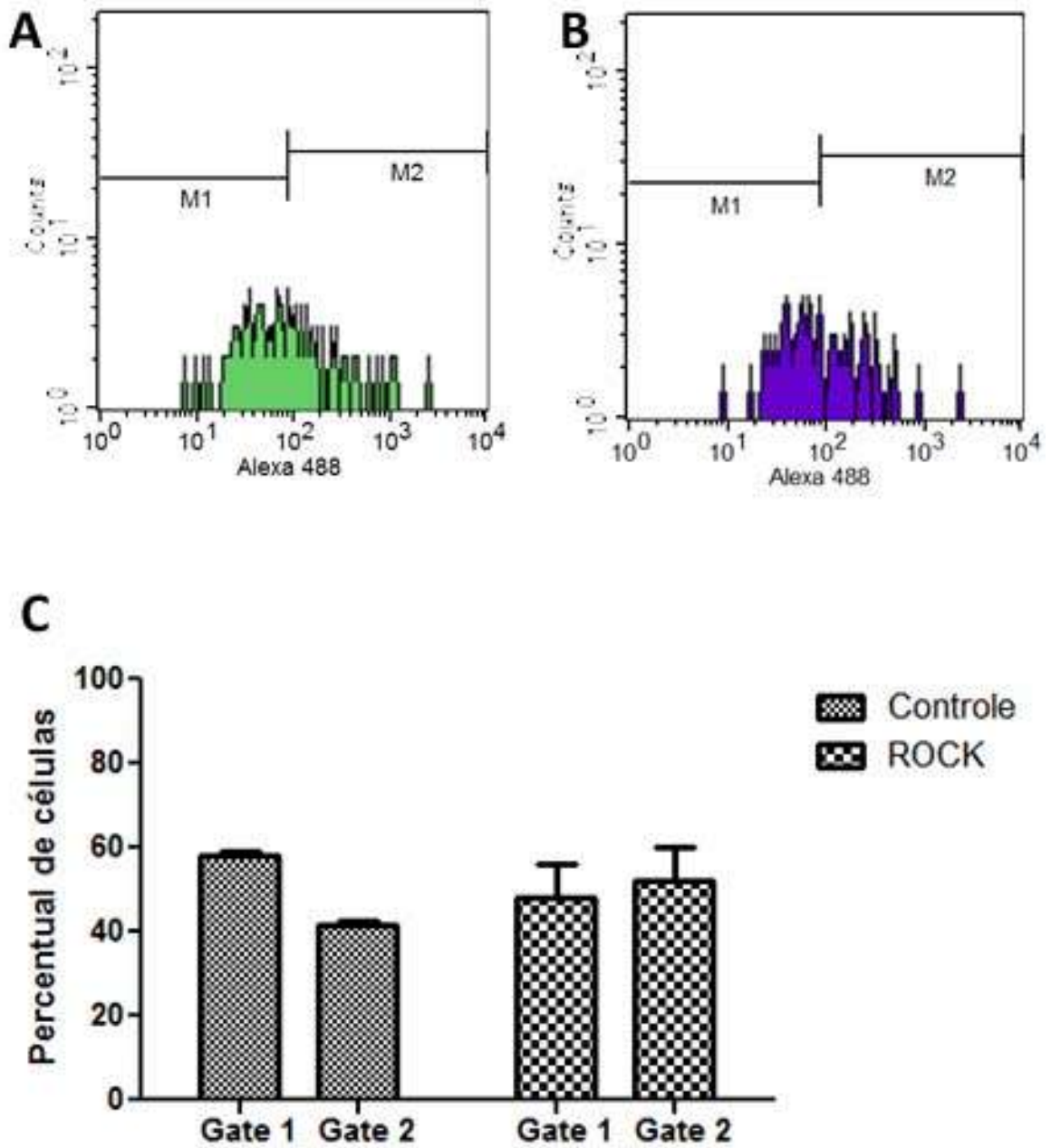


Figura 9 - Papel funcional das ROCKs na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Tratamento com BrdU por 12 horas. Quantificação das células imunomarcadas para BrdU por análise por citometria de fluxo. (A) Células não tratadas; (B) Células tratadas com Y-27632 30 μ M; e (C) Gráfico da média do percentual de células nos Gates 1 e 2. Resultado representativo de dois experimentos independentes. Teste *two-way* ANOVA, fator tratamento $p > 0,05$ e fator Gates $p > 0,05$.

5.5. PI 3-kinase na proliferação celular de CEO

A regulação da proliferação celular pelas proteínas PI 3-Kinase em células de cultura primária de CEO foi analisada por meio de sua inativação com Wortmannin ou LY 294002, ensaios de incorporação de BrdU e análise por citometria de fluxo.

O perfil de marcação para BrdU das células controle do veículo (Gate 1 = $49,285 \pm 1,715$ e Gate 2 = $50,860 \pm 1,660$) e das tratadas com o inibidor de PI 3-kinase Wortmannin (Gate 1 = $49,530 \pm 1,870$ e Gate 2 = $50,870 \pm 1,670$) foi similar ($p = 0,9491$; para o fator tratamento, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,9448$), nem entre os Gates 1 e 2, $p = 0,4471$), Figura 10.

No entanto, o perfil de marcação para BrdU das células controle do veículo e das células tratadas com o inibidor LY 294002 (Gate 1 = $38,145 \pm 1,855$ e Gate 2 = $62,230 \pm 1,830$) foi diferente estatisticamente ($p = 0,0031$). Para o fator tratamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,9512$), mas foi significativa entre os Gates 1 e 2, $p = 0,0019$), Figura 10.

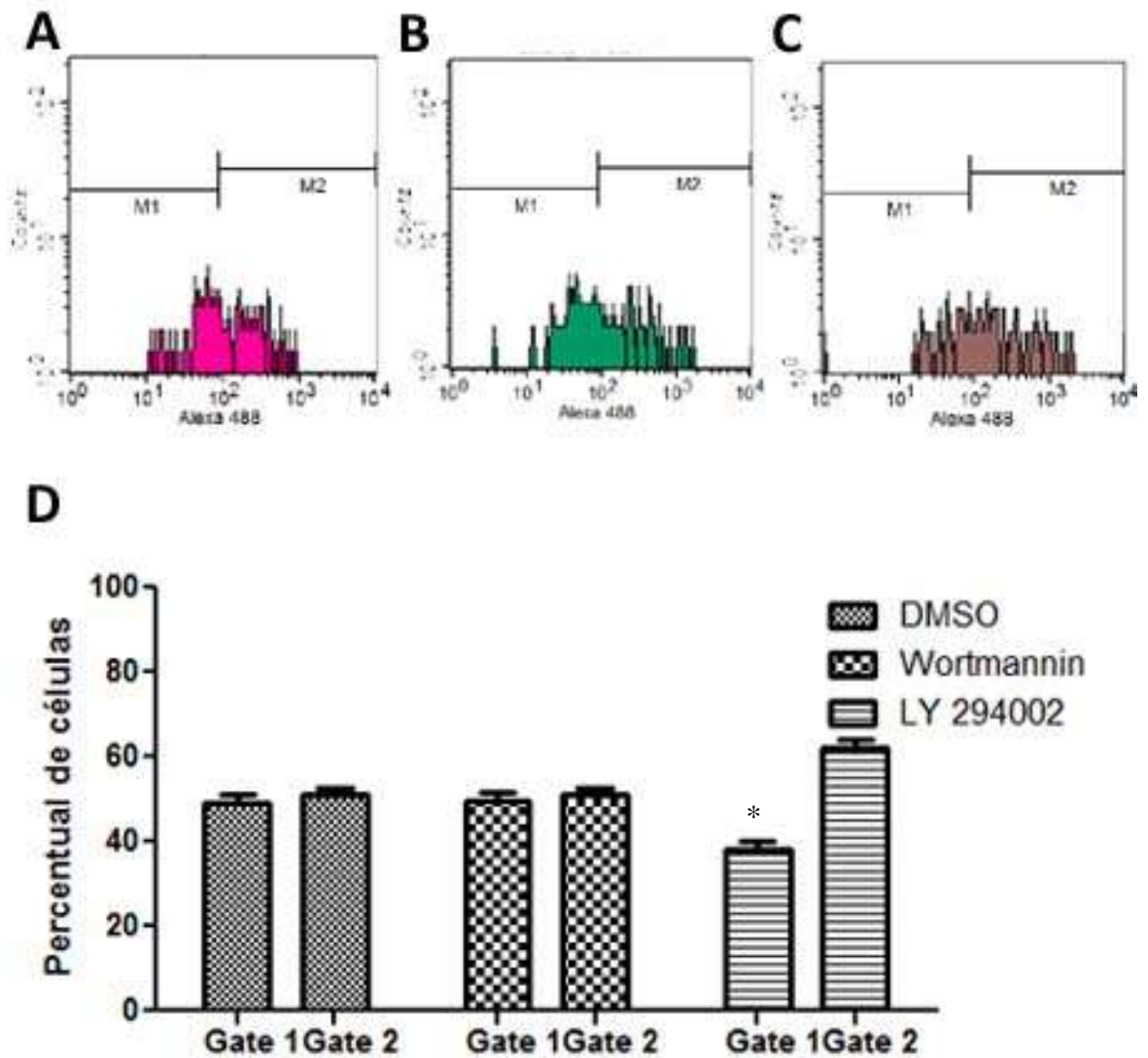


Figura 10 - Papel funcional das PI 3-kinases na proliferação celular de cultura primária de carcinoma epidermóide oral tratadas. Tratamento com BrdU por 12 horas. Quantificação das células imunomarcadas para BrdU por análise por citometria de fluxo. (A) Células não tratadas (controle veículo DMSO); (B) Células tratadas com Wortmannin 0,2 μM; (C) Células tratadas com LY-294002 60 μM; e (D) Gráfico da média do percentual de células nos Gates 1 e 2. Resultado representativo de dois experimentos independentes. Teste *two-way* ANOVA, tratamento Wortmannin, fator tratamento $p > 0,05$ e fator Gates $p > 0,05$; tratamento LY 294002 fator tratamento $p > 0,05$ e fator Gates $p < 0,05$.

5.3. Papel funcional das GTPases Rho na diferenciação celular de CEO

Para avaliar o envolvimento das GTPases Rho na diferenciação de células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral foi utilizado um inibidor de amplo espectro, a Toxina A de *Clostridium difficile*, que inativa as GTPases Rho através da glicosilação de um resíduo treonina específico e impede interações destas GTPases com moléculas efetoras. O inibidor foi adicionado ao Matrigel[®] em duas concentrações diferentes (2 µg/mL e 4 µg/mL) e as células neoplásicas foram então cultivadas por 48 h.

Células cultivadas em cultura tridimensional de Matrigel[®] apresentaram um citoplasma bem desenvolvido. A evidenciação da actina filamentosa mostrou citoesqueleto proeminente e córtex evidente (Figura 11 A). No entanto, as células com as GTPases Rho inibidas apresentaram citoplasma reduzido. As células pareceram apresentar dificuldade para se diferenciar, de uma maneira concentração-dependente. Quanto maior a concentração da toxina, menos diferenciadas estavam as células (Figura 11 B-C). O tratamento com uma concentração elevada de toxina A (4 µg/mL) promoveu alterações na forma das células e grande desorganização do citoesqueleto de actina (Figura 11 C).

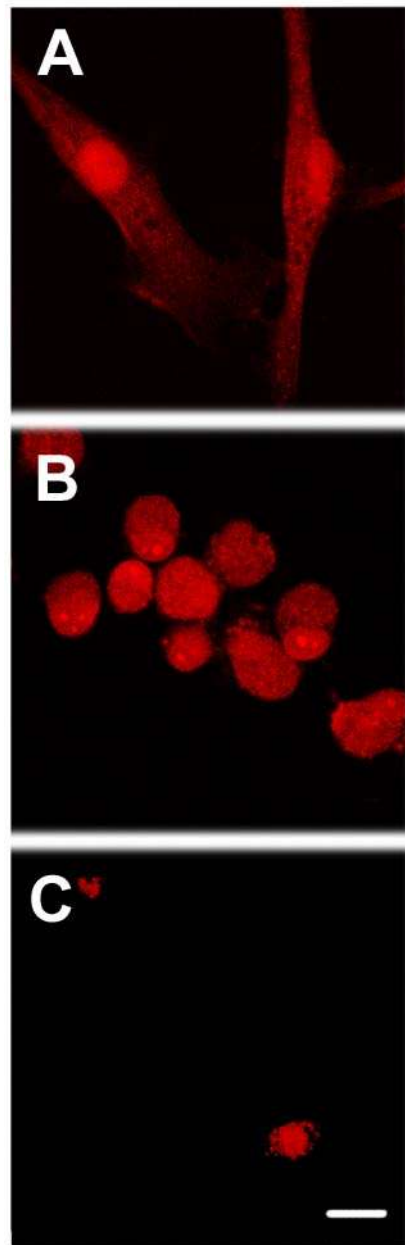


Figura 11 - Efeito do tratamento com Toxina A, inibidor das GTPases Rho em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. Análise confocal de uma secção na região central das células. Marcação da F-actina com rodamina conjugada à faloidina. Células não tratadas (A); células tratadas com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) toxina A por 48 horas. Barra = 15 μm .

Neste estudo foi demonstrado que células de carcinoma epidermóide oral em cultura primária expressam as proteínas GTPases RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1. Os resultados obtidos com inibidores como a Toxina A de *Clostridium difficile*, capaz de inibir todas as GTPases (LERM *et al.*, 2000), sugerem que essas proteínas parecem não participar da regulação da proliferação celular. Entretanto, as GTPases Rho parecem ser importantes para a regulação das vias de transdução de sinal envolvidas na diferenciação dessas células.

A alta incidência de uma super expressão de membros das GTPases Rho em neoplasias sugere que essas proteínas são importantes no processo de carcinogênese e potencial candidatas à intervenção terapêutica (AZNAR *et al.*, 2004). A participação das GTPases nos processos biológicos pode variar de acordo com o tipo celular e a composição da MEC (CHIOU *et al.*, 2003). Desse modo, a expressão das GTPases RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 avaliada em cultura primária de carcinoma epidermóide oral neste estudo indicam que essas proteínas podem desempenhar um papel funcional importante nos processos envolvidos na tumorigênese.

Em carcinoma epidermóide oral, foi descrita uma superexpressão de Rac1 por meio de imunohistoquímica e PCR, quando comparado com os tecidos adjacentes às lesões *in vivo* (LIU *et al.*, 2004). Em linhagem de células de carcinoma epidermóide oral, a via de sinalização de Vav2 (GEFs) parece ser importante para a modulação da invasão celular através da regulação específica de Rac1 e Cdc42 (LAI *et al.*, 2008).

Estudos recentes identificaram uma molécula multifuncional, miR-138, que regula processos biológicos celulares e desempenha um papel fundamental regulando dois genes chaves na via de sinalização das GTPases: RhoC e ROCKII em linhagem de carcinoma epidermóide oral de língua (JIANG *et al.*, 2010).

Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, RhoA, Rac2 e Cdc42 foram altamente expressas quando comparadas com os queratinócitos normais em avaliação por imunohistoquímica (ABRAHAM *et al.*, 2001). Em outro estudo por imunohistoquímica de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, RhoA apresentou um nível de marcação predominante em citoplasma comparados com epitélio não neoplásico. Enquanto, RhoB está expressa em diferentes estágios histológicos localizada nos núcleos e citoplasma nas lesões. A ausência de marcação de RhoB sugeriu sua contribuição para a progressão de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (ADNANE *et al.*, 2002).

Em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, o nível de expressão e atividade da proteína RhoC foi avaliado por Western Blots e imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que essa proteína está altamente ativa em células neoplásicas quando comparadas ao epitélio normal (KLEER *et al.*, 2006).

As GTPases Rho têm sido relatadas por contribuírem com a iniciação e progressão do câncer incluindo a aquisição de potencial ilimitado de proliferação, sobrevivência e evasão de apoptose, invasão de tecidos e o estabelecimento de metástases (VEGA e RIDLEY, 2008). Entretanto, neste estudo foi demonstrado que as GTPases parecem não participar da regulação da proliferação celular em células de carcinoma epidermóide oral.

Sobrevivência e proliferação celular descontrolada são recursos que as células neoplásicas utilizam para não sofrerem apoptose evoluindo em crescimento tumoral. A hiperfosforilação de pRb induzindo a transcrição dependente de E2F pode ser potencializada pela expressão de RhoA, Rac1 e Cdc42 e suprarregulam a atividade da ciclina D1 para permissão de progressão para a Fase S (AZNAR *et al.*, 2004).

O LPA é o mais simples de todos os glicerofosfolípidos, um potente indutor de proliferação celular, migração e sobrevivência. Dos receptores de LPA, quatro deles já foram bem identificados e são conhecidos por ativar diversas vias de transdução de sinal iniciadas pelas pequenas GTPases Rho (VAN LEEUWEN *et al.*, 2003).

Nossos resultados mostraram que as GTPases Rho parecem participar da regulação da proliferação celular iniciada pela via do LPA. Além de ser um mediador lipídico para estimular a proliferação celular, o LPA produz alguns mediadores parácrinos da remodelação tecidual, angiogênese, inflamação e progressão tumoral e atua em pelo menos em cinco diferentes receptores acoplados a proteína G (STORTELEERS *et al.*, 2008).

Foram identificados vários efetores de Rho envolvidos na proliferação celular como mDia 1/2, ROCK, porém essas proteínas também estão envolvidas com a dinâmica do citoesqueleto de actina, motilidade, adesão e morfogênese, dado o equilíbrio de expressão de ambas (NARUMIYA *et al.*, 2009).

Estudos com interação de proteína sugerem que ROCK e Citron-K têm uma maior afinidade para RhoC quando comparada com RhoA e RhoB. Além disso, a proteína RhoC parece ter uma maior capacidade de ativar ROCK em células epiteliais (KAIBUCHI., *et al.*, 1999; SAHAI e MARSHAL, 2002).

Nossos resultados mostraram que as ROCKs, proteínas efetoras das Rho propriamente ditas, parecem não participar da regulação da proliferação celular, um importante processo biológico no processo de tumorigênese, em células de carcinoma epidermóide oral. No entanto, estudos já demonstraram previamente que a via de sinalização de RhoA/ROCK desempenha um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação celular. Em queratinócitos humanos normais em cultura, foi analisado qual isoforma de ROCK estava envolvida na regulação da diferenciação dos queratinócitos, sugerindo que ROCKI e ROCKII desempenham papéis distintos, uma na regulação da adesão e a outra na diferenciação de queratinócitos, respectivamente (LOCK e HOTCHIN, 2009).

Essa via de sinalização de ROCK também pode induzir apoptose em células de câncer de próstata através de regulação do receptor androgênico de membrana e participar da inibição da proliferação e promoção da diferenciação de células de câncer de cólon (ORDÓNEZ MORÁN *et al.*, 2008).

Em queratinócitos normais ou malignos a expressão de metaloproteinase (MT1MMP) pode resultar em um efeito anti-tumorigênico pela ativação da via de sinalização de ROCK 1/2 aumentando a interação célula-célula (DANGI-GARIMELLA *et al.*, 2010).

Com a inativação de ROCK há uma promoção de invasão e migração de células de carcinoma epidermóide oral, sugerindo que a inibição de ROCK pode facilitar esses processos biológicos. O substrato de laminina-5 suprime RhoA e ativa fortemente Cdc42, conduzindo a resposta da motilidade. A funcionalidade dos receptores de integrina e seus ligantes, juntos, podem modular seletivamente os membros da família Rho e controlar diferentes tipos celulares em resposta a estímulos por diferentes substratos da MEC (ZHOU e KRAMER, 2005).

No entanto, as ROCKs têm sido envolvidas na migração e invasão tumoral. Para que ocorra metástase, as células tumorais têm que cruzar limites do tecido, o que requer motilidade celular aumentada remodelando o citoesqueleto e os contatos celulares com a matriz extracelular. Vias intrínsecas e extrínsecas ativadas convergem para estimular as GTPases Rho, incluindo RhoA e Rac1, reguladores fundamentais do citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, da migração celular (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002).

Pesquisadores investigaram a mobilidade de células de carcinoma epidermóide de esôfago e sugeriram que a mobilidade dessas células foi elevada devido à mudança do rearranjo de actina, resultado do aumento do nível de fosforilação de Cofilin por ativação de ROCK. Contudo, Y-27632 não apenas aumenta a adesão célula-célula pela alta regulação de E-Caderina, mas também pela redução da mobilidade celular pela baixa regulação de fosforilação de Cofilin, sugerindo que a via de sinalização de ROCK pode ser a primeira responsável pela invasão e metástases dessas células (WANG *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostram que o inibidor de ROCK, Y-27632 causou uma redução significativa nos níveis de RhoA, PI-3Kinase e proteínas *downstream* de PI 3-Kinase, sugerindo que RhoA pode regular a expressão das proteínas relacionadas à PI 3-Kinase (CHANG *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi demonstrado que a via de sinalização da PI 3-Kinase parece participar da regulação da proliferação celular, especialmente nas células tratadas com o inibidor LY294002. A importância da sinalização de ROCK e PI 3-Kinase está associada à inibição dessas enzimas diminuírem a capacidade de hialurona e CD44 a promover um fenótipo maligno de tumor como: proliferação anormal, migração e invasão em linhagem de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (TORRE *et al.*, 2010).

As células de carcinoma epidermóide de esôfago superexpressaram Id-1 e também exibiram um aumento no potencial metastático no ensaio experimental. Utilizando o inibidor da PI 3-Kinase o LY294002 houve uma atenuação do tumor pelos efeitos de Id-1, indicando que tal efeito foi mediado pela via de sinalização PI 3-Kinase/Akt (LI *et al.*, 2009).

Outras informações indicam que células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço exibem ativação persistente da sinalização EGFR/Vav/Rac1 e exibem uma contribuição para invasão tumoral e metástases (PATEL *et al.*, 2007).

Em linhagem de células de carcinoma epidermóide oral, *in vitro*, injetada em camundongos, *in vivo*, a droga Vandetanib[®] parece ser capaz de inibir a proliferação, a fosforilação do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e seus mediadores (Akt e MAPK), de induzir a apoptose, garantir uma sobrevivência

prolongada e uma diminuição do tumor *in vivo*. Estes relatos ressaltam o potencial desta droga como alvo terapêutico (SANO *et al.*, 2010). Previamente, a via de sinalização iniciada pelo EGFR foi envolvida com a via de transdução de sinal das GTPases Rho e com a PI 3-kinase na regulação da diferenciação acinar em linhagem de células de glândulas submandibulares de humanos (HSG) (CREMA *et al.*, 2006).

Em carcinomas, a perda da polaridade celular é uma característica comum. A proteína Cdc42 em cultura, é capaz de regular a manutenção e manter a estabilidade da polaridade (KARLSSON *et al.*, 2009).

A invasão de células tumorais requer uma coordenação entre adesão celular/motilidade e degradação proteolítica da matriz extracelular (NARUMIYA *et al.*, 2009).

A expressão do nível de mRNA, proteína total e atividades de RhoA e Rac1 em linhagem de células de câncer gástrico foi maior que na linhagem de células epiteliais GES-1. Esses achados indicam que RhoA e Rac1 exercem importante papel na carcinogênese e progressão do carcinoma gástrico (PAN *et al.*, 2004).

Os processos de migração e proliferação celular são regulados por GTPases Rho em outros tipos celulares, estimulados pela MEC e fatores de crescimento (SANTOS *et al.*, 1997; NOBES e HALL, 1999; ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002; AZNAR *et al.*, 2004). Entre as GTPases Rho, Rac1 tem sido descrita como a chave reguladora para a migração celular (RIDLEY, 2001); entretanto, em certos tipos celulares, RhoA (SANTOS *et al.*, 1997) e RhoC (WANG *et al.*, 2003) também são essenciais para esse processo.

O papel de RhoA tem sido descrito tanto na promoção como na inibição da invasão. Já foi caracterizada uma via de transdução de sinal envolvendo a ativação de RhoA responsável pela inibição da migração celular em glioblastoma (ALCHINKHUU *et al.*, 2008). RhoA já foi envolvida na promoção da invasão e migração em linhagens TSGH de carcinoma de bexiga (CHANG *et al.* 2010).

Entre as GTPases Rho, Rac1 tem sido descrita como a chave reguladora para a migração celular (RIDLEY, 2006); entretanto, em certos tipos celulares, RhoA (SANTOS *et al.*, 1997) e RhoC (WANG *et al.*, 2003) também são essenciais para esse processo.

Em células migratórias, Rac1 gera uma força protrusiva pela polimerização de actina localizada na região anterior da célula (voltada para a direção de migração), enquanto Cdc42 estimula a formação de filopódios (RIDLEY *et al.*, 1992). A atividade de RhoA tem sido associada com a formação de adesões focais e fibras de estresse, que conferem contratilidade para tracionamento do corpo celular e retração da porção traseira da célula (RIDLEY *et al.*, 1992).

Um par de receptores de quimiocinas CXCL12/CXCR4 é comumente expressa em neoplasias com funções de adesão celular, colonização metastática, angiogênese e proliferação. Todos esses processos requerem a ativação de vias de sinalização que incluem as proteínas G, PI 3-Kinase, Kinases JAK, GTPases Rho, proteínas de adesão focal e associados. Essas vias em uma linhagem de melanoma em resposta à estimulação CXCL12, e descobriram que PI 3-Kinase regula a adesão celular através de diferentes mecanismos envolvidos na invasão celular (MONTERRUBIO *et al.*, 2009).

A sub unidade catalítica do gene PI 3-kinase CA (PI3KCA) codifica a isoforma p110 α de PI 3-Kinase importante em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço pelas alterações na sua atividade no início do processo oncogênico (ROGERS *et al.*, 2005). As mutações em PIK3CA podem indicar alteração em estágios avançados de carcinoma epidermóide oral quando comparado com as características clínicas, funcionando como um oncogene. Porém, mais estudos precisam ser feitos para investigar se a mutação ou amplificação de PI3KCA é essencial para ativação da via de PI 3-Kinase/AKT (KOZAKI *et al.*, 2006).

Em carcinoma epidermóide de colo uterino, foi estudada a via de sinalização da PI 3-Kinase e Akt envolvida com a progressão do câncer. A alta expressão da PI 3-Kinase e Akt mostraram o envolvimento dessas proteínas na proliferação, transformação maligna, invasão e metástase do carcinoma, podendo desempenhar papéis importantes na ocorrência e no desenvolvimento do câncer (YAO *et al.*, 2008).

Devido às limitações da metodologia empregada para estudo da proliferação celular, os resultados obtidos são referentes às células não aderidas. Futuros estudos serão necessários para confirmar o papel funcional das GTPases Rho na regulação da proliferação celular de carcinoma epidermóide oral.

Neste estudo, os resultados mostraram que as GTPases Rho parecem desempenhar um papel importante na diferenciação em células de cultura primária de carcinoma epidermóide oral. A diferenciação em queratinócitos orais é um processo complexo mediado pela interação de célula-MEC e célula-célula que ativa vias de sinalização (NAGARAJAN *et al.*, 2008).

Proteínas Rho parecem ser importantes para as vias de transdução de sinal estimuladas por fatores de crescimento e MEC, durante estágios específicos do desenvolvimento de glândulas submandibulares. Proliferação celular, citodiferenciação e formação luminal, apoptose e migração celular são processos possivelmente regulados por estas proteínas (CREMA *et al.*, 2008). Em linhagem de células HSG, as GTPases Rho exercem um importante papel no processo de diferenciação celular para formação acinar, demonstrado pela utilização do inibidor das GTPases Rho Toxina A de *Clostridium difficile* (CREMA *et al.*, 2006).

Durante citodiferenciação, proteínas Rho são essenciais para a completa diferenciação de ameloblastos e odontoblastos, regulando a expressão de amelogenina e sialofosfoproteína da dentina (DSPP). RhoA e seu efetor ROCK1 contribuem para esse papel (BIZ *et al.*, 2010).

Em síntese, os resultados deste estudo fornecem uma contribuição importante para a compreensão das vias de transdução de sinal reguladoras de processos biológicos envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide oral. As proteínas RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 parecem estar envolvidas na regulação de processos biológicos. Nesse modelo experimental, *in vitro*, as GTPases Rho foram importantes para a regulação das vias de transdução de sinal envolvidas na diferenciação celular de carcinoma epidermóide oral. No entanto, apenas sua efetora PI 3-kinase parece participar da regulação da proliferação celular, enquanto as GTPases Rho e suas efetoras ROCKs parecem não estar envolvidas nesse processo biológico.

7. CONCLUSÃO

As proteínas GTPases Rho exercem um papel funcional importante nas vias de transdução de sinal reguladoras de processos biológicos envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide oral, especialmente na diferenciação celular, *in vitro*.

1. As células de carcinoma epidermóide oral em cultura primária expressam as GTPases RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1.
2. As GTPases Rho e as ROCKs parecem não participar da regulação da proliferação celular, enquanto a PI 3-Kinase parece estar envolvida nesse processo biológico. Possivelmente, as GTPases estão envolvidas na via de sinalização iniciada pelo LPA.
3. As GTPases Rho parecem ser importantes para a regulação das vias de transdução de sinal envolvidas na diferenciação dessas células.

As GTPases Rho participam de vias de transdução de sinal que regulam diversos processos biológicos, como proliferação e diferenciação celular. Em neoplasias, essas proteínas podem exercer um papel essencial nessas vias de sinalização. Este estudo visou avaliar a expressão das GTPases Rho e seu papel funcional na proliferação e diferenciação celular em carcinoma epidermóide oral (CEO), *in vitro*. Foram realizadas culturas primárias de CEO, e avaliadas vias de sinalização por meio dos inibidores: Toxina A *Clostridium difficile*, Y-27632, Wortmannin e LY294002. As células de CEO expressaram RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1. Os resultados com incorporação de BrdU não mostraram diferenças significantes entre o perfil de marcação das células controle e no tratamento com Toxina A, Y-27632 e Wortmannin. Entretanto, apresentaram nas células tratadas com LY294002. Portanto, as GTPases Rho e as ROCKs parecem não participar da regulação da proliferação, enquanto a PI 3-kinase parece estar envolvidas nesse processo biológico. Células de CEO cultivadas em cultura tridimensional de Matrigel[®] apresentaram um citoplasma bem desenvolvido com citoesqueleto proeminente e córtex evidente. No entanto, as células com as GTPases Rho inibidas apresentaram citoplasma reduzido. As células pareceram apresentar dificuldade para se diferenciar, de uma maneira concentração-dependente. Esses resultados sugerem que as GTPases Rho exercem um papel funcional importante nas vias de transdução de sinal reguladoras de processos biológicos envolvidos na patogênese do CEO, especialmente na diferenciação celular.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide oral, GTPases Rho, ROCKs, PI 3-kinase, proliferação celular, diferenciação celular

The Rho GTPases participate in signal transduction pathways that regulate various biological processes, such as cellular proliferation and cytodifferentiation. In cancers, they could play an essential role in these signaling pathways. This study aimed to evaluate the expression of Rho GTPases and their functional role in cell proliferation and differentiation in oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. Primary cultures were performed as CEO, and evaluated the signaling pathways by inhibitors: *Clostridium difficile* Toxin A, Y-27632, Wortmannin and LY294002. The CEO cells expressed RhoA, RhoB, Cdc42 and Rac1. The results with the incorporation of BrdU showed no significant differences between the profile of labeling between control cells and in the treatment with Toxin A and Y-27632 and Wortmannin. But presented in cells treated with LY294002. Therefore, the Rho GTPases and ROCKs appear not to participate in regulation of proliferation, while PI 3-kinase seem to be involved in this biological process. The OSCC cells cultured in three-dimensional Matrigel® had a well developed cytoplasm with a prominent cytoskeleton and cortex evident. However, cells with inhibited Rho GTPases showed reduced cytoplasm. The cells appeared to be difficult to differentiate, in a concentration-dependent manner. These results suggest that Rho GTPases proteins play an important functional role in signal transduction pathways regulating biological processes involved in the pathogenesis of CEO, especially in cytodifferentiation.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Rho GTPases, ROCKs, PI 3-kinase, cellular proliferation, cytodifferentiation

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M. T.; KURIAKOSE, M. A.; SACKS, P.G.; YEE, H.; CHIRIBOGA, L.; BEARER, E. L.; DELACURE, M. D. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. **Laryngoscope**, v.111, p. 1285-9, 2001.
- ADNANE, J.; MURO-CACHO, C.; MATHEWS, L.; SEBTI, S. M.; MUÑOZ-ANTONIA, T. Suppression of RhoB expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. **Clin Cancer Res**, v.7, p. 225-232, 2002.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **The Cell**. 5. Ed. New York: Garland Science, 2008.
- ALCHINKHUU E, SATO K, MAEHAMA T, MOGI C, TOMURA H, ISHIUCHI S, YOSHIMOTO Y, KUROSE H, OKAJIMA F. S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 366, p. 963-968, 2008.
- ANNERTZ, K.; ANDERSON, H.; BIÖRKLUND, A.; MÖLLER, T.; KANTOLA, S.; MORIK, J.; OLSEN J. H.; WENNERBERG, J. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. **Int J Cancer**, v. 101, p. 95-99, 2002.
- ASPENSTROM, P.; FRANSSON, A.; SARAS, J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. **J Biochem**, v. 377, p. 327-337, 2004.
- AZNAR, S.; VALERON-FERNANDES, P.; ESPINA, C.; LASCAL, J.C. Rho GTPases: potencial candidates for anticancer therapy. **Cancer Letter**, v. 206, p. 181-191, 2004.
- BENITAH, S. A.; VALERÓN, P. F.; VAN AELST, L.; MARSHALL, C. J.; LACAL, J. C. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 17, p. 121-132, 2004.
- BISHOP, L. A.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **J Biochem**, v. 348, p. 241-255, 2000.
- BIZ, M.T.; MARQUES, M. R.; CREMA, V. O.; MORISCOT, A. S.; SANTOS, M. F. GTPases RhoA and Rac1 are important for amelogenin and DSPP expression during differentiation of ameloblasts and odontoblasts. **Cell Tissue Res**, v. 340, p. 459-70, 2010.
- BOETTNER, B.; AELST, V.L. The role of Rho GTPases in disease development. **Gene**, v. 286, p. 155-184, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo. Patologia Geral**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BSOUL, S. A.; HUBER, M. A.; TEREZHALMY, G.T. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. **J Contemp Dent Pract**, v. 6, p. 01-16, 2005.

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell**, v. 116, p.167-179, 2004.

CALAUTTI, E.; GROSSI, M.; MAMMUCARI, C.; AOYAMA, Y.; PIRRO, M.; ONO, Y.; LI, J.; DOTTO, G. P. Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. **J. Cell**, v. 156, p. 137–148, 2002.

CHEN, Z.; SUN, J.; PRADINES, A.; FAVRE, G.; ADNANE, J.; SEBTI, S. M. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. **J Biol Chem**, v. 275, p. 17974-17978, 2000.

CHENG, R.; CHENG, L.; SHAO, M.Y.; YANG, H.; WANG, F. M.; HU, T.; ZHOU, X.D. Roles of lysophosphatidic acid and the Rho-associated kinase pathway in the migration of dental pulp cells. **Exp Cell Res**, v.316, p. 1019-1027, 2010.

CHIOU, W. F.; YAU-CHIK, A. S.; PENG, C. H.; CHEN, C. F. CHOU, C. J.; Piperlactam S suppresses macrophage migration by impeding F-actin polymerization and filopodia extension. **Eur J Pharmacol**, v. 458, p. 217-225, 2003.

CIARDELLO, F.; TORTORA, G. A novel approach in the treatment of câncer: targeting the epidermal growth factor receptor. **Clin Cancer Res**, v.7, p. 2958-2970, 2001.

CLEVERLEY, S. C.; COSTELLO, P. S.; HENNING, S. W.; CANTRELL, D. A. Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. **Oncogene**, v. 19, p. 13–20, 2000.

CONCEIÇÃO PEREIRA, M., D. TOSTES OLIVEIRA, G. LANDMAN e L. P. KOWALSKI. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: Prognostic relevance. **Journal Canadian Dental Association**, v. 73, p. 339–344, 2007.

CREMA, V. O.; FOSSATI, A. C.; HAMASSAKI, D. E.; SANTOS, M. F. Distribution of small Rho GTPases in the developing rat submandibular gland. **J Mol Histol**, v.39, p. 519-25, 2008.

CREMA, V.O.; HAMSSAKI, D. E.; SANTOS, M. F. Small Rho GTPases are important for acinus formation in a human salivary gland cell line. **Cell Tissue Res**, v. 325, p. 493-500, 2006.

DANG, D.; SADLER, S.; RAMOS, D. M. Modulation of EGFR by oral squamous cell carcinoma cell lines. **J Calif Dent Assoc**, v. 37, p. 869 – 874, 2010.

- DANGI-GARIMELLA, S.; REDIG, A. J.; SHIELDS, M. A.; SIDDIQUI, M. A.; MUNSHI, H. G. Rho-ROCK-myosin signaling mediates membrane type 1 matrix metalloproteinase-induced cellular aggregation of keratinocytes. **J Biol Chem**, v. 285, p. 28363-72, 2010.
- DOVAS, A.; COUCHMAN, J. R. Rho GDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. **Biochem J**. v. 15, p. 1-9, 2005.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002.
- FARIED, A.; FARIED, L. S.; KIMURA, H.; NAKAJIMA, M.; SOHDA, M.; MIYAZAKI, T.; KATO, H.; USMAN, N.; KUWANO, H. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human esophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. **Eur J Cancer**, v. 42, p. 1455-1465, 2006.
- FARIED, A.; FARIED, L. S.; USMAN, N.; KATO, H.; KUWANO, H. Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 14, p. 3593-3601, 2007.
- FREIER, K.; STICHT, C.; HOFELE, C. Recurrent coamplification of cytoskeleton-associated genes EMS and SHANKS2 with CCND1 in oral squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 45, p. 118-125, 2006.
- FREUDLSPERGER, C.; ROHLEDER, S.E.; REINERT, S.; HOFFMANN, J.; Predictive value of high Ki-67 expression in stage I oral squamous cell carcinoma specimens after primary surgery. **Head & Neck**, 2010.
- FRITZ, G.; BRACHETTI, C.; BAHLMANN, F.; SCHMIDT, M.; KAINA, B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **Br J Cancer**, v. 87, p. 635-644, 2002.
- GARAVELLO, W.; FOSCHI, R.; TALAMINI, R.; LA VECCHIA, C.; ROSSI, M.; DAL MASO, L.; TAVANI, A.; LEVI, F.; BARZAN, L.; RAMAZZOTTI, V.; FRANCESCHI, S.; NEGRI, E. Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. **Int J Cancer**, v. 122, p. 1827-1831, 2008.
- GIVAN, A. L. Flow Cytometry: First Principles, p. 116-118, 1992.
- GÓMEZ DEL PULGAR, T.; BENITAH, S. A.; VALERÓN, P. F.; ESPINA, C.; LACAL, J. C. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. **Bioessays**, v. 27, p. 602-613, 2005.
- GONZÁLES-GARCIA, R.; NAVAL-GÍAS, L.; RODRIGUEZ-CAMPO, F. J. Contralateral lymph neck node metastasis of squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study in 315 patients. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, p. 1390-1398, 2008.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, p. 509-514, 1998.
- HALL, A. The cytoskeleton and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, p. 5-14, 2009.

- HECKMAN, C. A.; DEMUTH, J. G.; DETERS, D.; MALWADE, S. R.; CAYER, M. L.; MONFRIES C.; MAMAIS A. Relationship of p21-activated kinase (PAK) and filopodia to persistence and oncogenic transformation. **J Cell Physiol**, v. 220, p. 576-585, 2009.
- HORIUCHI, A., IMAI, T.; WANG, C.; OHIRA, S.; FENG, Y.; NIKAIDO, T.; KONISHI, I. up-regulation of small GTPases, rhoa and rhoc, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. **Lab. Invest**, v 83, p. 861–870, 2003.
- JIANG, J.; SUN, J.; CHENG, J.Y.; DJEU, S.; WEI, S. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. **Mol. Cell. Biol**, v. 24, p. 5565– 5576, 2004.
- JIANG, L.; LIU, X.; KOLOKYTHAS, A.; YU, J.; WANG, A.; HEIDBREDER, C. E.; SHI, F.; ZHOU, X. Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 127, p. 505-512, 2010.
- JOSEPH, K. B. Oral Cancer: Prevention and Detection. **Med Princ Pract**, v.11 suppl 1, p. 32-35, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- KAIBUCHI, K.; KURODA, S.; AMANO, M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem**, v. 68, p. 459-486, 1999.
- KAMAI, T.; YAMANISHI, T.; SHIRATAKI, H.; TAKAGI, K.; ASAMI, H.; ITO, Y.; YOSHIDA, K. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 799-805, 2004.
- KARLSSON, R.; PEDERSEN, E. D.; WANG, Z.; BRAKEBUSCH, C. Rho GTPase function in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, p. 91-98, 2009.
- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KAUGARS, G. E.; SILVERMAN, S.; RAY, A. K.; PAGE, D. G.; ABBEY, L. M.; BURNS, J. C.; SVIRSKY, J. A. The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancers: is there a role for it in education and private practice? **J Cancer Edu**, v. 13, p. 85-89, 1998.
- KLEER, C. G.; TEKNOS, T. N.; ISLAM, M.; MARCUS, B.; LEE, J. S.; PAN, Q.; MERAJVER, S. D. 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, p. 4485–4490, 2006.

- KLEIN, E. A.; YANG, C.; KAZANIETZ, M. G.; ASSOIAN, R. K. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. **Cell Cycle**, v. 26, p. 1115-1121, 2007.
- KNOWLES, M. A.; AVEYARD, J. S.; TAYLOR, C. F.; HARNDEN, P.; BASS, S. Mutation analysis of the 8p candidate tumour suppressor genes DBC2 (RHOBTB2) and LZTS1 in bladder cancer. **Cancer Lett**, v. 225, p. 121-130, 2005.
- KONDO, T.; SENTANI, K.; OUE, N.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YASUI, W. Expression of RhoC is associated with metastasis of gastric carcinomas. **Pathobiology**, v. 71, p. 19–25, 2004.
- KOZAKI, K.; IMOTO, I.; PIMKHAOKHAM, A.; HASEGAWA, S.; TSUDA, H.; OMURA, K.; INAZAWA, J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci**, v.97, p.1351-1358, 2006.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- KUROKAWA, H.; YAMASHITA, Y.; TAKEDA, S, et al. Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. **Head Neck**, v. 24, p. 731- 736, 2002.
- LAI, S.Y.; ZIOBER, A. F.; LEE, M. N.; COHEN, N. A.; FALLS, E. M.; ZIOBER, B. L. Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 44, p. 683-688, 2008.
- LANE, J.; MARTIN, T. A.; MANSEL, R. E.; JIANG, W.G. The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. **Int Semin Surg Oncol**, v. 16, p. 05-23, 2008.
- LERM, M.; SCHIMIDT, G.; AKTORIES, K. Bacterial protein toxins targeting Rho GTPases. **FEMS Microbiol Lett**, v. 188, p. 1-6, 2000.
- LI, B.; TSAO, S. W.; LI, Y. Y.; WANG, X.; LING, M. T.; WONG, Y. C.; HE, Q.Y.; CHEUNG, AL. Id-1 promotes tumorigenicity and metastasis of human esophageal cancer cells through activation of PI3K/AKT signaling pathway. **Int J Cancer**, v.125, p. 2576-85, 2009.
- LIN, M.; SMITH, L. T.; SMIRAGLIA, D. J, et al. DNA copy number gains in head an neck squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 25, p. 1424-1433, 2006.
- LIU, A. X.; RANE, N.; LIU, J. P.; PRENDERGAST, G. C. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. **Mol Cell Biol**, v. 20, p. 906-912, 2001.
- LIU, N.; ZHANG, G.; BI, F.; PAN, Y.; XUE, Y.; SHI, Y.; YAO, L.; ZHAO, L.; ZHENG, L.; FAN, D. RhoC is essential for the metastasis of gastric cancer. **J. Mol. Med**, v. 85, p. 1149–1156, 2007.

- LIU, S.Y.; YEN, C.Y.; YANG, S. C.; CHIANG, W. F.; CHANG, K.W. Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, p. 702- 707, 2004.
- LOCK, F. E.; HOTCHIN, N. A. Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of keratinocyte differentiation. **PLoS One**, v. 4, p. e8190, 2009.
- LUNG, T.; TASCAU, O. C.; ALMASAN, H. A.; MURESAN, O. Head an neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival – Part 2: decade's results 1993 – 2002. **Journal of Cranio – Maxilofacial Surgery**, v. 35, p. 126-131, 2007.
- MADDALA, R.; REDDY, V. N.; EPSTEIN, D. L.; RAO, V. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. **Mol Vis**, v.9, p. 329-336, 2003.
- MALUMBRES, M. Cyclins and related kinases in cancer cells. **J. Buon**, suppl 1, p. 45-52, 2007.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKS and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p.153-166, 2009.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem. Sci**, v. 30, p. 630-641, 2005.
- MALUMBRES, M.; SOTILLO, R.; SANTAMARIA, D.; GALÁN, J.; CEREZO, A.; ORTEGA, S.; DUBUS, P.; BARBACID, M. Mammalian cells cycle without the cyclin-dependent kinases cdk4 and cdk6. **Cell**, v. 118, p. 493-504, 2004.
- MAO, L.; HONG, W. K.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A. Focus on Head and neck cancer. **Cancer Cell**, v. 5, p. 311–316, 2004.
- MASSAGUE, J. G1 cell cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, p. 298-306, 2004.
- MAZIERES, J.; ANTONIA, T.; DASTE, G.; MURO-CACHO, C.; BERCHERY, D.; TILLEMENT, V.; PRADINES, A.; SEBTI, S.; FAVRE, G. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 2742-2750, 2004.
- METTOUCHI, A.; KLEIN, S.; GUO, W.; LOPEZ-LAGO, M.; LEMICHEZ, E.; WESTWICK, J. K.; GIANCOTTI, F. G. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G (1) phase of the cell cycle. **Mom Cell**, v. 8, p. 115-127, 2001.
- MOLINOLO, A. A.; P. AMORNPHIMOLTHAM, C. H. SQUARIZE, R. M. ASTILHO, V. PATEL e J. S. GUTKIND. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncology**, 2008.
- MONTERRUBIO, M.; MELLADO, M.; CARRERA, A. C.; RODRIGUEZ-FRADE, J. M. PI3K Activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion.**J. Biochemical an Biophysical Research Communication**, v.388, p. 199-204, 2009.

- NAGARAJAN, P.; ROMANO, R. A.; SINHA, S. Transcriptional Control of the Differentiation Program of Interfollicular Epidermal Keratinocytes. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr**, v. 18, p. 57–79, 2008.
- NARUMIYA, S.; TANJI, M.; ISHIZAKI, T. Rho signaling ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, p. 65-76, 2009.
- NATALE, D. R.; WATSON, A. J. Rac-1 and IQGAP are potential regulators of E-cadherin-catenin interactions during murine preimplantation development. **Mech Dev**, 119 suppl 1: S21- 26, 2002.
- NEVILLE, W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia Oral Maxilofacial**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. **Cell**, v.81, p. 53-62, 1995.
- OLSON, M. F.; ASHWORTH, A.; HALL, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. **Science**, v. 269, p. 1270-1272, 1995.
- ORDÓÑEZ-MORÁN, P.; LARRIBA, M. J.; PÁLMER, H. G.; VALERO, R. A.; BARBÁCHANO, A.; DUÑACH, M.; DE HERREROS, A. G.; VILLALOBOS, C.; BERCIANO, M. T.; LAFARGA, M.; MUÑOZ, A. RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. **J Cell Biol**, v. 183, p. 697-710, 2008.
- PADRICK, S. B.; CHENG, H. C.; ISMAIL, A. M.; PANCHAL, S. C.; DOOLITTLE, L. K.; KIM, S.; SKEHAN, B.M.; UMETANI, J.; BRAUTIGAM, C. A.; LEONG, J. M.; ROSEN, M. K. Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. **Mol Cell**, v. 32, p.426-438, 2008.
- PADRICK, S. B.; ROSEN, M. K. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. **Annu Rev Biochem**, v. 79, p. 707-735, 2010.
- PAN, Q.; BAO, L. W.; TEKNOS, T. N.; MERAJVER, S. D. Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 19, p. 379-384, 2006.
- PAN, Y.; BI, F.; LIU, N.; XUE, Y.; YAO, X.; ZHENG, Y.; FAN, D. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315, p. 686-691, 2004.
- PATEL, V.; ROSENFELDT, H. M.; LYONS, R.; SERVITJA, J. M.; BUSTELO, X. R.; SIROFF, M.; GUTKIND, J. S. Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1145-1152, 2007.
- POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W.C. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- PRENDERGAST, G. C. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. **Nat. Rev. Cancer**, v.1, p.162–168, 2001.

- REIBEL, J. Prognosis of Oral Pré – Malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological and Molecular Biological Characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology e Medicine**, v. 14, p. 47, 2003.
- RIDLEY, A. J.; PATERSON, H. F.; JOHNSTON, C. L.; DIEKMANN, D.; HALL A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell**, v. 70, p. 401-410, 1992.
- RIDLEY, J. A. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. **Trends in Cell Biology**, v. 16, p. 522-529, 2006.
- ROGERS, S. J.; BOX, C.; HARRINGTON, K. J.; NUTTING, C.; RHYS-EVANS, P.; ECCLES, S. A. The phosphoinositide 3-kinase signalling pathway as a therapeutic target in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Expert Opin Ther Targets**, v. 9, p. 769- 790, 2005.
- SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. RHO-GTPases and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 133-142, 2002.
- SANNOMIYA, E. K. S. Diferentes métodos de tratamento radioterápico em tumores da cavidade bucal e suas complicações. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.57, p. 336-338, 2000.
- SANO, D. FOOSHEE, D. R. ZHAO, M. ANDREWS, G. A. FREDERICK, M. J. GALER, C. MILAS, Z. L. MORROW, P. K. H. MYERS, J. N. Targeted molecular therapy of head and neck squamous cell carcinoma with the tyrosine kinase inhibitor vandetanib in a mouse model. **Head & Neck**, 2010.
- SANTOS, M. F.; MCCORMACK, S. A.; GUO, Z.; OKOLICANY, J.; JOHNSON, L. R.; TIGYI, G. Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. **J Clin Invest**, v. 100, p. 216-225, 1997.
- SCHNELZER, A.; PRECHTEL, D.; KNAUS, U.; DEHNE, K.; GERHARD, M.; GRAEFF, H.; HARBECK, N.; SCHMITT, M.; LENGYEL, E. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. **Oncogene**, v. 26, p. 3013-3020, 2000.
- SHIKADA, Y.; YOSHINO, I.; OKAMOTO, T.; FUKUYAMA, S.; KAMEYAMA, T.; MAEHARA, Y. Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 5282–5286, 2003.
- SILVERMAN, S. O. L. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers The outcomes, the trends, the challenge. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, p.7–11, 2001.
- SQUIER, C. A.; KREMER, M. J. Biology of oral mucosa and esophagus. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 29, p. 07-15, 2001.
- STORTELEERS, C.; KERKHOVEN, R.; MOOLENAAR, WH. Multiple actions of lysophosphatidic acid on fibroblasts revealed by transcriptional profiling. **BMC Genomics**, v. 9, p. 387-407, 2008.
- SUWA, H.; OHSHIO, G.; IMAMURA, T.; WATANABE, G.; ARII, S.; IMAMURA, M.; NARUMIYA, S.; HIAI, H.; FUKUMOTO, M. Overexpression of the RhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. **Br. J. Cancer**, v. 77, p. 147–152, 1998.

- SZCZEPANOWSKA, J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. **Acta Biochim Pol**, v. 56, p. 225-234, 2009.
- TAKEUCHI, K.; FUMIAKI, I. EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. **The FEBS Journal**, v. 277, p.316-326, 2009.
- TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- TORRE, C.; WANG, S. J.; XIA, W.; BOURGUIGNON, L.Y. Reduction of hyaluronan-CD44-mediated growth, migration, and cisplatin resistance in head and neck cancer due to inhibition of Rho kinase and PI-3 kinase signaling. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 136, p.493-501, 2010.
- VAN LEEUWEN, F. N.; GIEPMANS, B. N.; VAN MEETEREN, L. A.; MOOLENAAR, W. H. Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 1209-1212, 2003.
- VEGA, M. F.; RIDLEY, J. A. Rho GTPases in cancer cell biology. **Febbs Letters**, v. 582, p.2093-2101, 2008.
- VIDAL, A.; MILLARD, S. S.; MILLER, J. P.; KOFF, A. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. **J Biol Chem**, v. 277, p. 433-440, 2002.
- VILLALONGA, P.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell cycle control. **Growth Factors**, v. 24, p.59-64, 2006.
- WADLAMUDI, R. K.; KUMAR, R. P21-activated kinases in human cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v.22, p. 385-393, 2003.
- WANG, L.; XUE, L.; YAN, H.; LI, J.; LU, Y. Effects of ROCK inhibitor, Y-27632, on adhesion and mobility in esophageal squamous cell cancer cells. **Mol Biol Rep**, v. 37, p. 1971-1977, 2010.
- WANG, L.; YANG, L.; LUO, Y.; ZHENG, Y. A novel strategy for specifically downregulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. **J Biol Chem**, v. 278, p. 44617-44625, 2003.
- WANG, W.; YANG, L. Y.; HUANG, G. W.; LU, W. Q.; YANG, Z. L.; YANG, J. Q.; LIU, H. L. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in Hepatocellular carcinoma with poor prognosis. **Br. J. Cancer**, v. 90, p. 2349–2355, 2004.
- WILSON, G. D.; MCNALLY, N. J.; DISCHE, S.; SAUNDERS, M. I.; DES ROCHERS, C.; LEWIS, A. A.; BENNETT, M. H. Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry. **Br J Cancer**, v. 58, p. 423-431, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization World Cancer Report 2009**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2009. 166 p.

YAMADA S. I.; YANAMOTO, S.; KAWASAKI, G.; MIZUNO, A.; NEMOTO, T. K. Overexpression of Cortactina increases invasion Potencial in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Phatol Oncol Res.Journal**, 2010.

YANAMOTO, S.; KAWASAKI G.; YOSHITOMI, I. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potencial target for tongue cancer gene therapy. **Oral Oncol**, v. 43, p. 869-877, 2007.

YAO, T. T.; DAI, Y. Z.; LI, S. Z. Expression and clinical significance of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in cervical carcinoma. **Ai Zheng**, v. 27, p. 525-530, 2008.

YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J.W. **Wheater Histologia Funcional. Texto e Atlas em Cores**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ZALCMAN, G.; CLOSSON, V.; LINARÈS-CRUZ, G.; LEREBOURS, F.; HONORÉ, N.; TAVITIAN, A.; OLOFSSON, B. Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. **Oncogene**,v. 10, p. 1935-1945, 1995.

ZELLER, K. S.; IDEVALL-HAGREN, O.; STEFANSSON, A.; VELLING, T.; JACKSON, S.P.; DOWNWARD, J.; TENGHOLM, A.; JOHANSSON, S. PI3-kinase p110alpha mediates beta1 integrin-induced Akt activation and membrane protrusion during cell attachment and initial spreading. **Cell Signal**, 2010.

ZHOU, H.; KRAMER, R. H. Integrin engagement differentially modulates epithelial cell motility by RhoA/ROCK and PAK1. **J. Biol Chem**, v. 280, p. 10624-10635, 2004.

ZONDAG, G. C.; EVERS, E. E.; TEN KLOOSTER, J. P.; JANSSEN, L.; VAN DER KAMMEN ,R. A.; COLLARD, J. G. Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Biol**, v. 149, p. 775-782, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)