

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

O tamponamento do cálcio nuclear como adjuvante no tratamento de tumores  
de cabeça & pescoço resistentes à radioterapia

por

Lídia Maria de Andrade

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

TESE DBCM-CPqRR

L. M. ANDRADE

2014

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

O tamponamento do cálcio nuclear como adjuvante no tratamento de tumores  
de cabeça & pescoço resistentes à radioterapia.

por

Lídia Maria de Andrade

Tese apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Doutor(a) em  
Ciências na área de concentração  
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins  
Filho

Co-orientação: Dra Maria de Fátima  
Leite

Dr. Otto C. Boerman

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A553t  
2014

Andrade, Lídia Maria de.

O tamponamento do cálcio nuclear como adjuvante no tratamento de tumores de cabeça & pescoço resistentes à radioterapia / Lídia Maria de Andrade. – Belo Horizonte, 2014.

xix, 115 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 120 – 134

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço/radioterapia  
2. Radiação/classificação 3. Cálcio/uso terapêutico I.  
Título. II. Martins Filho, Olindo Assis (Orientação). III.  
Leite, Maria de Fátima. (Co-orientação). IV. Boerman,  
Otto C. (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.994

**Ata da octogésima defesa de tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Lidia Maria de Andrade sob a orientação do Dr. Olindo Assis Martins Filho e coorientação da Dra. Marla de Fátima Leite.**

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatorze às quatorze horas, realizou-se no Auditório do Centro de Pesquisas René Rachou o exame da octogésima defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese da aluna Lidia Maria de Andrade, intitula-se "O tamponamento do cálcio nuclear como adjuvante no tratamento de tumores de cabeça e pescoço resistentes à radioterapia". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Olindo Assis Martins Filho - CPqRR/FIOCRUZ - (Presidente); Dr<sup>a</sup>. Marina de Moraes Mourão - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. José André Morgado Diaz - INCA (Titular); Dr. Luis Orlando Ladeira - UFPA (Titular). Após arquir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada Aprovada. Uma vez encerrado o exame, eu, Olindo Assis Martins Filho, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e sete de fevereiro de dois mil e quatorze.

Olindo Assis Martins Filho  
Dr. Olindo Assis Martins Filho

Marina de Moraes Mourão  
Dr<sup>a</sup>. Marina de Moraes Mourão

Carlos Eduardo Calzavara Silva  
Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

José André Morgado Diaz  
Dr. José André Morgado Diaz

Luis Orlando Ladeira  
Dr. Luis Orlando Ladeira



***“Não há nada mais importante no mundo do que a convicção de que a vida tem sentido”***

***(Viktor Frankl)***

***Dedico esta tese aos pacientes portadores de câncer; razão de ser desta pesquisa.***

## Agradecimentos

*Agradeço a Deus por não me deixar desistir frente aos desafios e obstáculos. E para não correr o risco de me esquecer de alguém, agradeço, sinceramente, a todos as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a construção desta tese.*

*Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou, ao Instituto de Radioterapia São Francisco, à Universidade Federal de Minas Gerais, e à UMC Radboud pela oportunidade de desenvolver este trabalho, além da prestimosa ajuda das bibliotecas Professor Zigman Brener e biblioteca central.*

*Agradeço às agencias de fomento: FAPEMIG, processo 16762, CNPq, processo 201217/2012-4novo, CAPES e HHIM.*

## Sumário

|   |       |
|---|-------|
| Lista de figuras .....  | xiii  |
| Lista de Abreviaturas.....  | xiv   |
| Resumo.....   | xviii |
| Abstract.....   | xix   |
| 1 Introdução .....  | 20    |
| 2 Objetivos .....   | 23    |
| 2.1 Objetivo geral.....   | 23    |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 23    |
| 2.2.1 Desenvolver um modelo de irradiação <i>in vitro</i> capaz de reproduzir o esquema de fracionamento diário de doses de radiação X sobre células tumorais.....  | 23    |
| 2.2.2 Avaliar o efeito <i>in vitro</i> do fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear, na proliferação de células tumorais do carcinoma de células escamosas humano, seu impacto na progressão do ciclo celular e na fração de sobrevida..... | 23    |
| 2.2.3 Investigar os mecanismos desencadeados pela exposição <i>in vitro</i> ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear em carcinoma de células escamosas humano .....   | 23    |
| 3 Revisão de literatura .....   | 24    |
| 3.1 Epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço.....  | 24    |
| 3.2 Histopatologia dos tumores de cabeça e pescoço.....   | 26    |
| 3.3 Biologia do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....   | 28    |
| 3.4 Alterações genéticas no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....   | 29    |
| 3.4.1 Genes supressores de tumor.....   | 29    |
| 3.4.2 Oncogenes.....  | 31    |
| 3.5 Sinalização celular ligada á tirosina cinases.....  | 31    |
| 3.6 Diagnóstico e tratamento dos tumores de cabeça e pescoço.....   | 33    |

|  |    |
|--|----|
| 3.6.1 Cirurgia. ....   | 34 |
| 3.6.2 Quimioterapia. ....  | 34 |
| 3.6.3 Radioterapia. ....   | 35 |
| 3.6.3.1 Radioterapia no tratamento de tumores de cabeça e pescoço. ....                | 36 |
| 3.6.4 Terapia fotodinâmica. ....   | 37 |
| 3.7 Interações das radiações ionizantes com a matéria. ....                            | 38 |
| 3.7.1 Efeito biológico das radiações ionizantes. ....                                  | 39 |
| 3.8 Aspectos gerais da sinalização intracelular de Cálcio ( $Ca^{2+}$ ). ....          | 40 |
| 3.8.1 Princípios da Sinalização intracelular de Cálcio ( $Ca^{2+}$ ). ....             | 40 |
| 3.8.2 Importância da sinalização de $Ca^{2+}$ na célula tumoral. ....                  | 41 |
| 3.8.3 O papel do $Ca^{2+}$ nuclear na célula tumoral. ....                             | 42 |
| 4 Materiais e Métodos. ....  | 43 |
| 4.1 Plataforma de sustentação dos frascos de cultivo celular. ....                     | 43 |
| 4.2 Planejamento de irradiação das células A431. ....                                  | 43 |
| 4.3 Prova de conceito do planejamento de irradiação das células A431. ....             | 44 |
| 4.4 Construção adenoviral InsP <sub>3</sub> -Buffer-NLS. ....                          | 44 |
| 4.5-Protocolo de irradiação. ....  | 45 |
| 4.6-Ensaio de proliferação celular. ....   | 46 |
| 4.7-Ensaio de avaliação de ciclo celular pela técnica de citometria de fluxo.<br>..... | 46 |
| 4.8 Ensaio de fração de sobrevivência. ....  | 47 |
| 4.9 PCR quantitativo em tempo real. ....   | 47 |
| 4.10 PCR quantitativo para avaliação das lesões ao DNA nuclear e<br>mitocondrial. .... | 48 |
| 4.11 Ensaio de atividade mitocondrial pelo MTT. ....                                   | 48 |
| 4.12 Western blotting. ....  | 49 |
| 4.13 Imunocitoquímica. ....  | 50 |
| 4.14 Cultivo de células em três dimensões. ....  | 50 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.15    | Redução da migração celular por bloqueadores de integrinas. ....  | 50 |
| 4.16    | Avaliação da velocidade de movimento e medida do índice de alongamento celular.....   | 51 |
| 4.17    | Ensaio de imunorreatividade para ligação do anticorpo monoclonal Cetuximab aos receptores de EGF em hepatocarcinoma humano da linhagem HepG2. ....  | 51 |
| 4.18    | Treinamento com manejo de animais geneticamente modificados, xenografia, aquisição de imagens e radioterapia em roedores. ....  | 52 |
| 5       | Resultados. ....  | 55 |
| 5.1     | Desenvolvimento de um modelo de irradiação <i>in vitro</i> capaz de reproduzir o esquema de fracionamento diário de doses de radiação X sobre células tumorais .....  | 55 |
| 5.1.0   | O modelo de irradiação <i>in vitro</i> reproduz o esquema de fracionamento diário de doses. ....  | 55 |
| 5.1.1   | Plataforma de posicionamento das culturas celulares.....  | 55 |
| 5.1.2   | Planejamento radioterapêutico das culturas celulares.....   | 56 |
| 5.1.3   | Prova de conceito do planejamento radioterapêutico das culturas celulares. ....   | 58 |
| 5.2     | Avaliar o efeito <i>in vitro</i> do fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear, na proliferação de células tumorais do carcinoma de células escamosas humano, seu impacto na progressão do ciclo celular e na fração de sobrevivência ..... | 59 |
| 5.2.0   | O esquema de irradiação determina a resposta celular.....   | 59 |
| 5.2.1   | Células tumorais são mais sensíveis ao tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear. ....  | 60 |
| 5.2.1.1 | Eficiência de infecção das culturas celulares.....  | 60 |
| 5.2.1.2 | Curva de proliferação celular. ....   | 62 |
| 5.2.2   | Cinética do ciclo celular após associação entre tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear e radiação X.....   | 63 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3 Investigar os mecanismos desencadeados pela exposição <i>in vitro</i> ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear, em carcinoma de células escamosas humanas .....  | 64 |
| 5.3.0 O tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear associado com radiação X não promoveu aumento de danos ao DNA das células A431. ....  | 64 |
| 5.3.1 Associação entre o tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear e a radiação X previne a superexpressão de ADAM-17 e EGFR, induzidas por radiação ionizante. ....  | 65 |
| 5.3.1.1 A associação entre o tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear e a radiação X previne a superexpressão de ADAM-17.....  | 66 |
| 5.3.1.2 A associação entre o tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear e a radiação X previne a superexpressão de EGFR. ....  | 67 |
| 5.3.2.2 O tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear reduziu a ativação de EGFR. ..  | 68 |
| 5.3.2.3 EGFR foi translocado da membrana plasmática para o interior das células após irradiação e teve sua expressão reduzida após tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear.....   | 69 |
| 5.3.3 Associação entre o tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear e a radiação X reduziu a fração de sobrevivência das células A431, radiosensibilizando o carcinoma de células escamosas. ....  | 71 |
| 5.4 Estabelecer novas abordagens metodológicas para avaliar os mecanismos desencadeados pela exposição <i>in vitro</i> ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca <sup>2+</sup> nuclear, em carcinoma de células escamosas humanas ..... | 73 |
| 5.4.0 Bloqueadores das subunidades $\beta_1$ e $\alpha\beta_3$ de integrinas alteram a morfologia e a dinâmica das células de melanoma humano da linhagem MV3wt.....   | 73 |
| 5.4.1 O bloqueio das integrinas altera a morfologia das células MV3wt....  | 73 |
| 5.4.2 O bloqueio das integrinas evita que o alongamento das células MV3wt ocorra.....  | 74 |
| 5.4.3 O bloqueio das integrinas altera a dinâmica e a orientação espacial das células MV3wt.....   | 75 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.4.4 As células HepG2 apresentam alta ligação do anticorpo monoclonal cetuximab aos receptores de EGF. .... | 78  |
| 6 Discussão.....   | 80  |
| 6.1 O que vem pela frente: tendências e desafios para o melhoramento das terapias contra o câncer.....       | 87  |
| 7 Conclusão .....  | 91  |
| 8-Anexos.....  | 92  |
| 1 Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus.....              | 92  |
| 2 Nucleoplasmic calcium buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to anticancer therapy. ....       | 92  |
| 3 Aprovação do COEPE para uso de células gengivais humanas.....  | 108 |
| 4 Ofício de doação das células gengivais humanas para esta pesquisa. ...                                     | 109 |
| 5 Relação de artigos publicados em co-autoria envolvendo sinalização de $Ca^{2+}$ .....                      | 110 |
| 6 Repercussão social desta pesquisa.....   | 111 |
| 9 Referências Bibliográficas.....  | 120 |

## Lista de figuras

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1</b> Ativação da sinalização nas vias do EGFR.....   | 33  |
| <b>Figura 2</b> Desenho esquemático do sistema de irradiação <i>in vitro</i> ..   | 56  |
| <b>Figura 3</b> Planejamento de irradiação para as células A431. ....   | 577 |
| <b>Figura 4</b> Medidas dosimétricas do sistema de irradiação <i>in vitro</i> . ....  | 58  |
| <b>Figura 5</b> Perfil do ciclo celular em células A431 irradiadas em diferentes esquemas de irradiação. ....   | 60  |
| <b>Figura 6</b> Eficiência de infecção das células A431 e eficiência de redução do sinal de $Ca^{2+}$ no núcleo das células pela ação tamponadora da construção. ..         | 61  |
| <b>Figura 7</b> Proliferação celular após tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear. ....   | 62  |
| <b>Figura 8</b> Cinética do ciclo celular em células A431 tratadas com a associação entre o tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear e radiação X. ....                            | 64  |
| <b>Figura 9</b> Quantificação das lesões ao DNA nuclear e mitocondrial de células A431 tratadas com a associação entre tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear e radiação X. .... | 65  |
| <b>Figura 10</b> Níveis de expressão da metaloproteinase ADAM-17. ....  | 66  |
| <b>Figura 11</b> Níveis de expressão de EGFR. ....  | 68  |
| <b>Figura 12</b> Níveis de ativação de EGFR após tamponamento de $Ca^{2+}$ nuclear. ....  | 69  |
| <b>Figura 13</b> Translocação do receptor de EGF. ....  | 70  |
| <b>Figura 14</b> Fração de sobrevivência das células A431 após associação entre o tamponamento de $Ca^{2+}_n$ e a radiação X. ....  | 71  |
| <b>Figura 15</b> Desenho esquemático dos mecanismos envolvidos na associação entre o tamponamento de $Ca^{2+}_n$ e a radiação X em células A431..                           | 72  |
| <b>Figura 16</b> Alterações morfológicas oriundas do bloqueio das subunidades de integrinas. ....   | 74  |
| <b>Figura 17</b> Índice de alongamento das células MV3wt. ....  | 75  |
| <b>Figura 18</b> Dinâmica celular dependente de integrinas. ....  | 76  |
| <b>Figura 19</b> Desenho esquemático dos efeitos do bloqueio das subunidades $\beta_1$ e $\alpha\beta_3$ de integrinas nas células MV3wt. ....                              | 77  |
| <b>Figura 20</b> Ligação de cetuximab radiomarcado com $In^{111}$ . ....  | 79  |

## Lista de Abreviaturas

**ADAM:** A Desintegrin And Metalloproteinase.

**ATM:** (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*), ataxia teleangiectasia mutada.

**ATP:** Adenosina Trifosfato.

**AU:** (*Arbitrary unit*), unidade arbitrária.

**BSA:** (*Bovine Serum Albumin*), soro de albumina bovina.

**Ca<sup>2+</sup>:** íon cálcio.

**Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>:** cálcio nuclear.

**Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR<sub>Cd10Gy</sub>:** (*nuclear calcium buffering plus X-rays cumulative dose at 10Gy*), tamponamento de cálcio nuclear mais raios X com dose acumulada em 10Gy.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>n</sub>:** concentração nuclear de cálcio.

**CaM:** Cálcio Calmodulina

**COX-2:** cicloxigenase 2.

**cpm:** contagens por minuto.

**cRGD:** (*c Arginine-Glycine-Aspartic acid peptide*); Peptídeo cArginina-Glicina-Aspartico ácido.

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

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

**DNA:** (*deoxyribonucleic acid*), ácido desoxirribonucleico.

**EBIR:** Efeito bystander induzido por radiação.

**EBV:** *Epstein-Barr Vírus*

**EGFR:** (*epidermal growth factor receptor*), receptor do fator de crescimento epidérmico.

**ER:** (*Endoplasmic reticulum*), retículo endoplasmático.

**ERK:** (*extracellular-signal-regulated kinases*), cinase regulada por sinal extracelular.

**EUA:** Estados Unidos da América.

**FGF:** (*Fibroblast growth factors*), fatores de crescimento de fibroblasto.

**GAPDH:** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Gy:** Gray, dose absorvida no tecido biológico.

**HIV:** (*Human immunodeficiency virus*), vírus da imunodeficiência humana.

**HNSCC:** (*Head and neck squamous cell carcinoma*), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

**HPV:** (*Human papillomavirus*), vírus do papiloma humano.

**ICQ:** imunocitoquímica.

**IgA:** imunoglobulina A

**IgM:** imunoglobulina M

**IMRT:** (*Intensity Modulated Radiotherapy*), Radioterapia de intensidade modulada.

**In<sup>111</sup>:** elemento radioativo Índio-111.

**In<sup>111</sup>-DOTA-RGD:** Índio-111 ligado ao ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético conjugado com ácido arginina-glicina-aspártico.

**INCa:** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

**IP<sub>3</sub>:** inositol 3,4,5 trifosfato.

**IP<sub>3</sub>R:** receptor do inositol 3,4,5 trifosfato.

**IRF:** (*Immunoreactivity fraction*), fração de imunorreatividade.

**Kd:** knockdown.

**kDa:** kiloDalton.

**kPa:** kiloPascal.

**LKB1:** (*Liver kinase B1*), cinase do fígado B1.

**MAPK:** (*Mitogen activated protein kinase*), proteína cinase mitogênica ativada.

**MEM:** Minimal Essential Medium Eagle.

**MOI:** medida ótima de infecção.

**mRFP:** (*monomeric red fluorescent protein*), proteína monomérica vermelha.

**mTOR:** (*mammalian Target Of Rapamycin*), reguladora de mamífero para rapamicina

**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

**MV:** megavoltagem.

**NCBI:** (*National Center for Biotechnology Information*), centro nacional para informação em biotecnologia.

**NK:** *natural killer cell*.

**NLM:** (*National Library of Medicine*), biblioteca nacional de medicina.

**NLS:** Nuclear localization sequence.

**NR:** (*Nucleoplasmic reticulum*), retículo nucleoplasmático.

**PBS:** (*Phosphate buffer saline*), tampão fosfato salino.

**pC:** piconCoulomb.

**pEGFR:** (*phosphorylated EGFR*), EGFR fosforilado.

**PDGF:** (*Platelet derived growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas.

**PDVF:** polyvinylidene fluoride.

**PET-CT:** (*positron emission tomography coupled to computational tomography*), tomografia por emissão de pósitrons acoplado a tomografia computadorizada.

**PIKK:** (*Phosphatidylinositol-3-OH Kinase-Like Kinase*), fosfatidil inositol cinase like cinase.

**PIP<sub>2</sub>:** (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

**PLC:** (*Phospholipase C*), fosfolipase C.

**PTEN:** (*Phosphatase and TENsin homologue deleted on chromosome 10*), fosfatase homóloga a tensina deletada no cromossomo 10.

**RNA:** (*Ribonucleic acid*), ácido ribonucleico.

**rpm:** rotações por minuto.

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute.

**RTK:** (*Receptor tyrosine kinases*), receptor de tirosina cinase.

**RT-qPCR:** (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), Reação da Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real.

**SPECT:** (*Single Positron Emission Computed Tomography*), tomografia por emissão de único pósitron.

**SUS:** Sistema Único de Saúde.

**TGF- $\alpha$ :** (*Transforming growth factor alfa*), fator de crescimento transformante alfa.

**TGF- $\beta$ RII:** (*Transforming growth factor beta receptor II*), receptor do tipo II para o fator de crescimento transformante beta.

**TRAIL:** (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), fator de necrose tumoral relacionado ao ligante indutor de apoptose.

**TRPC6:** (*Transient receptor potencial subfamily 6*), receptor potencial transiente da subfamília 6.

**UICC:** União Internacional de Combate ao Câncer.

**VEGF:** (*Vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento endotelial vascular.

**XR:** (*X-rays*), raios X.

**XR<sub>Cd10Gy</sub>**: (*X-rays cumulative dose at 10Gy*), dose de raios X acumulada em 10Gy.

**XR<sub>Sd10Gy</sub>**: (*X-rays Single dose at 10Gy*), dose única de raios X em 10Gy. xvi

**WT**: (*Wild type*), tipo selvagem.

## Resumo

A radioterapia é uma modalidade importante para tratar o câncer de Cabeça e Pescoço, no entanto falhas do tratamento já foram observadas e recorrência da doença é comum. Novas abordagens para melhorar os efeitos benéficos de radioterapia têm sido desenvolvidas e terapia gênica surge como uma ferramenta importante para atingir esse objetivo. Apesar de modelos *in vitro* serem úteis para entender os efeitos da radiação em níveis celulares um modelo mais próximo ao esquema de irradiação clínica, que permita reproduzir irradiação diária, é necessário. Sinais de cálcio no núcleo têm demonstrado desempenhar um papel crucial em células de mamíferos por regularem a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, e já foi também demonstrado que o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear prejudica o crescimento das células cancerosas *in vitro*, bem como *in vivo*. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo *in vitro* que simulava radioterapia de cabeça e pescoço de acordo com parâmetros clínicos e investigar o papel do tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear para aumentar o efeito antitumoral de raios-X em carcinoma de células escamosas humano. Para estes fins, células da linhagem celular A431 foram submetidas a dose acumulada de 10Gy de raios-X, em esquema de fracionamento diário de doses, (XRCd10Gy) ou em associação com o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear ( $\text{Ca}^{2+}_n$ ). Análise do ciclo celular, ensaio de proliferação, a quantificação de lesões de DNA nuclear /mitocondrial, expressão de ADAM-17, a expressão de EGFR e fração de sobrevivência foram investigadas. Nosso modelo forneceu irradiações uniformes à monocamada de células, minimizando as incertezas, independente da posição dos frascos dentro de campo de irradiação, Todos os frascos receberam  $100 \pm 2\%$  da dose calculada total. Descobrimos que XRCd10Gy induziu apenas  $4,3 \pm 0,3\%$  de morte celular ( $\text{SubG}_1$ ), indicando radorresistência. Após o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_n$  a proliferação de células A431 diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) em comparação com o controle. Análise do ciclo celular mostraram que a associação do tamponamento  $\text{Ca}^{2+}_n$  com XRCd10Gy aumentou a percentagem de células A431 em  $\text{G}_2/\text{M}$  ( $35,7 \pm 2,5 \%$ ), sem danos de DNA nucleares/mitocondrial aparentes. No entanto, o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_n$  preveniu significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento da expressão de ADAM -17 e a ativação do EGFR, induzidas por irradiação. Além disso, a terapia de associação diminuiu significativamente a formação de colônias das células A431 ( $91 \pm 0,4 \%$ ), mesmo com cerca de metade da dose cumulativa. Os efeitos dos bloqueadores de integrina 4B4 e cRGD sobre a migração de células do melanoma humano da linhagem MV3 foram investigados, em cultivo celular 3D, mostrando que além de alterar a morfologia celular, o bloqueio das subunidades de integrina  $\beta_1$  e  $\alpha\beta_3$  reduziram o índice de alongamento celular ( $3.8 \pm 0.6$  AU) quando comparado com o controle não tratado ( $8.5 \pm 1.7$  AU,  $p < 0,001$ ), bem como a velocidade média de migração  $0.1 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{minuto}$  comparado ao controle não tratado  $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{minuto}$  ( $p < 0,001$ ). Juntos, estes resultados contribuem para o desenvolvimento de nova estratégia de radioterapia para o tumor da cabeça e pescoço, com a combinação da terapia gênica e radiação ionizante, permitindo reduzir a exposição celular aos raios-X.

## Abstract

Radiotherapy is one important modality to treat Head and Neck cancer, however treatment failure has been observed and recurrence disease is common. New approaches to improve beneficial radiotherapy effects have been developed and gene therapy arises as an important tool to achieve this aim. Although *in vitro* models are useful to understand radiation effects at cellular levels one model more close to clinical irradiation schedule that allows reproduce daily irradiation is needed. Calcium signals in the nucleus have been demonstrated to play a crucial role in mammalian cells regulating the expression of genes involved in cell proliferation, and it also was demonstrated that the buffering of nuclear  $Ca^{2+}$  impairs the growth of cancer cells *in vitro* as well as *in vivo*. The aim of this study was to develop an *in vitro* protocol that simulated head and neck radiotherapy according to clinical parameters and investigate the role of nuclear  $Ca^{2+}$  buffering to enhance the antitumor effect of X-rays on Human Squamous Cell Carcinoma. For these purposes A431 cell line was submitted to 10Gy cumulative X-rays therapy alone ( $XR_{Cd10Gy}$ ) or in association with nuclear  $Ca^{2+}$  buffering protocol ( $Ca^{2+}_n$ ). Cell cycle analysis, proliferation assay, quantification of nuclear/mitochondrial DNA lesions, ADAM-17, EGFR expression and survival fraction were investigated. Our model provided uniform irradiations to monolayer cells, minimizing uncertainties since independent of the flasks position inside irradiation field, all flasks received  $100\pm 2\%$  of the total calculated dose. We found that  $XR_{Cd10Gy}$  induced only  $4.3\pm 0.3\%$  of cell death (SubG<sub>1</sub>), indicating radioresistance. Upon  $Ca^{2+}_n$  buffering, A431 cell proliferation decreased significantly ( $p < 0.001$ ) as compared to control. Cell cycle analysis showed that association of  $Ca^{2+}_n$  buffering with  $XR_{Cd10Gy}$  increased the percentage of A431 cells at G<sub>2</sub>/M ( $35.7\pm 2.5\%$ ) with no apparent nuclear/mitochondrial DNA damages. Nonetheless,  $Ca^{2+}_n$  buffering significantly ( $p < 0.05$ ) prevented the increase in ADAM-17 expression and EGFR activation induced by irradiation. Furthermore, the association therapy significantly decreases the A431 colony formation ( $91\pm 0.4\%$ ), even using approximately half of the cumulative dose. The effects of Integrins blockage on human melanoma cell MV3 were investigated using 3D cell culture. There were phenotype alterations after blockage of  $\beta_1$  e  $\alpha v\beta_3$  integrins subunits using 4B4 and cRGD even reduction of elongation index ( $3.8 \pm 0.6$  AU) compared to untreated cells ( $8.5 \pm 1.7$  AU,  $p < 0.001$ ) as well as migration average speed was decreased  $0.1 \pm 0.06\mu m/minute$  after integrins blockage compared to untreated cells  $0.5 \pm 0.1\mu m/minute$  ( $p < 0.001$ ). Together, these findings contribute to the development of novel radiotherapy strategy to head and neck tumor, combining gene therapy with ionizing radiation, allowing reducing X-rays irradiation exposure.

## 1 Introdução

Segunda causa de óbitos no país, com tendência de crescimento nos próximos anos, o câncer é uma questão de saúde pública, principalmente ao se levar em consideração seu percentual de prevenção: cerca de um terço dos casos novos de câncer no mundo poderia ser evitado (1). O foco no incentivo a pesquisa oncológica é relevante face às estimativas da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) para um aumento de 50% até 2020 no número de novos casos de câncer e o dobro do número de mortes, tendo o Brasil o maior desafio em termos de sobrevivência em câncer que é em torno de 2 a 4 anos, enquanto nos países desenvolvidos esse índice sobe para 12 a 16 anos (2).

As patologias oncológicas de cabeça e pescoço representam um dos seis tumores malignos mais prevalentes em todo o mundo, com um valor estimado de 900.000 novos casos diagnosticados anualmente em escala mundial (3). Trata-se de uma modalidade de câncer cujo tratamento implica em sequelas e complicações, muitas vezes severas, causando no paciente perda de função e, em alguns casos, mutilações. Em termos de recursos diagnósticos para a detecção de tumores na região da cabeça e do pescoço o Brasil conta com equipamentos modernos, como a tomografia por emissão de pósitrons, acoplado a um tomógrafo computadorizado, o PET-CT, permitindo imagens tanto funcionais, quanto anatômicas de regiões afetadas pelo tumor e sua correta localização, incluindo invasão para outros sítios, encontrados na maioria dos estados brasileiros com exceção de Acre, Amapá, Mato Grosso do Sul, Roraima, Rondônia e Tocantins; cuja relação de serviços esta disponível em: <http://www.crcn.gov.br/siteCRCN/pet/pet.html>. Porém, apesar da oferta deste e de outros recursos diagnósticos, alguns deles cobertos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e do programa estratégia de saúde da família promover visitas periódicas nas residências e abranger grande parte dos municípios brasileiros, os pacientes ainda chegam aos serviços de saúde em estágios avançados da doença. Além disso, falhas no tratamento do câncer de cabeça e pescoço são eventos relativamente frequentes, independentemente do esquema terapêutico aplicado (4).

Todos os esforços cabíveis na busca por alternativas que possam melhorar os resultados das terapias, até então aplicáveis ao tratamento dos

tumores de cabeça e pescoço, implicam não somente em aumento da sobrevida global, mas, sobretudo, em ganho de qualidade de vida pós-tratamento. Estudos *in vitro* são a primeira linha de pesquisa na busca de novas estratégias terapêuticas para aplicações futuras. Até Janeiro de 2014 estavam disponibilizados na página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), da *National Library of Medicine* (NLM), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=head+and+neck+and+in+vitro>, 3.278 artigos publicados envolvendo cultivo celular e tumores de cabeça e pescoço. Estes números evidenciam o crescente interesse em modelos celulares aplicados na pesquisa destes tipos de câncer. O cultivo de células tumorais humanas permite o estudo e a avaliação dos efeitos diretos e indiretos das radiações ionizantes sobre células em ambiente *in vitro*, incluindo o estudo de mecanismos de morte celular (5). Neste estudo foi utilizado como modelo o carcinoma de células escamosas humano, da linhagem A431, sabidamente radorresistente e com superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um dos principais agentes responsáveis pela resistência deste tipo de carcinoma as terapias convencionais para o tratamento do câncer. Além disso, a irradiação destas células promove a superexpressão de metaloproteinase da família A Desintegrin And Metaloproteinase, ADAM-17, que cliva os ligantes de pro-EGFR liberando as frações solúveis para o receptor na membrana plasmática, estimulando maior proliferação das células tumorais. Um modelo de irradiação *in vitro* foi desenvolvido para aproximar as condições experimentais do tratamento preconizado em humanos e em seguida, terapia gênica foi associada a esse modelo de irradiação, usando um adenovírus tipo V como carreador de uma proteína tamponadora de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), cujo fragmento da isoforma I, do receptor humano de inositol 3,4,5 trifosfato ( $IP_3R$ ), impede que o  $IP_3$  formado se ligue a seu receptor endógeno, tamponando cálcio dentro do núcleo das células tumorais, promovendo efeito sinérgico aos já conhecidos efeitos terapêuticos da radiação X.

Este estudo propõe investigar as bases celulares e moleculares envolvidas no tamponamento de cálcio nuclear, aplicado como adjuvante no tratamento de tumores de cabeça e pescoço resistentes à radioterapia. A investigação dos efeitos decorrentes da associação entre radiação X e o tamponamento do  $Ca^{2+}$  no núcleo de carcinoma de células escamosas, de

acordo com o protocolo clínico da radioterapia, surge como uma nova perspectiva para o melhoramento do tratamento de tumores de cabeça e pescoço radorresistentes.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o impacto do tamponamento do cálcio nuclear como adjuvante no tratamento de tumores de cabeça & pescoço resistentes à radioterapia.

### **2.2 Objetivos específicos**

Desenvolver um modelo de irradiação in vitro capaz de reproduzir o esquema de fracionamento diário de doses de radiação X sobre células tumorais;

Avaliar o efeito in vitro do fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, na proliferação de células tumorais do carcinoma de células escamosas humano, seu impacto na progressão do ciclo celular e na fração de sobrevivência;

Investigar os mecanismos desencadeados pela exposição in vitro ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear em carcinoma de células escamosas humano;

### **3 Revisão de literatura**

#### **3.1 Epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço**

Câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo, definido por base anatômico-topográfica, para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade oral, faringe e laringe (6). Em 2008, no Brasil, morreram 6.214 pessoas com câncer bucal, sendo 4.898 homens e 1.316 mulheres (7), enquanto o índice de mortalidade por câncer oral nas capitais brasileiras, agrupadas por regiões geográficas, apresentou valores mais altos para as regiões Sul e Sudeste (8). O câncer de boca atinge mais de 11.000 brasileiros por ano (9) e segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCa) estimam-se para o ano de 2012, 9.990 casos novos de câncer da cavidade oral e 6.110 casos novos de câncer da laringe (10).

Vários estudos mostram que independente da faixa etária estudada, esses cânceres atingem mais pessoas do gênero masculino (10-12) e que a idade média dos pacientes portadores da neoplasia de boca/faringe gira em torno de 56,5 anos (13), com baixo nível de escolaridade, e que apresentam estágio clínico avançado no momento do diagnóstico (14), desfavorecendo o seu prognóstico (15), e cuja taxa de sobrevida em cinco anos é de 50% ou menos (16). Mais da metade dos pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço apresenta recidivas locais ou para linfonodos cervicais. Estatisticamente, 80% dos pacientes que apresentam recidivas estas ocorrem nos primeiros dois anos após o tratamento e a ocorrência do segundo tumor primário pode acontecer em até 30% dos pacientes em controle da doença (17).

Os principais fatores de risco para o câncer da cavidade oral são o tabagismo, o etilismo e as infecções pelo HPV, além de precárias condições bucais (12). Estudos apontam que o hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas estabelece um sinergismo entre esses dois fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Já é bem estabelecido que a frequência e a duração do consumo de álcool e cigarros aumentam o risco de aquisição de câncer bucal, faríngeo e laríngeo (18;19). Fumantes inveterados apresentam 25 vezes risco aumentado de

desenvolver tumores de cabeça e pescoço quando comparados a não fumantes (20), sendo o hábito de fumar responsável por cerca de 40% dos óbitos por essa neoplasia (10;15).

Os chamados fumantes passivos também apresentam risco para estes tipos de câncer (12) e estudos mostram que a exposição prolongada desse grupo de pacientes ao cigarro foi correlacionada com câncer de laringe e faringe (21;22). O tabaco contém mais de 50 carcinógenos conhecidos, sendo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as nitrosaminas, os mais fortemente envolvidos em cânceres da cavidade oral, e que são dissolvidos na saliva, especialmente pelo hábito de mascar fumo (21;23), induzindo mutações no gene supressor de tumor *TP53* (24). Em relação ao álcool, os possíveis mecanismos pelos quais seu consumo pode aumentar o risco de câncer incluem a carcinogenicidade do acetaldeído, um metabólito do álcool, que forma adutos de proteínas, resultando na produção de anticorpos, inativação de enzimas e prejuízos no sistema de reparo do DNA (25). Já o etilismo pesado corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos por tumores de cabeça e pescoço (10).

As viroses relacionadas com tumores de cabeça e pescoço são o Epstein-Barr Vírus (EBV), que está mais associado com carcinomas de nasofaringe, e cujo DNA foi encontrado em amostras de linfonodos cervicais metastizados em que o tumor primário era desconhecido (12) e o HPV do tipo 16, cujas oncoproteínas codificadas pelos genes *E6* e *E7* degradam o gene *TP53* e o gene supressor tumoral retinoblastoma (*pRb*), respectivamente (12;18;26). Pacientes HIV positivos apresentam alto risco de desenvolver sarcoma de Kaposi, principalmente no palato, e, também, linfoma não Hodgkin (27).

Estudos mostram que más condições de higiene oral, dentição precária apresentando extensas lesões e sítios retentivos, próteses mal adaptadas e o uso excessivo de enxaguantes bucais, constituem fatores de risco para câncer da cavidade oral (18;28). Outros fatores de risco foram relacionados com tumores de cabeça e pescoço como dieta rica em gordura animal, extremos de temperatura e exposição excessiva ao sol (2;12;18). Além disso, inflamação crônica da laringe causada pelo refluxo gastroesofágico e a exposição a produtos químicos, pó de madeira, fuligem ou poeira de carvão, solventes

orgânicos e vapores da tinta, estão relacionados com o risco de desenvolver câncer sinusal e laríngeo (10;29).

O câncer da boca é um problema relevante de saúde pública em que, apesar do avanço científico sobre a doença, tal conhecimento não consegue ser traduzido em ações que impactem positivamente os indicadores de incidência e morbimortalidade (30). A boca é um local de fácil acesso ao exame físico, entretanto, oportunidades são perdidas devido ao não conhecimento da sintomatologia por parte do paciente e à inabilidade de alguns médicos e dentistas no reconhecimento dos sinais relacionados à detecção dos tumores da cavidade oral e da laringe (13). Além disso, é de extrema importância conhecer o perfil epidemiológico dos tumores de cabeça e pescoço para que se possa direcionar a elaboração de medidas destinadas à prevenção e ao controle destes tumores, através de ações de promoção, prevenção, educação e reabilitação dos pacientes (14;15). A valorização e implementação de políticas públicas que garantam acessibilidade aos serviços de saúde, que permitam a identificação precoce de lesões, bem como a educação em saúde, que combata a exposição precoce aos fatores de risco clássicos e em especial o tabagismo, requerem maior atenção por parte dos programas de vigilância em saúde (16).

### **3.2 Histopatologia dos tumores de cabeça e pescoço**

A maioria dos cânceres da cavidade oral e faringe são de origem epitelial e, como muitos outros cancros epiteliais, suas taxas de incidência e de mortalidade tendem a aumentar progressivamente com a idade (11). No entanto, a detecção visual de lesões orais pré-malignas é problemática, especialmente porque estas lesões, em estágio inicial, não demonstram nenhuma das características clínicas observadas no câncer oral avançado, como ulcerações crônicas, tumefação, dor ou linfadenopatia cervical (31). As lesões pré-malignas mais comuns são a leucoplasia, uma placa branca encontrada na mucosa oral, a eritroplasia, uma mancha vermelha, também encontrada na mucosa oral e que apresenta um potencial de malignização variando entre 14% e 50% e a queilite actínica, de origem inflamatória e que acomete lábio inferior (32).

Os tumores do trato aerodigestivo superior, que englobam os cânceres de cabeça e pescoço, surgem em diferentes sítios como cavidade oral, espaços cervicais, as neoplasias da glândula tireoide e os tumores odontogênicos malignos; compostos pelas seguintes neoplasias: ameloblastoma maligno, carcinoma ameloblástico, carcinoma odontogênico de células claras e o fibrossarcoma ameloblástico, figurando entre os principais tumores de origem dental (12;31).

Dentre os tumores das glândulas salivares os mais prevalentes são o carcinoma mucoepidermóide, o carcinoma adenóide cístico, o adenoma expleomórfico e o carcinoma secretório análogo da mama (31;33). Os sarcomas de cabeça e pescoço são mais raros e dentre eles o sarcoma de Ewing dos maxilares, o osteossarcoma, o angiossarcoma e o rabiomiossarcoma, que é mais comum em crianças e adolescentes, são os mais frequentes (12;34). O melanoma da mucosa bucal é tumor maligno primário, constituído por melanócitos atípicos e que, posteriormente, invade a maxila e/ou mandíbula (34). Também são encontrados o mieloma múltiplo dos maxilares, caracterizado por proliferação de células morfológicamente semelhantes a plasmócitos e o linfoma de Burkitt, constituído por células linforreticulares indiferenciadas (34).

O carcinoma de células escamosas é o mais frequentemente encontrado, aparecendo em 95% dos casos de cânceres do trato aerodigestivo superior (12;35-38). São também conhecidos por carcinoma espinocelular, carcinoma epidermóide e carcinoma escamocelular (39). Os carcinomas de células escamosas vão desde neoplasias queratinizadas, bem diferenciadas, a tumores anaplásicos e algumas vezes sarcomatóides, podendo apresentar crescimento lento ou rápido e tendem a infiltrar localmente antes de metastizar para outros locais, sendo um tumor maligno derivado dos queratinócitos (31;39). Uma variante do carcinoma de células escamosas é o subtipo basalóide, que embora seja raro, apresenta um comportamento muito agressivo e alta mortalidade, com maior tendência para acometer a laringe (40;41).

### **3.3 Biologia do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço**

A susceptibilidade ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) pode resultar de fatores ligados a alterações de reparo do DNA, alterações de expressão de protooncogenes e genes supressores de tumor (42). As células-filhas derivadas de uma progênie tumoral primordial acumulam uma série de alterações genéticas e epigenéticas que levam a alterações na atividade de genes essenciais e que permitem a instalação do fenótipo maligno (43). O surgimento de segundo tumor primário é relativamente frequente, ocorrendo por causa da exposição crônica a carcinogênicos, conhecida como cancerização de campo, um modelo baseado na exposição repetida de um campo aos mesmos fatores de risco, como os carcinógenos presentes no álcool e no tabaco, levando ao desenvolvimento de lesões independentes (12;25;31). O estresse oxidativo está correlacionado com a transformação maligna no câncer oral, embora seu mecanismo ainda não esteja completamente esclarecido, já é sabido que as espécies reativas de oxigênio podem ativar fatores de transcrição resultando na expressão de proteínas que controlam a transformação celular, a proliferação celular, angiogênese e metástase (44).

Algumas alterações imunológicas nestes tumores estão relacionadas a defeitos na atividade de células NK, e níveis aumentados de imunoglobulinas IgA e IgM foram associados com mal prognóstico, doença avançada e recorrência precoce do tumor (12). Alterações severas relacionadas com defeitos em células apresentadoras de antígeno e algumas citocinas estão presentes em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (45) e células reguladoras T (Tregs), cuja expressão intratumoral é mais imunossupressora que a circulante (46), estão envolvidas na imunorregulação da resposta imunológica, contribuem para a progressão de HNSCC, e fuga do sistema imune nestes pacientes (47). O carcinoma de células escamosas apresenta heterogeneidade não somente entre tumores, mas, também, em nível intratumoral, cujas subpopulações de células tronco escamosas estão relacionadas com resistência ao tratamento e com um fenótipo tumoral agressivo (42;48).

### **3.4 Alterações genéticas no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço**

Os genes críticos para o câncer podem ser classificados em dois grupos, tendo como base se o ganho ou a perda de funções contribuem para o desenvolvimento do tumor (49). Os estudos citogenéticos moleculares têm evidenciado várias regiões cromossômicas consistentemente alteradas nesses tumores, envolvendo ganhos em 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q13 e 20q e perdas em 3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 18q, 21q (25). As anormalidades podem acontecer isoladas ou em combinação e já é sabido que perdas no cromossomo 18q estão associadas com mau prognóstico (50) e que alterações na região 9p22.3 são frequentemente encontradas precocemente nestes tumores (51), enquanto a baixa expressão da proteína de reparo MSH2 foi associada com reduzida sobrevida global (52). Além disso, muitas alterações cromossômicas e perdas de heterozigosidades estão bem caracterizadas na biologia destes tumores, assim como mutações somáticas no gene *PTEN* já foram encontradas no carcinoma de células escamosas (12;50). Já a amplificação do gene *TPRC6* está fortemente correlacionada com invasividade destes tumores (53).

Estudos de genotipagem mostram que polimorfismos em ADH1B e HEL308 estão fortemente associados com HNSCC (54). Polimorfismos no promotor do gene *TGF- $\alpha$*  foram relacionados com recorrência em carcinoma de orofaringe (55) e polimorfismos nos alelos T e A de C1772T e G1790A do gene *HF-1 $\alpha$*  estão relacionados com estágios precoces em carcinomas de células escamosas orais (56). Os polimorfismos na região promotora do gene *CYP2E1*, identificados por enzimas de restrição como Pst1 e Rsa1, são correlacionados com aumento da atividade transcricional do gene e consequente suscetibilidade aumentada para várias neoplasias, entre elas câncer de cabeça e pescoço (57).

#### **3.4.1 Genes supressores de tumor**

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que transmitem sinais negativos regulatórios do crescimento celular e quando inativados permitem que as células tumorais escapem de mecanismos que controlam sua proliferação e morte (25;43;58). O gene *Rb* codifica para a proteína Rb que é uma reguladora universal do ciclo celular e normalmente é expressa em

praticamente todas as células, sendo um dos principais interruptores do progresso da divisão celular e sua perda pode possibilitar a entrada das células inapropriadamente em ciclos de divisão sucessivos (49). Na grande maioria das células tumorais que são mutantes no *loci p53* este tem sofrido a perda de heterozigiosidade na qual o alelo tipo selvagem tem sido descartado, produzindo uma célula com dois alelos *p53* mutantes o que elimina sua capacidade de suprimir células tumorais (58).

Mutações no gene *TP53*, principalmente nos éxons 5-8 ou 5-9, têm sido registradas em cerca de 60% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, e podem ser mutações de ponto, deleções ou inserções (25). Estudos mostraram uma correlação entre regulação positiva e negativa de microRNAs específicos e mutações do gene *TP53* em pacientes com maior recorrência da doença e sobrevida reduzida (59), enquanto a substituição de prolina por serina no códon 151 de *TP53* confere ganho de função gerando resistência a morte celular e levando a progressão tumoral (60).

A proteína p16 é codificada pelo gene supressor tumoral *CDKN2A*, localizado em 9p21 e a perda de expressão do gene *P16*, por deleções homozigóticas e eventos epigenéticos como metilação, estão presentes em 52% a 82% das amostras de HNSCC, assim como alterações em p16 (INK4a) parecem ser um evento comum em pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe e laringe e a expressão negativa desta proteína esta relacionada com mau prognóstico (25;61).

Outros genes supressores de tumor já foram envolvidos com risco aumentado de recorrência do tumor como *FANCC* e *PTCH1* (51;62) e a expressão reduzida da proteína p27 tem sido associada com progressão em lesões pré-cancerosas da laringe, indicando *p27* como um potencial gene supressor tumoral, assim como mutações de *WAF1/CIP1* frequentemente ocorrem em tumores malignos, sendo que a proteína mutada é incapaz de bloquear o ciclo celular (25). Recentemente o gene *LKB1* foi identificado como um supressor de tumor, mapeado no cromossomo 19p13.3, e que esta associado com a progressão de HNSCC (63).

### 3.4.2 Oncogenes

Os oncogenes codificam proteínas que promovem a perda de controle de crescimento e a conversão de uma célula a um estado maligno (64). Alguns oncogenes virais são versões alteradas de receptores de fator de crescimento que possuem atividade tirosina cinase intrínseca e cujos mecanismos de ativação envolvem mutação, amplificação gênica, rearranjo cromossômico ou superexpressão (65). Os oncogenes mais frequentemente encontrados em HNSCC são o gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), localizado em 7p12, a ciclina D1 também chamada de *PRAD1*, um proto-oncogene que responde a mitógenos extracelulares e é um controlador da progressão da fase G<sub>1</sub> no ciclo celular e cujo complexo cdk4/6-ciclina D1 estimula a progressão do ciclo celular por fosforilar a proteína pRB e a *Cox-2* cuja expressão citoplasmática tem sido observada em 70-88% das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (25).

### 3.5 Sinalização celular ligada á tirosina cinases

Muitas proteínas sinal extracelulares atuam via receptores tirosina cinases (RTK) tais como o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), dentre outros (49). Uma grande variedade de agentes extracelulares interage com os receptores RTK das superfícies das células-alvo, para regular os diversos processos como o crescimento e a proliferação celular, a diferenciação, a fagocitose, a mobilidade e a sobrevivência celulares (64). Alterações afetando um grande número de RTK's tem sido identificadas em muitos tumores malignos, envolvendo amplificação ou superexpressão de um receptor normal incluindo *EGFR*, comumente superexpressado em carcinoma de células escamosas, *ErbB-2*, que é frequentemente amplificado em adenocarcinomas de glândulas salivares, e *c-met*, cuja amplificação esta relacionada ao câncer de tireóide (66).

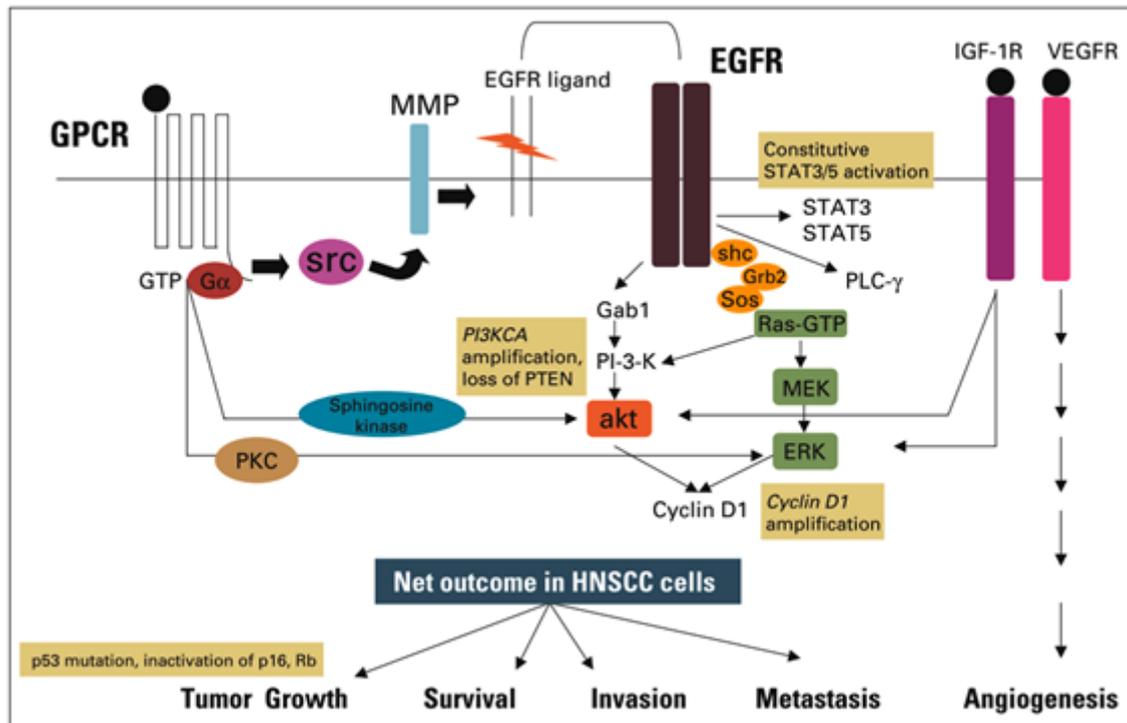
Receptores de fatores de crescimento são moléculas que transmitem informações através da membrana celular e sua ligação ao domínio de ligação ao ligante extracelular resulta na ativação do domínio catalítico intracelular tirosina cinase (65). A transdução de sinal dependente de *EGFR* começa na

estabilização de um dímero do receptor na membrana através da ligação ao ligante (67) e pontos de mutação nos domínios tirosina cinases ou no domínio extracelular e deleção do domínio regulatório intracelular podem resultar em ativação constitutiva desses receptores tirosina cinases, promovendo proliferação celular descontrolada (65).

O gene do *EGFR* codifica um receptor transmembrana que se liga ao fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa ( $TGF-\alpha$ ) e outras proteínas regulatórias, cujos eventos de sinalização downstream, após a ligação de EGFR aos seus ligantes, incluem ativação de tirosina cinase e ativação de Ras intracelular, Raf (*v-raf-1* murine leukemia viral oncogene homolog 1) além de cascatas de proteínas cinases que estão envolvidas na transformação maligna e crescimento do tumor por meio da inibição de apoptose e da proliferação celular (25). Além disso, uma sequência de eventos de transdução de sinal envolvendo Ras/Raf/MAPK e PI3K ativam fatores de transcrição que, após a fosforilação de MAPK, transloca para o núcleo onde fosforila outros fatores de transcrição promovendo angiogênese e proliferação celular (68). Um importante mecanismo para ativação de EGFR em HNSCC é a ativação autócrina e parácrina pelos ligantes de EGFR: ErbB, EGF-heparin,  $TGF-\alpha$ , anfirregulina, betacelulina e heregulina, assim como efetores downstream ERK1/2, Akt, STAT3 e STAT5, que estão ativados em tumores de cabeça e pescoço aumentando a proliferação celular (69).

Ativação de p38 MAPK é um evento frequente em HNSCC, disparando aumento de expressão de EGFR e COX-2, superativando as vias de Akt e mTOR que estão associadas com a progressão da doença e indução de angiogênese (70).

MicroRNAs regulam diferentes funções fisiológicas incluindo carcinogênese e já foi observado que a sobre regulação de miR-211 e a sub regulação de  $TGF-\beta$ RII estão associados com mau prognóstico em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço cujo mecanismo envolve o eixo miR-211- $TGF-\beta$ RII-c-Myc, promovendo a progressão tumoral (71). O esquema abaixo sumariza a cascata de sinalização envolvida no desfecho de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço.



**Figura 1 Ativação da sinalização nas vias do EGFR.** A ligação de EGF ao seu receptor ativa uma cascata de sinalização, ativando e/ou amplificando oncogenes, ligados ao controle do ciclo celular, que culmina com crescimento tumoral, sobrevivência, invasão e metástase. Adaptado de *Kalyankrishna & Grandis, 2006 (69)*.

### 3.6 Diagnóstico e tratamento dos tumores de cabeça e pescoço

O diagnóstico e o diagnóstico diferencial por imagem, das lesões da cavidade oral, orofaringe e assoalho oral estão limitados, de uma maneira geral, em determinar a topografia da lesão, já que na maioria dos casos são detectados clinicamente através de sinais e sintomatologia dolorosa orofaríngea, edema ou um distúrbio na sensação de paladar (72).

Muitas vezes o carcinoma de células escamosas é de evolução rápida ao aparecimento de ulceração irreversível em poucos meses, com tumoração óssea no estágio avançado, visível radiograficamente, produzindo uma área radiolúcida destrutiva, podendo apresentar deslocamento dental, sem suporte ósseo e com reabsorção radicular (34;73). Em estágio avançado é possível identificar, clinicamente, tumorações exofíticas (31) que são biopsiadas e com definição do diagnóstico por histopatologia (34), sendo a identificação de comprometimento de estruturas adjacentes e invasão para outros sítios feita por tomografia computadorizada ou ressonância magnética (72).

As terapias clássicas para o tratamento dos tumores do trato aerodigestivo superior são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, isoladamente, nos casos de doença em estágios iniciais ou a combinação entre cirurgia e radioterapia, quimiorradioterapia ou ainda as três modalidades juntas nos casos em que o paciente apresenta estágios mais avançados (12;74).

### **3.6.1 Cirurgia**

A cirurgia é a primeira escolha no tratamento de tumores do trato aerodigestivo superior, mas, apesar da obtenção de margens negativas ser o objetivo primário da cirurgia de cabeça e pescoço, a realização de tal meta pode ser impossível em alguns casos por conta da infiltração de estruturas vitais como artéria carótida ou fâscias pré-vertebrais e a recomendação de esvaziamento cervical planejado independente de resposta clínica é corroborada pelas altas taxas de doença residual observadas nas peças cirúrgicas (35). Uma nova modalidade de cirurgia robotizada vem sendo introduzida para o tratamento de tumores, especialmente na laringe e espaços parafaríngeos que é a cirurgia robótica transoral (75;76). A cirurgia com laser transoral é o tratamento de escolha para carcinomas glóticos precoces exibindo excelentes resultados, apresentando menor morbidade, mas que ainda requer maiores investigações (77).

### **3.6.2 Quimioterapia**

Os agentes antineoplásicos citotóxicos, em aplicação ou em estudos, têm, em princípio, ação na função de síntese macromolecular, ocorrendo pela interferência na síntese de DNA, RNA, proteínas ou no funcionamento adequado de moléculas pré-formadas (78). As neoplasias de cabeça e pescoço são sensíveis a vários agentes quimioterápicos, mas a resposta, em geral não é duradoura, podendo ser administrada como agente único ou combinação (74). Cisplatina ainda é a base para o tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço recorrente e metastático (35), porém a associação entre carboplatina e paclitaxel e ainda ifosfamida tem mostrado excelentes resultados na resposta clínica (12).

Embora a poliquimioterapia apresente melhores resultados nenhum estudo randomizado mostrou aumento significativo de sobrevida, sendo a

toxicidade da poliquimioterapia maior que a da monoterapia, a combinação de quimioterápicos esta indicada apenas para os casos em que o paciente apresente um bom estado geral (74). A incorporação de cetuximab na quimioterapia sequencial e em regimes de radioterapia/quimiorradioterapia tem gerado resultados interessantes, mas, também necessita de acompanhamento de longo prazo (35).

### **3.6.3 Radioterapia**

Denomina-se radiação ao transporte de energia através do espaço, da matéria ou de ambos e na radiação ondulatória a energia é transportada em forma de ondas eletromagnéticas com diferentes comprimentos de onda, cujo espectro abrange os raios X, que possuem energia suficientemente capaz de remover um elétron externo, deixando o átomo ionizado, classificando a radiação X como radiação ionizante, capaz de penetrar tecidos em profundidade (79;80).

A radioterapia aplica radiação ionizante sobre o tecido tumoral com finalidade terapêutica sendo uma modalidade de tratamento efetiva tanto para as lesões localizadas, quanto para as lesões avançadas do câncer de cabeça e pescoço, podendo ser preferida á cirurgia pela possibilidade de preservação funcional do órgão a ser tratado (81). Os raios X de alta energia são gerados em aceleradores lineares de forma que quando elétrons de alta energia deixam o acelerador, eles colidem com um alvo de metal, diminuindo sua velocidade quando passam perto do núcleo carregado positivamente, causando a eles um acréscimo de energia que é liberada em forma de raios X, os quais são emitidos do lado oposto á incidência dos elétrons no alvo (82).

Ao ser confirmado o diagnóstico e a indicação para a radioterapia inicia-se a etapa de planejamento cuja simulação do tratamento é parte integral do processo de planejamento para pacientes de radioterapia, que tem por objetivos a determinação da posição de tratamento, identificação dos volumes-alvo e a geometria de campo, baseados em imagens de tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética (83). Uma vez obtidas as imagens do paciente o passo seguinte é a realização dos contornos dos volumes-alvos e dos tecidos normais e, os planos de tratamento podem ser avaliados usando-se curvas de isodose, demonstrativo de isodose na

superfície, estatísticas de dose e histogramas dose-volume (84), que são representações de pontos de igual dose e servem como referência para o cálculo das distribuições de dose em profundidade, tanto no volume tumoral quanto nos tecidos adjacentes (85). A escolha do algoritmo do cálculo de dose é um equilíbrio entre rapidez e precisão, que utilizam tabelas de percentagem de dose profundas e dados do perfil de feixe, com correções para mudanças de contornos e colimações quando necessário (83).

### **3.6.3.1 Radioterapia no tratamento de tumores de cabeça e pescoço**

O êxito no tratamento radioterápico leva em consideração uma série de fatores que contribuem para a efetividade da ação da radiação ionizante sobre o tumor cuja base principal é o planejamento radioterápico, que envolve desde a localização anatômica da massa tumoral até o cálculo de dose recebido pelo paciente durante o tratamento (86).

Os tumores de cabeça e pescoço respondem á radioterapia através da perda da capacidade clonogênica, promovida pelo fracionamento diário de doses, essencialmente como uma função exponencial da quantidade de células mortas (12). Muitos esquemas de fracionamento ou administração diária de dose são usados em todo o mundo, sendo o esquema padrão a aplicação diária de 1.8Gy a 2.0Gy, (Gy = Gray), cinco dias por semana, perfazendo um tratamento de 35 frações com dose total acumulada de 70Gy, esquema que permite a regeneração dos tecidos normais, mas não das células tumorais ao longo de todo o curso terapêutico (81).

Carcinomas da cavidade oral são tratados em dois campos paralelo e oposto, em aparelhos de megavoltagem com energias entre 4 e 6 MV (87) e nos casos avançados, com envolvimento linfonodal toda a drenagem cervical é incluída no campo de irradiação, sendo prescrito reforço adicional de 10 a 20Gy (88). Em carcinoma de laringe em estágio inicial as cordas vocais são preservadas, irradiando somente a lesão primária e a cadeia de linfonodos cervicais fica fora do campo de irradiação, porém nos casos mais avançados as cordas vocais estão comprometidas (89), enquanto nos casos de carcinomas de hipofaringe em estágios iniciais os campos utilizados são paralelo e lateral com 2Gy diários por sete semanas (90). Nas glândulas salivares maiores o volume a ser irradiado é determinado por achados

patológicos tais como invasão perineural (91) e quando existe comprometimento do nervo facial, no caso da glândula parótida, o volume irradiado deve ser maior, incluindo o canal facial até o gânglio geniculado (92).

A radioterapia de intensidade modulada (IMRT) tem sido vista como vantajosa em comparação às técnicas tradicionais, como radioterapia convencional, por oferecer uma cobertura mais homogênea da dosagem em relação ao volume alvo e uma redução da exposição dos tecidos adjacentes ao tratamento (35). Ao contrário de usar um campo de irradiação uniforme, a IMRT modula a quantidade de radiação campo por campo, por meio de colimação multifolhas que se adapta na saída do acelerador linear, reduzindo as doses sobre os tecidos adjacentes ao volume tumoral (81). Radioterapia hiperfracionada também tem sido utilizada em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço onde se aplica 1.2Gy duas vezes por dia em doses totais de 80Gy, cujo propósito é atingir o maior número de células tumorais na fase radiosensível, apesar de aumentar os efeitos agudos da radioterapia (35;81;92). Quando radioterapia é utilizada isoladamente, hiperfracionamento leva a melhoras significativas na sobrevida geral (35).

Radioterapia com quimioterapia concomitante tem sido alvo de vários estudos no contexto pós-operatório de pacientes com doença localmente avançada de cabeça e pescoço na tentativa de alcançar um efeito sinérgico para vencer a radiorresistência, uma das principais causas de falha local, além de tentar erradicar micrometástases a distância que são a causa de falhas sistêmicas do tratamento (12;81;87). Estudos demonstram que a radioterapia combinada com 5-fluorouracila (5-FU), cisplatina, carboplatina e mitomicina C simultâneas resulta em grande vantagem de sobrevida, independentemente do programa de radiação empregado (12;35).

#### **3.6.4 Terapia fotodinâmica**

Um composto fotossensível é introduzido no paciente e se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente. Essas são posteriormente irradiadas, *via* laser, através de um catéter de fibra óptica, junto ao tecido doente, ativando o composto, gerando formas de oxigênio tóxicas que necrosam ou afetam convenientemente o tumor, levando-o ao colapso e à ação curativa do paciente (93).

Terapia fotodinâmica esta emergindo como uma nova modalidade terapêutica para tumores de cabeça e pescoço, em estágios iniciais, sendo minimamente invasivo, aplica luz sobre a área tratada previamente com drogas fotossensíveis (94). Para doença *in situ* da cavidade oral e da faringe as respostas são positivas, com preservação da função e sem comprometimento estético, principalmente para pacientes com múltiplas lesões ou recorrências (95).

### **3.7 Interações das radiações ionizantes com a matéria**

As radiações ionizantes são divididas em duas classes: ionização direta cujas interações produzem ionização e excitação do meio e, ionização indireta, que não pode ionizar diretamente átomos, mas pode causar interações capazes de liberar partículas carregadas, conhecidos como radiação secundária que promovem a ionização do meio, em cuja categoria os fótons se encontram e que transferem sua energia cinética para os elétrons, tornando-os ionizados (96). A interação das radiações ionizantes com a matéria é um processo que se passa em nível atômico. Ao atravessarem um material, estas radiações transferem energia para as partículas que forem encontradas em sua trajetória, sendo a energia transferida superior à energia de ligação do elétron e este é ejetado de sua órbita (97). Quando raios X penetram na matéria eles podem ser completamente absorvidos, atenuados ou passar pela matéria sem promover interações, bem como um número de processos pode ocorrer tais como espalhamento de fótons; efeito fotoelétrico que é a completa absorção de um fóton nas camadas K e L de um átomo; efeito Compton em que o fóton incidente transfere parte de sua energia cinética para os elétrons das camadas mais externas, desviando sua trajetória original e ioniza estes elétrons; formação de fótons fluorescentes ou de elétrons Auger. Estes processos são dependentes do número atômico, do coeficiente de atenuação de massa, representado por  $\mu/p$ , e da intensidade do feixe de radiação e, para estruturas materiais fluidas, a radiação ionizante promove dano radioquímico devido à formação de radicais livres e alterações químicas em estruturas cristalinas (98).

### 3.7.1 Efeito biológico das radiações ionizantes

A radiobiologia é a ciência que investiga os mecanismos associados ao efeito das radiações ionizantes em sistemas biológicos.

Efeitos biológicos destas radiações podem ser investigados por meio de várias técnicas como ensaios bioquímicos e biologia molecular inclusive a verificação de radiorresistência e radiosensibilidade de células tumorais humanas em cultivo (5). A radiação ionizante pode regular a expressão de genes como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*, que controlam sinalização de lipídios como esfingomielinase e a família de PIKK que incluem ATM e DNA-PK (99). A repopulação clonogênica durante a radioterapia fracionada usando frações de 3Gy em intervalos de 24h e 48h em linhagens de carcinoma de células escamosas humanas foi similar ao encontrado sob condições ambientais, ou seja, como ocorridos nos pacientes tratados pela radioterapia (100).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está frequentemente superexpressado em tumores malignos e estes níveis altos estão relacionados ao aumento da radiorresistência celular também no carcinoma de células escamosas (101). Os estudos de Ogino (102) usando feixes de radiação X de intensidade modulada (IMRT) demonstraram, *in vitro*, que as curvas de sobrevivência celular diminuem quando as células em cultivo são submetidas a doses intermitentes de radiação ionizante.

A radiação ionizante, como a originada por fótons, é um potente indutor de apoptose levando a um intrincado mecanismo que ainda necessita de maiores esclarecimentos sobre o dano induzido ao DNA e as suas implicações no ciclo celular (99).

A caracterização bioquímica dos sistemas de reparação em células eucariotas é ainda incipiente e a maioria dos estudos se baseia no isolamento de enzimas, cujas propriedades *in vitro*, sugerem que possam fazer parte deste sistema (99). Em algumas ocasiões o DNA lesado pode perder completamente um par de bases e a célula utiliza os sistemas de reparação sujeitos a erro (*error-prone*), no qual qualquer uma das bases é inserida no local lesado para garantir a continuação do processo de replicação (103). Estudos revelam que as proteínas Rad50 e Rad51, juntamente com a Histona fosforilada  $\gamma$ H2AX, desenvolvem importante papel nos mecanismos de reparo em quebras da dupla fita de DNA causadas por radiação ionizante (58). A procura por

biomarcadores nas vias de reparo pode ajudar na predição à resposta terapêutica, como a retenção do foci  $\gamma$ H2AX em biopsias de pacientes com tumores dos espaços cervicais (104).

### **3.8 Aspectos gerais da sinalização intracelular de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

No compartimento intracelular o  $\text{Ca}^{2+}$  atua como segundo mensageiro e controla uma variedade de eventos fisiológicos, abrangendo respostas de curta duração como contração muscular e secreção de hormônios, bem como respostas de longa duração como transcrição gênica, proliferação e morte celular (105).

#### **3.8.1 Princípios da Sinalização intracelular de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

Sinais de Cálcio são cruciais para diversas funções celulares incluindo adesão, diferenciação, proliferação, funções efetoras e regulação da expressão gênica. Este íon exerce importante função como modulador celular estando presente no interior das células tanto no citosol, quanto dentro de estoques existentes em compartimentos como retículo endoplasmático, mitocôndrias, retículo nucleoplasmático, dentre outros (106). A homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  é mantida pelo funcionamento sincronizado de canais, transportadores e bombas dependentes de ATP, localizadas na membrana plasmática e na membrana de organelas intracelulares e o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático pode ocorrer por influxo a partir do meio extracelular ou por liberação de estoques intracelulares ou ambos (107).

Os receptores do Inositol, 1,4,5-trifosfato,  $\text{IP}_3$ , são canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que estão localizados principalmente na membrana plasmática, no retículo endosarcoplasmático e no retículo nucleoplasmático, possuindo 3 isoformas denominadas tipo I, II e III, que são ativadas pelo  $\text{IP}_3$ , cuja ligação ao seu sítio específico no receptor promove a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (107;108).

A fosfolipase C (PLC) hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) para gerar  $\text{IP}_3$  (109). O  $\text{IP}_3$  se liga aos receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  dos compartimentos internos. Esta é a principal via formadora de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em linhagens celulares de origem epitelial; podendo ser ativada tanto por receptores acoplados à proteína G quanto por receptores da família tirosina cinase (110).

### 3.8.2 Importância da sinalização de $\text{Ca}^{2+}$ na célula tumoral

Mudanças nos níveis do  $\text{Ca}^{2+}$  promovem uma grande variedade de sinais que controlam os processos celulares como principal agente na decisão de sobrevivência ou morte celular, porquanto as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  são mantidas dentro de certos limites fisiológicos e quando células tumorais perdem tais limites conseguem manter seu fenótipo transformado (111).

Alguns estudos sugerem que mudanças na expressão ou na atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  apresentam um importante papel no câncer, cujo aumento da expressão destes canais, na membrana plasmática, aumenta o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovendo a via proliferativa dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (112). Convencionalmente, sabe-se que células neoplásicas exibem grande liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a proliferação e sugere-se que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  na proliferação de células tumorais pode ocorrer pela perda da função da proteína Rb, que as tornam bem menos sensíveis à inibição de Ras ou às vias Reguladoras externas de cinases 1 e 2 (113;114).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T são necessários para a proliferação de células do câncer de mama, coloretal, gástrico e próstata, assim como a expressão de TRPV6 foi observada para a proliferação de células de câncer de próstata. A expressão reduzida de SERCA2 leva, provavelmente, a alterações no ambiente tecidual através da modulação da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  intra e extracelular. O silenciamento de genes para canais de voltagem em alguns tipos de tumor pode ocorrer por hipermetilação. A metilação está envolvida na expressão de PMCA1 e SERCA2 em tumores orais humanos, enquanto outras mutações são resultado da perda ou redução da expressão de SERCA2 e a amplificação de *ITPR2*, que codifica o  $\text{IP}_3\text{R}_2$ , ocorrem em alguns tumores humanos (111).

Os mecanismos que mudam a expressão de canais específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  em câncer são pobremente entendidos reportando tanto a mecanismos genéticos quanto epigenéticos (111). Uma célula tumoral pode aproveitar a maquinaria de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  para promover a proliferação celular, protegendo-se da apoptose. Devido ao seu principal papel no controle da morte celular e na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , o retículo endoplasmático e a mitocôndria são a linha de frente para esta batalha entre a sobrevivência e a morte celular, que ocorrem durante as transformações oncogenéticas, e são sítios onde a

remodelação do aparato da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre para limitar a morte induzida pelos sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  no câncer (114).

Alguns tipos de cânceres estão associados com a sobre regulação ou a sub regulação de canais específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  como no câncer de próstata e cólon (112) e quando alterações de concentração ocorrem, estas podem ativar mecanismos de morte como em células LNCaP de câncer de próstata com receptor androgênico, em que foi observada a indução de apoptose quando os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  foram esvaziados, farmacologicamente, aumentando sua concentração livre no citosol (115).

### **3.8.3 O papel do $\text{Ca}^{2+}$ nuclear na célula tumoral**

É sabido que os componentes necessários para a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediada por  $\text{IP}_3$ , se localizam na membrana plasmática, mas há evidências de que estes componentes estão também presentes no envelope nuclear. Estes incluem a PIP cinase (PIPK) (116;117), que sintetiza  $\text{PIP}_2$ , além da PLC (118) e dos  $\text{IP}_3\text{R}$  (119-121).  $\text{IP}_3\text{R}$  são encontrados tanto no lado citoplasmático quanto no lado intranuclear da membrana nuclear (122-124). Nosso grupo demonstrou que fatores de crescimento podem induzir a produção nuclear de  $\text{IP}_3$  (125), explicando, assim, como os RTKs iniciam a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , preferencialmente, no núcleo celular.

O papel do  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear na célula tumoral é bem discutido em nossa revisão: Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus, em anexo (126).

## **4 Materiais e Métodos**

Esta pesquisa foi desenvolvida usando cultivo celular do espécime carcinoma de células escamosas humano. Como modelo foi usada a linhagem tumoral A431, cuja resistência à radiação já foi retratada na literatura (127).

Para atingir os objetivos propostos as seguintes metodologias foram aplicadas:

**Objetivo 1: Desenvolver um modelo de irradiação *in vitro* capaz de reproduzir o esquema de fracionamento diário de doses, aplicando radiação X sobre as células tumorais**

### **4.1 Plataforma de sustentação dos frascos de cultivo celular**

Para manter os frascos de cultivo celular posicionados durante as sessões de irradiação, uma plataforma de acrílico foi construída, contendo um braço posicionador medindo 270mm; uma base medindo 250mm x 185mm; uma tampa medindo 250mm x 185mm e uma régua de ajuste medindo 185mm.

### **4.2 Planejamento de irradiação das células A431**

O planejamento radioterapêutico é baseado em imagens. Para calcular os percentuais de dose sobre as células seis frascos de cultivo celular T25 (TPP, Suíça), completamente preenchidos com meio de cultivo celular RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY) e imersos em 25cm<sup>3</sup> de água, dentro de um fantoma de acrílico, modelo F400 (Medintec, Mogi das Cruzes, Brasil), medindo 40cm x 40cm x 40cm. Em seguida foram realizadas imagens de tomografia computadorizada do sistema no tomógrafo Sensation 64 Siemens (Malvern, EUA), na Axial, centro de imagens (Belo Horizonte, Brasil). As imagens foram processadas no software de planejamento radioterápico CAT 3D for WIN 32 e as curvas de isodose foram traçadas e o planejamento foi desenhado usando dois campos de irradiação verticais: paralelo e oposto.

### **4.3 Prova de conceito do planejamento de irradiação das células**

#### **A431**

Para confirmar as doses planejadas foi feita a dosimetria do sistema utilizando duas câmaras de ionização modelos plane parallel ionization chamber 0.5cm<sup>3</sup>, Scanditronix Wellhofer PPC05 (Bartlett, EUA), e pine point cylindrical ionization chamber 0.1cm<sup>3</sup> Scanditronix Wellhofer, CC01TNC/4146, (Bartlett, EUA), juntamente com placas de água sólida Solid Water™ slab Gammex 457 (Middleton, EUA) e as medidas foram feitas no eletrômetro MAX-4000 (Middleton, EUA). As medidas foram feitas na unidade pico Coulomb (pC) com tamanho de campo medindo 25 x 25cm<sup>2</sup> e 50 unidades monitoras usando os settings do acelerador linear a 21°C, umidade relativa do ar de 48% e pressão atmosférica de 92,6kPa.

**Objetivo 2: Avaliar o efeito *in vitro* do fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear, na proliferação de células tumorais do carcinoma de células escamosas humano, seu impacto na progressão do ciclo celular e na fração de sobrevivência**

Para alcançar este objetivo desenvolvemos um protocolo de irradiação que se aproxima ao máximo das condições de tratamento aplicado ao paciente. Para este estudo utilizamos as seguintes metodologias:

### **4.4 Construção adenoviral InsP<sub>3</sub>-Buffer-NLS**

Foi usada uma construção adenoviral do tipo V, contendo o cDNA para o domínio de ligação ao IP<sub>3</sub> (resíduos 224-605) do receptor humano de IP<sub>3</sub>, do tipo I denominada InsP<sub>3</sub> Sponge NLS, originalmente doada pelo Dr. Tamas Balla (Endocrinology and Reproduction Research Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Em resumo, o domínio de ligação ao InsP<sub>3</sub> do IP<sub>3</sub>R humano do tipo I (número de acesso no GenBank D26070) foi amplificado de cDNA de cérebro humano (Quickclone, CLONTECH) com os seguintes pares de primers 5' GCA ACA GAG TGC CTG ACC CAG GTC AG-3 e 5- CTT TCG CAC CAG GCT GAC AAA TGT GTC 3'. O produto de PCR foi subclonado no plasmídeo de clonagem pGEM-Easy T/A (Promega, Madison, WI). Após sequenciamento, dois clones foram identificados, um contendo

(SHII+) e o outro faltando (SHII-) a região de ligação localizada entre os dois domínios envolvidos na ligação ao InsP<sub>3</sub>. O “splice variant” SHII+ foi usado como “template”, o domínio de ligação ao InsP<sub>3</sub> (resíduos 224–605) foi amplificado com “nested primers” contendo os sítios de restrição para as enzimas XhoI e EcoRI, e o produto de PCR foi subclonado no vetor pEGFP-C1. Subsequentemente a EGFP foi substituída por proteína fluorescente monomérica vermelha (mRFP), que foi ligado á sequencia de localização nuclear (NLS) (128). Este constructo tampona Ca<sup>2+</sup> seletivamente no núcleo (129). O adenovirus foi ampliado usando células HEK-293 e purificado usando o kit de purificação VivaPure AdenoPack Sartorius (Goettingen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.5 Protocolo de irradiação**

As células A431 foram plaqueadas na densidade  $6,0 \times 10^5$  células, em frascos de cultivo celular T25 (TPP, Suíça), 24h antes da infecção pela construção adenoviral InsP<sub>3</sub>-Buffer-NLS. Após a infecção, os frascos foram completamente preenchidos com meio RPMI, suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY) e as tampas foram recobertas com parafilme (Marienfeld, Alemanha) e deixadas na incubadora de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, 24 horas depois da infecção, as células foram irradiadas na técnica isocêntrica, com os frascos de cultura imersos no fantoma de acrílico contendo 25cm<sup>3</sup> de água, e posicionados na plataforma de acrílico, como descrito no item 4.2, por uma semana em doses diárias fracionadas de 2Gy, utilizando dois campos de irradiação: paralelo e oposto, no equipamento do tipo Acelerador Linear Clinac 4X Varian®, com energia de 4MV, do Instituto de Radioterapia São Francisco, Belo Horizonte, MG. Os parâmetros utilizados foram: 116 unidades monitoras para o campo anterior e 129 unidades monitoras para o campo posterior.

As condições ambientais foram: temperatura de 20°C, umidade relativa do ar de 42% e pressão atmosférica de 92,6kPa. Foram utilizados quatro grupos de células, a saber: um grupo controle (A), um grupo de células que recebeu radioterapia (B), um grupo de células infectada com construção adenoviral InsP<sub>3</sub>-Buffer-NLS (C) e um grupo infectado com a mesma construção e que recebeu radioterapia (D). Os grupos de células A e C ficaram

sob as mesmas condições ambientais dos grupos B e D, porém, não receberam irradiação. O protocolo de radioterapia utilizado *in vitro*, foi padronizado e segue modelo de protocolo clínico. Após as sessões de irradiação os frascos de cultivo celular foram mantidos na incubadora de CO<sub>2</sub>, 5h antes de começarem os ensaios biológicos.

#### **4.6 Ensaio de proliferação celular**

Baseados em resultados prévios do grupo, onde foi demonstrado o impacto do tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear na redução da proliferação de células tumorais hepáticas (130), o papel do tamponamento do Ca<sup>2+</sup> nuclear na proliferação celular das células A431 foi avaliado, e como controle não tumoral, foi utilizada cultura primária de fibroblasto gengival humano. 2,0 x 10<sup>4</sup> células por poço foram plaqueadas em placa multipoços de 24 well (TPP, Suíça). 24h após o plaqueamento o meio de cultivo suplementado foi removido e meio RPMI, para células A431 e meio DMEM (Gibco, Grand Island, NY), para os fibroblastos, foi adicionado, no volume final de 1mL por poço, para sincronizar o ciclo celular. As células foram mantidas nessa condição overnight e, logo após, elas foram infectadas com 200 MOI, usando a construção adenoviral InsP<sub>3</sub>-Buffer-NLS. A partir de 24h da infecção procedeu-se a contagem das células pelo método de exclusão por Azul de Tripán (Merck Milipore, Alemanha) e, durante 48, 72 e 96 horas pós-infecção, elas foram contadas usando um hemocítômetro.

#### **4.7 Ensaios de avaliação de ciclo celular pela técnica de citometria de fluxo**

Após cinco horas do término da irradiação, as células A431 de cada grupo experimental, foram retiradas por meio de tripsinização de cada frasco T-25, contadas, pelo método de exclusão por Azul de Tripán (Merck/Milipore, Alemanha), obtendo-se 500.000 células por tubo, para avaliação da fragmentação do DNA. Foi utilizado o protocolo proposto (131), usando solução fluorocrômica hipotônica (HFS, 05%), contendo 0,5 mg/mL de Iodeto de Propídio – PI (Sigma, Suíça), 0,5% de Triton X-100 v/v (USB, Cleveland, EUA) e 0,5% Citrato de Sódio p/v (Merck, Alemanha). Os tubos foram incubados por 4h a 8°C ao abrigo da luz. Após incubação as amostras foram submetidas à

análise por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur (BD Biosciences, EUA) e os dados analisados no programa Cell Quest (BD Biosciences, EUA). Este ensaio foi realizado diariamente até o quinto dia de irradiação.

#### **4.8 Ensaio de fração de sobrevivência**

Cada dia após a irradiação  $1.0 \times 10^3$  e  $2.0 \times 10^3$  células A431, dos grupos experimentais A, B, C e D, foram plaquedadas em placas multipoços de 6 well e mantidas em cultivo por 15 dias para a formação de colônias. Após esse tempo o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com Glutaraldeído a 6% (Merck, Alemanha), por 30 minutos, e coradas com cristal violeta a 0,5% (Vetec, Brasil) overnight. O cristal violeta foi removido e as placas lavadas com água destilada, sob agitação, por 3 vezes. As placas foram deixadas secando ao ar livre e as colônias contadas manualmente.

**Objetivo 3: Investigar os mecanismos desencadeados pela *exposição in vitro* ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de  $Ca^{2+}$  nuclear em carcinoma de células escamosas humanas**

#### **4.9 PCR quantitativo em tempo real**

Este ensaio teve como objetivo avaliar alteração de expressão transcricional do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e da metaloproteinase ADAM-17 em células A431 após o tamponamento do  $Ca^{2+}$  nuclear, bem como em associação com irradiação por raios X. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA). A primeira síntese de cDNA utilizou o kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Thermo Scientific, Canada). PCR em tempo real para ADAM-17 utilizou SYBR® Green PCR Master Mix. Para PCR em tempo real utilizamos a sequência de primers forward para EGFR 5'-CTTTTCGATACCCAGGACCAAG-3' e o primer reverse foi 5'-CAACTTCCCAAATGTGCCC-3'. Para ADAM-17 a sequência do primer forward foi 5'-GGACCCCTTCCCAAATAGCA-3', e do primer reverse foi 5'-ATGGTCCGTGAG ATCCTCAAA-3'. Os valores de threshold dos genes alvo foram normalizados utilizando gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os controles negativos foram tratados com água e RNA total sem transcriptase reversa. Os templates

de DNA foram amplificados por PCR quantitativo em tempo real utilizando StepOnePlus™. (Applied Biosystem, EUA).  $\beta$ -actina foi usada como normalizador.

#### **4.10 PCR quantitativo para avaliação das lesões ao DNA nuclear e mitocondrial**

O DNA nuclear e mitocondrial das células A431 foi isolado nos dias 1 e 5, em cada uma das condições experimentais. O DNA genômico foi usado usando o kit QIAGEN Genomic Tip Kit, (QIAGEN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram diluídas em 3 ng/ $\mu$ L pela Pico Green-based standard curve. O ensaio de QPCR compara a amplificação do DNA tratado com a amplificação do DNA controle e o fragmento nuclear (12.2 kb) foi amplificado usando os primers 2372 (5'-CATGTC ACCACTGGACTCTGCAC-3') e 3927(5'-CCTGGAGTAGGAACAAAATTGCTG-3'). O fragmento longo do DNA mitocondrial (8.9 kb) foi amplificado usando os primers 14841(5'-TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG-3') e 5999 (5'TCTAAGCCTCCTTATTCGAGCCGA-3'). O fragmento curto do DNA mitocondrial (221pb) foi amplificado usando os primers 14620 (5'- CCC CACAAACCCCATTAATAACCCA-3') e 5999, e este foi usado para normalizar mudanças no número de cópias. A amplificação das amostras tratadas foi comparada com a do controle, e a amplificação relativa foi calculada. Estes valores foram utilizados para estimar o número médio de lesões por 10 kb do genoma, usando a distribuição de Poisson. O resultado final é a média de dois sets de PCR por cada gene alvo em, pelo menos, 3 experimentos. O *t* test de Student não pareado foi usado para a análise estatística.

#### **4.11 Ensaio de atividade mitocondrial pelo MTT**

As células A431, em cada condição experimental, no quinto dia de tratamento, foram removidas dos frascos T25, contadas e plaqueadas em placas multipoços de 96 well, na densidade  $5.0 \times 10^3$  células por poço, volume final 100 $\mu$ L e mantidas na incubadora de CO<sub>2</sub> overnight. O ensaio de MTT (brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a atividade mitocondrial, quantificando o quanto o MTT, presente no

meio, foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células que o metabolizaram. Foram adicionados 10µL de MTT, 5mg/mL, (Sigma, EUA) em cada poço. Após 4 horas de incubação, sobre o abrigo da luz, na incubadora de CO<sub>2</sub>, o meio foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan foram solubilizados em 100µL de DMSO. A placa foi lida, espectroscopicamente, no espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Device, EUA) a 595nm.

#### **4.12 Western blotting**

Células crescidas em frascos de cultivo celular medindo 25cm<sup>2</sup> de área (T25) foram lavadas com PBS<sup>-</sup>1X e solubilizadas em 150 µL de solução detergente: Nonide P40 1% contendo 2% de inibidor de protease e 1% de inibidor de fosfatase (Roche Applied Science, EUA). A concentração de proteína foi determinada, espectrofotometricamente, pelo método de Bradford (Thermo Scientific, EUA). 50µg de proteínas das células A431, de cada condição experimental, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e transferidos para uma membrana de PVDF (Hercules, CA).

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite diluído em tampão TBST (tampão salino Tris base 20 mM acrescido de 0,05% de Tween 20) por 1 hora. Após bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário para ADAM-17 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), polyclonal anti-rabbit TACE (1:1000), EGFR (Cell Signaling, EUA), monoclonal anti-rabbit EGFR (1:1000), e antifosfo-EGFR (Tyr1173), clone 9H2 (Millipore Billerica, MA) que foram incubados overnight a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário goat-anti rabbit (Sigma, EUA) na diluição 1:5000 a temperatura ambiente por 1h. As membranas foram expostas ao filme de raios-X (Bio Max<sup>TM</sup>ML, KODAK) e os Westerns tiveram o sinal amplificado com o reagente Luminata (Merck Milipore, EUA) e os filmes foram escaneados no aparelho GS-700 imaging densitometer (BioRad, EUA). As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

#### **4.13 Imunocitoquímica**

Este ensaio permite a visualização do EGFR, o qual depois de ativado transloca da membrana plasmática para o interior das células. As células A431 foram fixadas com paraformaldeído a 4% (BioRad, EUA). Após 1h de bloqueio as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-rabbit EGFR (Cell Signaling, EUA), overnight a 4°C e com o anticorpo secundário goat anti-rabbit conjugado com Alexa-488 (Invitrogen, EUA). A localização subcelular deste receptor foi avaliada por microscopia confocal Zeiss 510 Meta (Thornwood, NY), utilizando excitação a 488nm e emissão a 505-550nm.

**Objetivo 4: Estabelecer novas abordagens metodológicas para avaliar os mecanismos desencadeados pela exposição *in vitro* ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear em carcinoma de células escamosas humanas**

#### **4.14 Cultivo de células em três dimensões**

Para o desenvolvimento desta técnica utilizamos a linhagem de melanoma humano MV3. As células foram removidas dos frascos de cultivo celular e 1.0 x 10<sup>6</sup> células foram contadas no hemocítômetro e transferidas para um coquetel contendo colágeno bovino tipo I Nutragen (Advanced Biomatrix, EUA), MEM 10X (Sigma, Suíça) e solução de bicarbonato de sódio a 7.5% (Gibco, Reino Unido). As células imersas na solução de cultivo 3D eram inseridas em uma câmara composta por lâmina e lamínula 22 x 22mm, selada com cera e parafina e deixada em incubação por 20 minutos na incubadora de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de presa do colágeno a câmara foi colocada em microscópio óptico com câmera acoplada para gravação time lapse a 37°C por 24h e 48h. As imagens foram analisadas no programa Autozell (Bremen University, Alemanha).

#### **4.15 Redução da migração celular por bloqueadores de integrinas**

As integrinas são as principais proteínas de ligação á matriz extracelular favorecendo a migração. Para estudar os efeitos do bloqueio das integrinas na dinâmica celular, das células de melanoma, foi utilizado o anticorpo 4B4 (Abbotec, EUA), 10µg/mL e peptídeo cRGD 10µM. Como controles foram

usados cRAD 10 $\mu$ M e isotipo mouse IgG tipo 110 $\mu$ g/mL. As culturas 3D foram fixadas com paraformoldeído a 4% e incubadas com anticorpo secundário Phalloidin Alexa 488 (1:50), (invitrogen, EUA) e o núcleo corado com DAPI (5 $\mu$ g/mL), (invitrogen, EUA). As imagens foram adquiridas no microscópio confocal Olympus Fluoview F1000 (Olympus, EUA) e analisadas no software Imaris (Bitplane, Reino Unido).

#### **4.16 Avaliação da velocidade de movimento e medida do índice de alongamento celular**

Para avaliar o efeito dos bloqueadores de integrina na velocidade de movimentação e na morfologia das células tratadas usamos os programas Autozell, (Bremen University, Alemanha). e Fiji 32, (NIH, EUA), respectivamente. Os gráficos foram construídos usando o programa Prims, versão 5.51 (GraphPad, EUA).

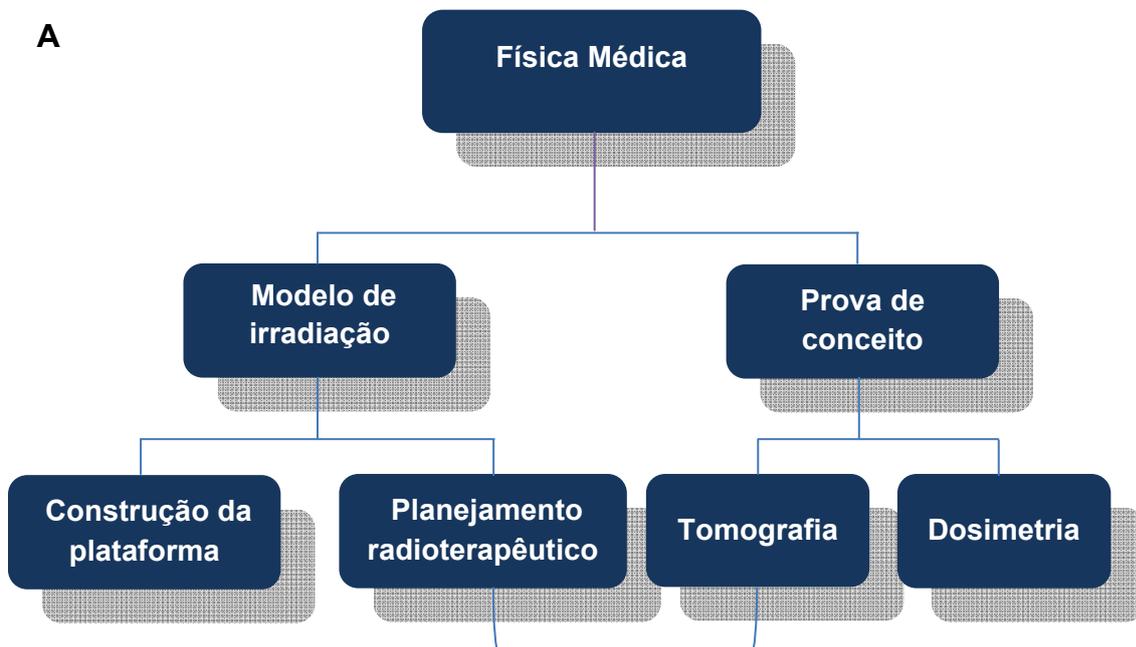
#### **4.17 Ensaio de imunorreatividade para ligação do anticorpo monoclonal Cetuximab aos receptores de EGF em hepatocarcinoma humano da linhagem HepG2**

O ensaio de imunorreatividade utiliza metodologia proposta por Lindmo *et al*, (1984) que já foi previamente descrita (132). Brevemente, as células foram tripsinizadas e contadas no hemocítômetro. Após esta etapa, elas foram centrifugadas por 5 minutos, a 4°C, usando 5.000 rpm e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em solução tampão contendo RPMI e 0,5% BSA (Sigma, EUA). Em seis microtubos de 1.5 mL foram adicionados 400 $\mu$ L de solução tampão e feita a diluição seriada da solução matriz contendo as células HepG2. As amostras foram radiomarcadas com In<sup>111</sup> cetuximab e incubadas por 20 minutos na incubadora de CO<sub>2</sub>. Após, os tubos foram levados para o aparelho gamma coulter Wizard (Perking Elmer, Alemanha) e a emissão gama foi contada. Após essa contagem, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 4°C, usando 5.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi levado para o gamma coulter e a emissão gama contada novamente. Os dados foram plotados e a fração de imunorreatividade (IRF) foi calculada em porcentagem de ligação específica aos receptores de EGF.

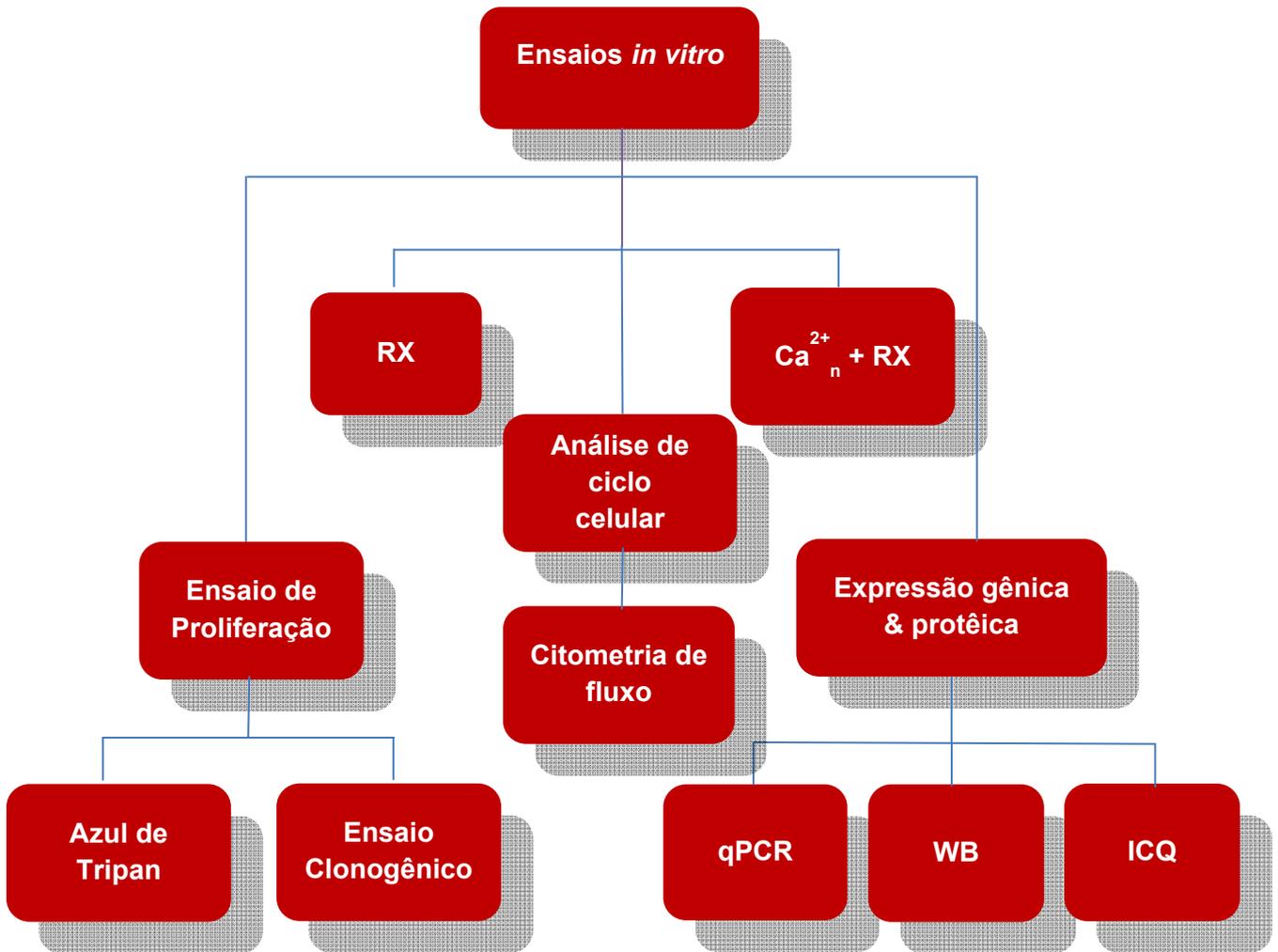
#### 4.18 Treinamento com manejo de animais geneticamente modificados, xenografia, aquisição de imagens e radioterapia em roedores

Como parte da aquisição de conhecimentos para a proposição de novas abordagens, para esta linha de pesquisa, fiz cursos sobre manejo de animais geneticamente modificados e treinamento com implantação de carcinoma de células escamosas humanas, da linhagem FaDu, em camundongos nude mice, colaborando com projetos desenvolvidos no Laboratório de Medicina Nuclear. Após o crescimento volumétrico do tumor, os animais foram tratados com radioterapia, sob sistema anestésico gasoso com Isoflurano a 4% para indução e mantidos durante as sessões de radioterapia com isoflurano a 1% e ventilação com O<sub>2</sub>. Os animais foram irradiados no aparelho XRAD 320ix (Precision X-Ray, EUA) e, após os tempos de tratamento, os animais receberam In<sup>111</sup>-DOTA-RGD. Um grupo foi levado para aquisição de imagem no aparelho microSPECT (Siemens, Alemanha) e o outro grupo foi eutanasiado. Amostras de sangue e remoção dos órgãos pulmão, fígado, baço, rins, estômago, músculo quadríceps e o tumor foram utilizados para o ensaio de biodistribuição do radiotraçador. Esta parte se refere a um projeto desenvolvido pelo Nuclear Medicine Laboratory.

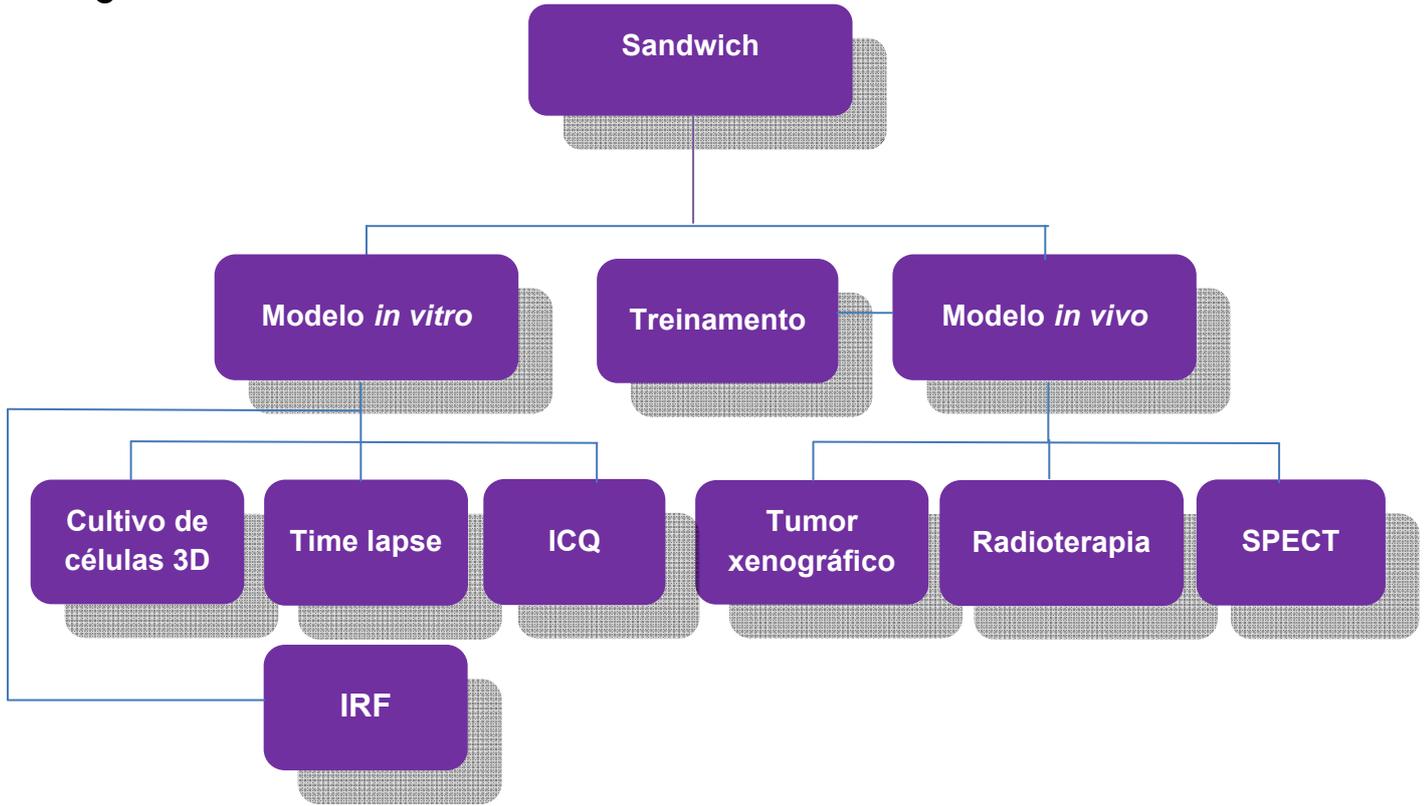
O Esquema abaixo sumariza as metodologias empregadas no sistema de irradiação *in vitro* **A**, ensaios biológicos **B**, e doutorado Sandwich em **C**.



**B**



C



## **5 Resultados**

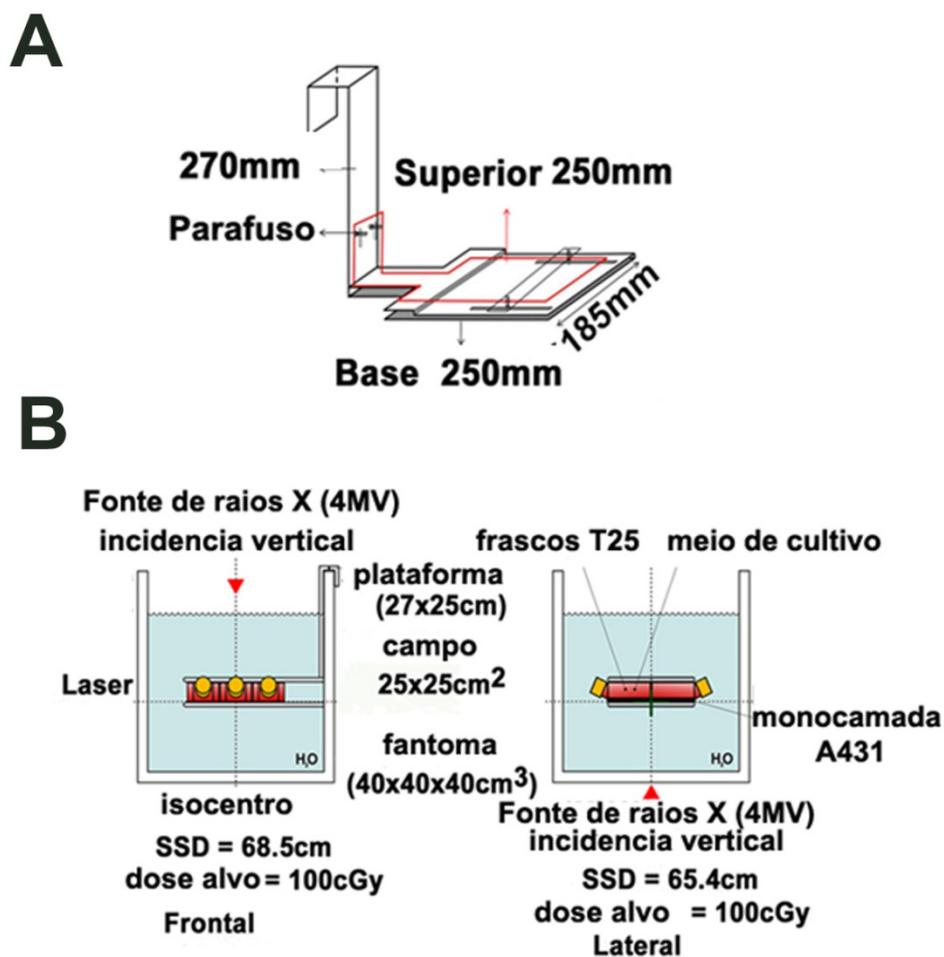
### **5.1 Desenvolvimento de um modelo de irradiação *in vitro* capaz de reproduzir o esquema de fracionamento diário de doses de radiação X sobre células tumorais**

#### **5.1.0 O modelo de irradiação *in vitro* reproduz o esquema de fracionamento diário de doses**

Desenvolvemos um modelo de irradiação *in vitro* que nos permitiu aplicar o protocolo clínico de radioterapia em modelo celular, garantindo reprodutibilidade da irradiação em todo o tempo de experimentação. Este modelo foi baseado em planejamento radioterapêutico, semelhante ao aplicado para o tratamento de pacientes com tumor de cabeça e pescoço.

#### **5.1.1 Plataforma de posicionamento das culturas celulares**

A plataforma de acrílico construída para manter os frascos de cultivo celular, na mesma posição durante as sessões de irradiação, foi capaz de posicionar seis frascos T25, contendo as células A431. A plataforma contendo os frascos de cultivo foi imersa em um fantoma de acrílico, cujo volume de 25cm<sup>3</sup> de água permitiu a irradiação das células em dois campos, por cinco dias, aplicando a dose diária de 2Gy. Por apresentar a densidade próxima da água e dos fluidos biológicos, o acrílico é o material de escolha para a confecção da plataforma. O desenho esquemático do sistema de irradiação é mostrado na figura 2:

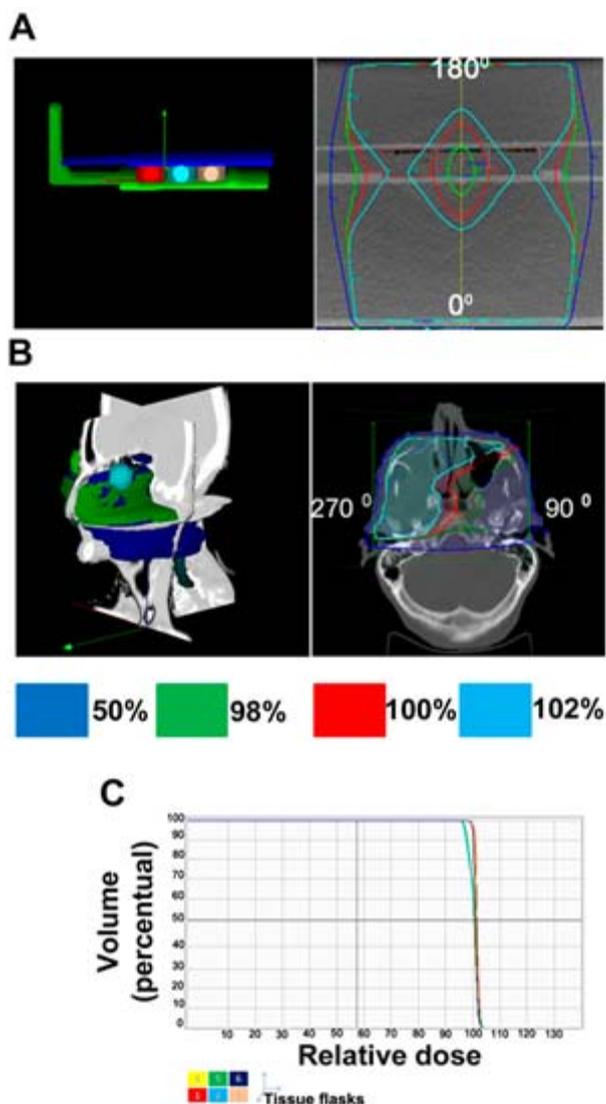


**Figura 2** Desenho esquemático do sistema de irradiação *in vitro*. A figura **A** mostra a plataforma de acrílico construída para manter os frascos de cultivo celular posicionados durante as sessões de irradiação. As figuras **B** e **C** mostram a plataforma com os frascos T25 imersos no fantoma, em vistas frontal e lateral, respectivamente. Foi aplicado sobre as células raios X oriundos de um acelerador linear com energia de 4MV. Foram aplicados dois campos de irradiação: paralelo e oposto com distância foco alvo (SSD) de 68,5cm e 65,4cm, respectivamente. A dose aplicada sobre o sistema foi de 2Gy.

### 5.1.2 Planejamento radioterapêutico das culturas celulares

Para nos aproximarmos do protocolo clínico adotado para o tratamento radioterápico dos pacientes com tumor de cabeça e pescoço, foram feitas imagens por tomografia computadorizada do sistema. As imagens foram analisadas no programa CAT3D e o planejamento foi desenhado para a irradiação das células A431 com as curvas de isodose traçadas em torno do

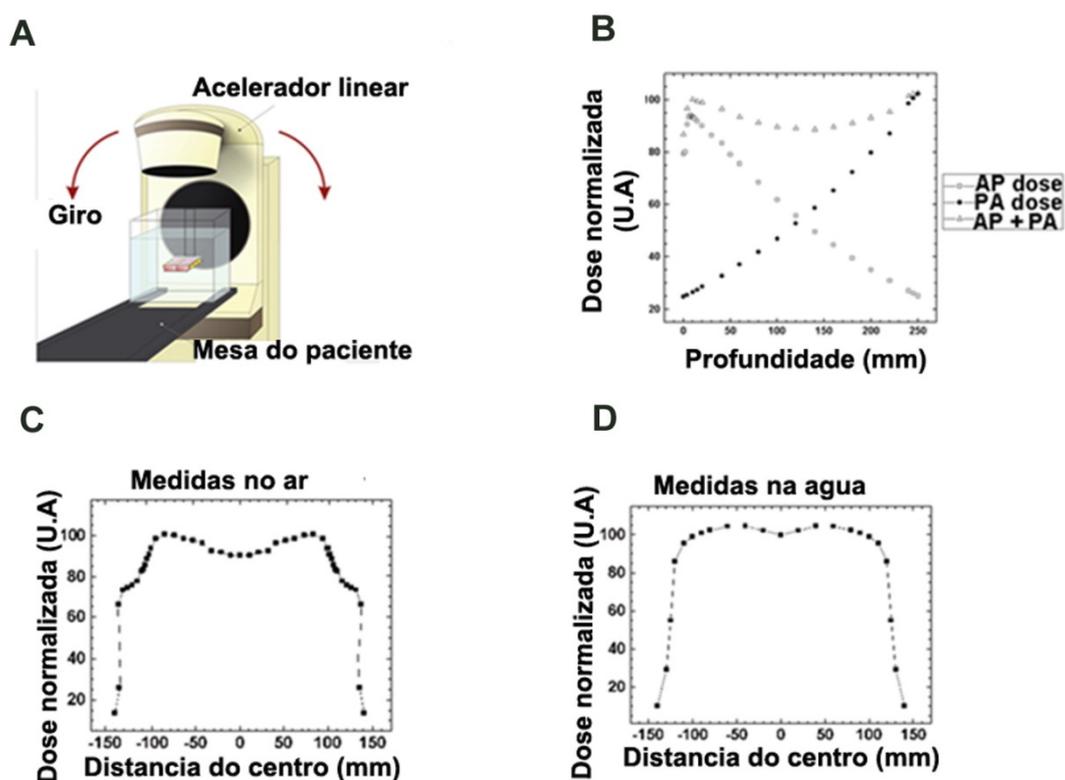
campo de irradiação, representadas pelas linhas coloridas. O cálculo de distribuição das doses sobre o sistema foi determinado pelo programa, mostrando que as células receberam  $100\% \pm 2\%$  da dose prescrita, identificada pelo histograma dose-volume. O planejamento é mostrado na figura 3:



**Figura 3** Planejamento de irradiação para as células A431. A figura **A**, lado esquerdo, mostra a imagem reconstruída em 3D da plataforma de acrílico com os frascos de cultivo posicionados e no lado direito a imagem mostra a plataforma com os frascos T25 imersos no fantoma de água com os dois campos de irradiação em  $180^{\circ}$  e  $0^{\circ}$ , bem como as curvas de isodose no sistema. A figura **B**, lado esquerdo, mostra a reconstrução 3D de uma imagem de tomografia computadorizada de um paciente com tumor no seio maxilar, e no lado direito o planejamento radioterápico do caso, com suas respectivas curvas de isodose, bem como os dois campos de irradiação. As curvas de isodose representam os percentuais de distribuição das doses dentro do campo de irradiação. O gráfico **C** mostra o histograma dose-volume de distribuição de dose no sistema planejado para as células A431.

### 5.1.3 Prova de conceito do planejamento radioterapêutico das culturas celulares

Para confirmar a dose planejada pelo programa CAT3D fizemos a medida dosimétrica do sistema, usando câmaras de ionização e determinando os perfis da dose, comparando o método tradicional de irradiação *in vitro*, que aplica dose única em um único campo, com o sistema de irradiação desenvolvido nesta pesquisa. O sistema desenvolvido neste trabalho mostra uniformidade de dose ao longo dos frascos T25 irradiados, além de confirmar a distribuição de dose calculada pelo programa, como mostra a figura 4:

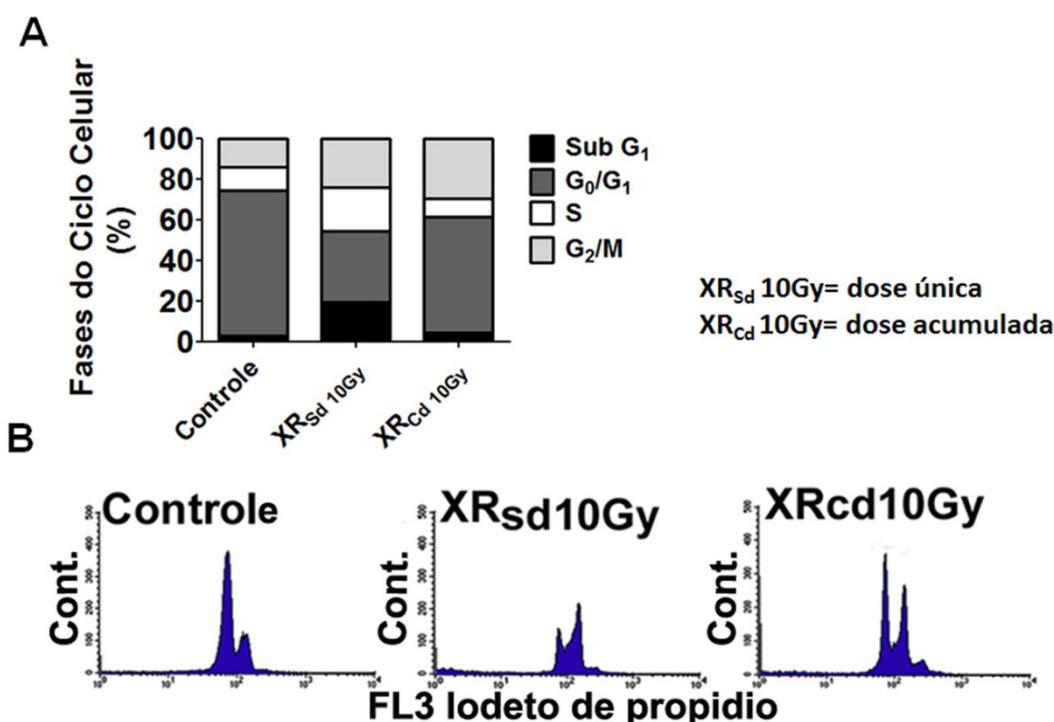


**Figura 4** Medidas dosimétricas do sistema de irradiação *in vitro*. A figura **A** mostra o desenho esquemático da irradiação das células A431 no acelerador linear, posicionadas na plataforma e imersas no fantoma de água, bem como o eixo de rotação para irradiá-las nos dois campos planejados, na técnica isocêntrica. O gráfico **B** mostra a integralização das doses nos dois campos de irradiação nas direções anteroposterior (AP) e pósterioanterior (PA) corroborando o percentual de dose  $100\% \pm 2\%$  sobre os frascos T25, calculado pelo programa CAT3D. O gráfico **C** mostra a formação de dois ombros laterais indicando falta de uniformidade de dose quando os frascos são irradiados debaixo de uma coluna de ar, enquanto o gráfico **D** mostra que o sistema de irradiação proposto permite homogeneidade de dose sobre os frascos de cultivo celular.

## **5.2 Avaliar o efeito *in vitro* do fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear, na proliferação de células tumorais do carcinoma de células escamosas humano, seu impacto na progressão do ciclo celular e na fração de sobrevivência**

### **5.2.0 O esquema de irradiação determina a resposta celular**

O ciclo celular é alterado pela radiação ionizante e a resposta depende da dose e da frequência da irradiação (133). Verificamos a cinética do ciclo celular nas células A431 quando submetidas ao esquema tradicional de irradiação *in vitro*, aplicando dose única de 10Gy, comparado à cinética do ciclo celular nas células submetidas ao esquema de irradiação *in vitro* desenvolvido nesta pesquisa, em que as células receberam doses fracionadas de 2Gy, por cinco dias consecutivos, com acúmulo de 10Gy. Nas células que receberam dose única foi observada uma queda significativa ( $p < 0.001$ ) no percentual de células na fase  $G_0/G_1$  ( $34.8 \pm 2.5\%$ ), com aumento do percentual de células mortas, correspondente à fase  $\text{Sub}G_1$  ( $19.4 \pm 2\%$ ), bem como aumento dos percentuais de células nas fases  $G_2/M$  ( $23.9 \pm 1.5\%$ ), e S ( $21.5 \pm 2.3\%$ ), respectivamente, quando comparadas às células do grupo controle. Quando as células A431 foram irradiadas, no esquema de fracionamento de doses, foi observado um perfil diferente. Comparado com o controle, o percentual de morte celular foi pequeno, mostrado na fase  $\text{Sub}G_1$ , indicando radiorresistência. Porém, houve redução na fase  $G_0/G_1$  ( $57 \pm 1.5\%$ ) e aumento do percentual de células na fase  $G_2/M$  ( $29.6 \pm 1.3\%$ ), relativamente ao grupo controle, ( $71.7 \pm 2.8\%$  e  $13.7 \pm 2\%$ ,  $p < 0.001$ ), respectivamente. É evidente que a morte celular foi mais significativa, ( $\text{Sub}G_1$ ,  $p < 0.01$ ) no grupo que recebeu dose única ( $19.4\% \pm 3.6\%$ ), comparado com o grupo que recebeu dose acumulativa ( $4.3\% \pm 2\%$ ), sugerindo uma resposta intrínseca adaptativa contra a morte celular induzida pela radiação X no grupo tratado com fracionamento diário de dose. Esses dados estão ilustrados na figura 5:



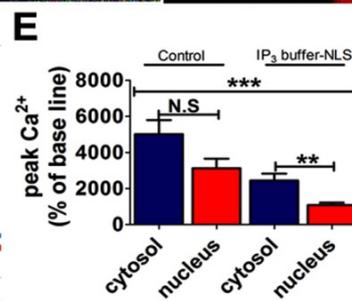
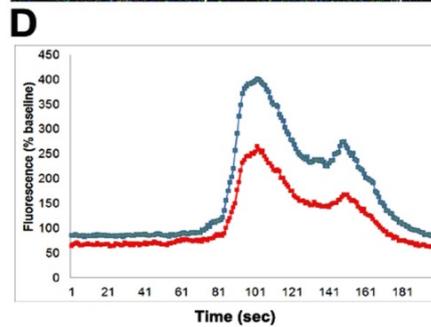
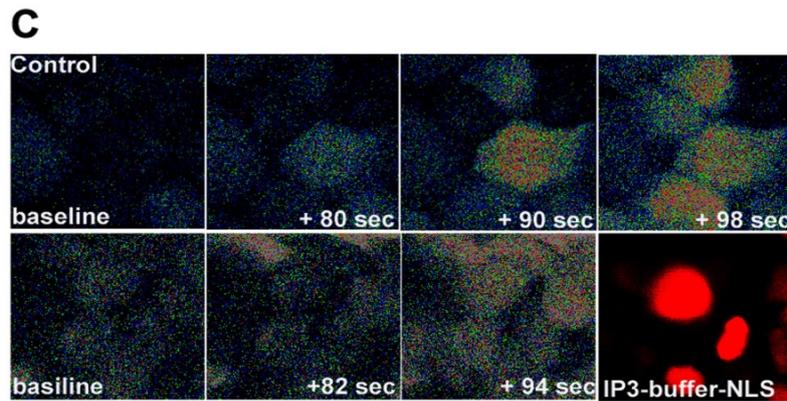
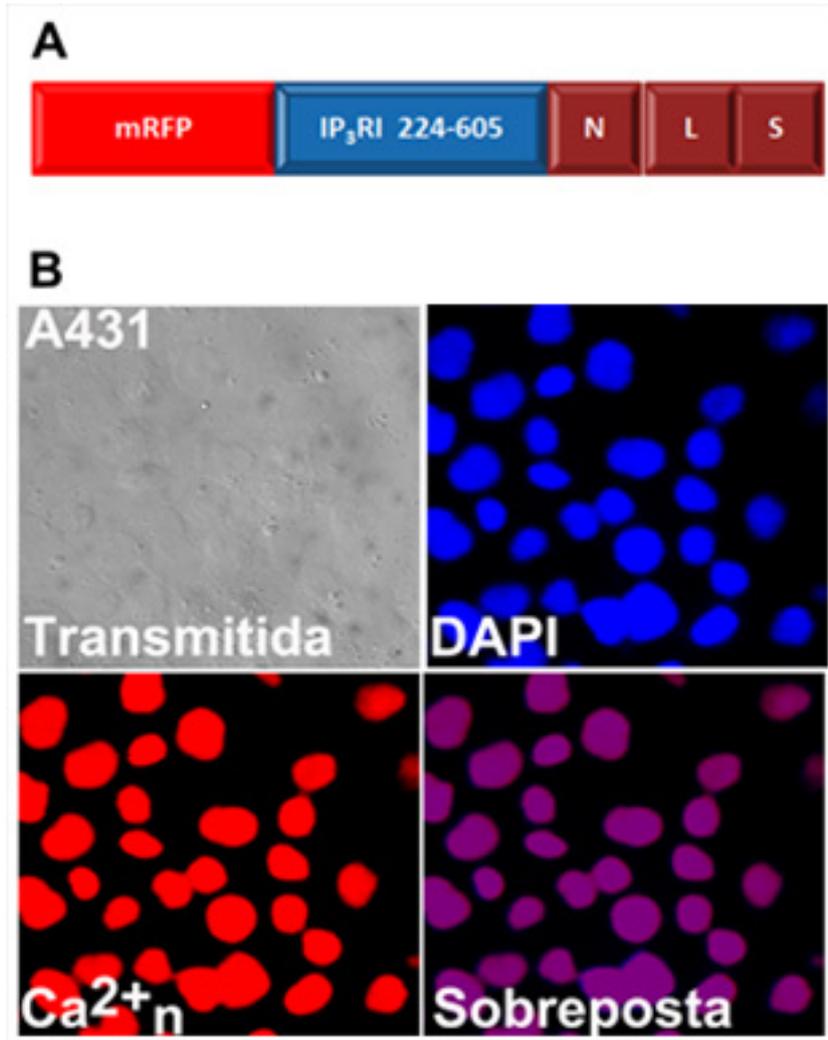
**Figura 5** Perfil do ciclo celular em células A431 irradiadas em diferentes esquemas de irradiação. O gráfico **A** mostra os percentuais de células em cada fase do ciclo celular, irradiadas com dose única e dose fracionada, respectivamente e comparadas com o grupo controle não irradiado. A figura **B** mostra uma imagem representativa dos perfis celulares quando as células A431 foram submetidas a diferentes esquemas de irradiação e comparadas com o grupo controle não irradiado. Experimentos em triplicada. Resultados obtidos de três experimentos independentes, sendo calculados: média e erro padrão médio. ( $p < 0.001$ )

### 5.2.1 Células tumorais são mais sensíveis ao tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear

Resultados prévios do grupo demonstraram que o  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear é essencial para a proliferação em células de carcinoma hepático (130;134). O mesmo efeito também foi observado nas células A431.

#### 5.2.1.1 Eficiência de infecção das culturas celulares

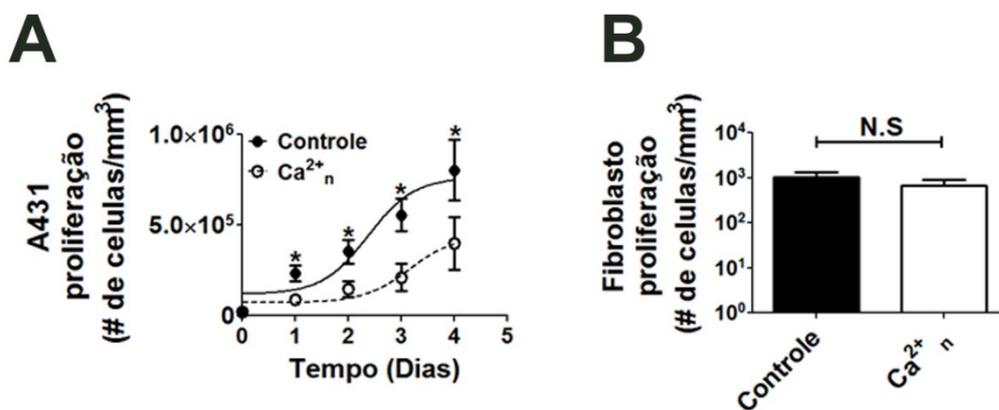
As células A431 e a cultura primária de fibroblastos gengivais humanos, gentilmente doados pela professora doutora Melissa Guimarães, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFVJM, em anexo, foram infectadas com a construção adenoviral InsP<sub>3</sub>-Buffer-NLS. A eficiência de infecção e de redução do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo das células é demonstrada na figura 6



**Figura 6** Eficiência de infecção das células A431 e eficiência de redução do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo das células pela ação tamponadora da construção. Em **A** está representado o desenho esquemático do constructo  $\text{InsP}_3$ -Buffer-NLS, que tem a proteína monomérica vermelha mRFP, fusionada a um fragmento do receptor humano de  $\text{IP}_3$  da isoforma I, sitio de ligação para o  $\text{IP}_3$ , gerado dentro da célula, e três sequências de localização nuclear para direcionar o constructo para o interior do núcleo celular. A figura **B** mostra uma imagem representativa das células A431. No painel superior, lado esquerdo, vê-se a imagem adquirida em contraste de fase destas células, e no lado direito observam-se os núcleos marcados com DAPI. No painel inferior esquerdo observa-se a expressão da proteína monomérica vermelha mostrando quase 100% de infecção das células no campo, e no lado direito, a sobreposição das imagens mostra a correta localização subcelular do constructo dentro do núcleo celular. A figura **C** mostra uma imagem representativa da propagação do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e no núcleo das células A431, após estímulo com EGF  $10\mu\text{M}$ . A figura **D** mostra o gráfico de fluorescência do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  em função do tempo, normalizado pelo baseline, onde se percebe a redução do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo (linha vermelha), comparado ao sinal no citosol (linha azul), nas células infectadas com a construção. A figura **E** mostra o gráfico do percentual do pico de  $\text{Ca}^{2+}$  onde, em comparação ao controle não infectado, o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  foi reduzido nas células infectadas ( $***p<0.0001$ ), enquanto que somente nas células infectadas o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo foi reduzido em comparação com o sinal no citosol ( $**p<0.001$ ), pela construção  $\text{InsP}_3$ -Buffer-NLS. A barra de medida é de  $10\mu\text{m}$ . (N.S = não significativo).

### 5.2.1.2 Curva de proliferação celular

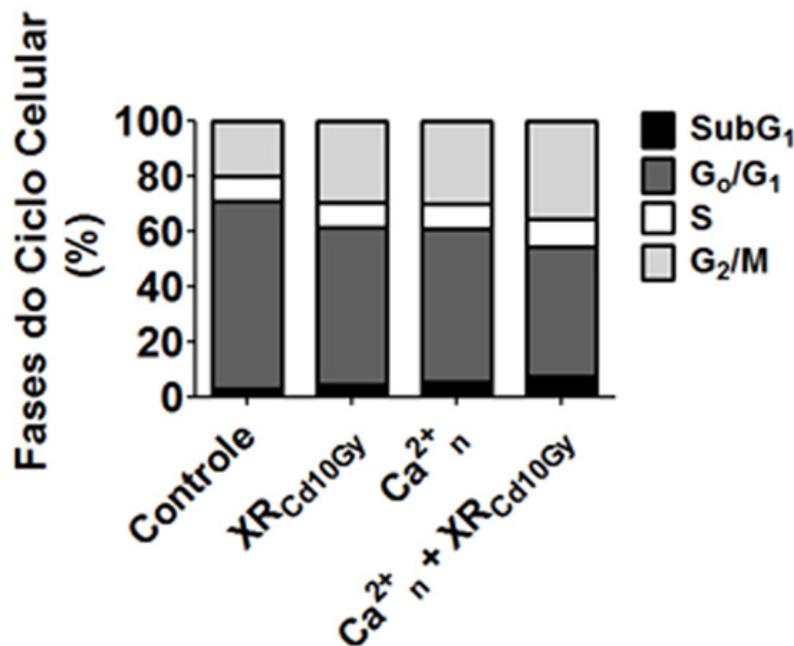
As células foram avaliadas 24h, 48h, 72h e 96h após a infecção, por contagem direta. A proliferação celular nas células A431 foi reduzida significativamente ( $p<0.0001$ ), 50%, em relação ao controle não infectado. A proliferação celular não foi alterada quando fibroblastos gengivais humanos foram infectados nas mesmas condições que as células A431, como observado na figura 7:



**Figura 7 Proliferação celular após tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear.** O gráfico **A** mostra que as células A431 tiveram sua proliferação celular reduzida após tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear ( $\text{Ca}^{2+}_n$ ), quando comparada às células controle não infectadas. O gráfico **B** mostra que o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear não altera a proliferação celular de células não tumorais. N de três experimentos independentes, executados em triplicata e com cálculo de média e erro padrão médio. (\*  $p < 0.0001$ ); (N.S = não significativo)

### **5.2.2 Cinética do ciclo celular após associação entre tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear e radiação X**

O efeito da associação entre o tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear com a radiação X, de acordo com o modelo de irradiação *in vitro* desenvolvido nesta pesquisa, foi estudado. Em células A431 que foram tratadas apenas com radiação X, ou somente com o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, observou-se um aumento significativo ( $p < 0.01$ ) do percentual de células A431 na fase  $G_2/M$  ( $29.6 \pm 2.7\%$ , e  $29.9 \pm 3.4\%$ , respectivamente), mas houve redução do percentual de células na fase  $G_0/G_1$  ( $57.1 \pm 3.6\%$ , e  $55.4 \pm 4.5\%$ , respectivamente), sem mudanças no percentual de células na fase Sub $G_1$  ( $4.3 \pm 2.4\%$ , e  $5.1 \pm 1.7\%$ , respectivamente), comparados com o controle não tratado ( $3.0 \pm 1.5\%$ ,  $p > 0.05$ ). A associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear com a radiação X promoveu um aumento ainda maior no percentual de células na fase  $G_2/M$  ( $35.7 \pm 2.0\%$ ,  $p < 0.001$ ), com um discreto, mas significativo, aumento na morte celular, representada pelo percentual de células na fase Sub $G_1$  ( $7.3 \pm 2.5\%$ ,  $p < 0.05$ ), comparado com controle não tratado, indicando parada de ciclo celular pronunciada antes da mitose na condição de associação terapêutica, representado pela figura 8:



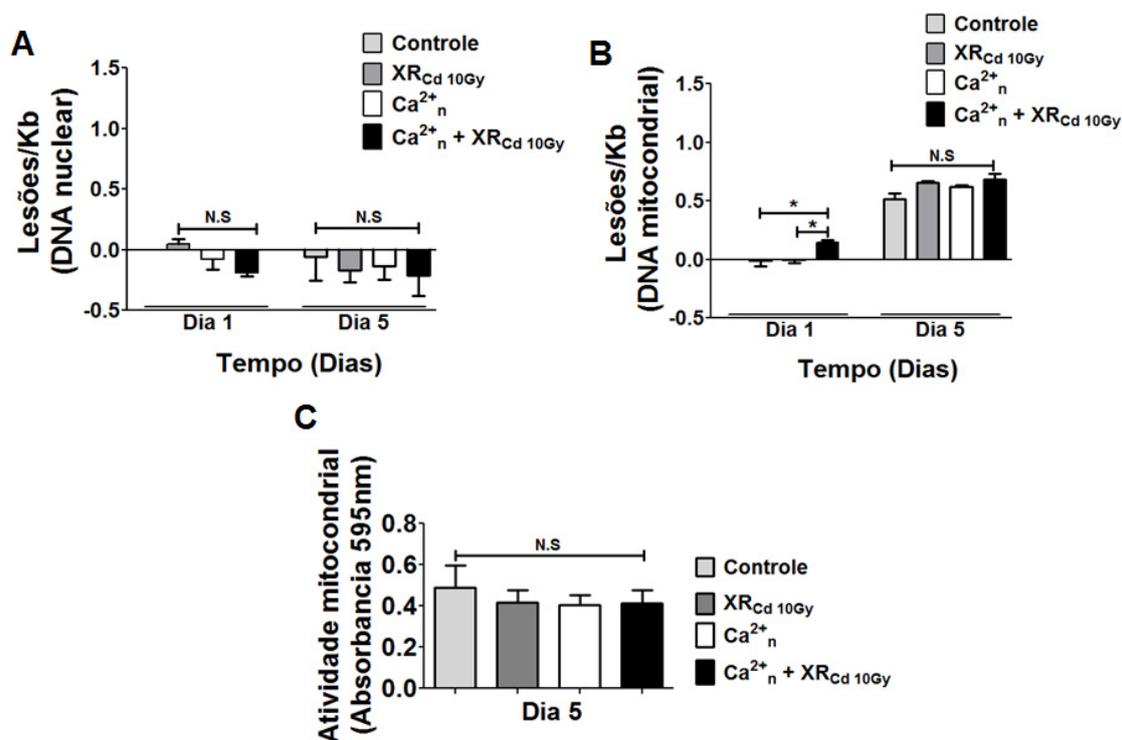
**Figura 8** Cinética do ciclo celular em células A431, tratadas com a associação entre o tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear e radiação X. A análise por citometria de fluxo mostra que não houve diferenças entre as células que foram tratadas somente com o tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>) ou somente com radiação X (XR<sub>Cd10Gy</sub>). A associação entre radiação X e tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR<sub>Cd10Gy</sub>) aumentou o percentual de células na fase G<sub>2</sub>/M, bem como em SubG<sub>1</sub>. Gráfico representativo de três experimentos independentes onde foram calculados média e erro padrão médio.

### 5.3 Investigar os mecanismos desencadeados pela exposição *in vitro* ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear, em carcinoma de células escamosas humanas

#### 5.3.0 O tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear associado com radiação X não promoveu aumento de danos ao DNA das células A431

Baseados no percentual de células na fase G<sub>2</sub>/M, observado no resultado anterior, investigamos se a associação poderia promover o aumento de danos ao DNA, através da quantificação de lesões tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial, por PCR quantitativo. Somente foi observado um pequeno aumento, estatisticamente significativo, de lesão no DNA mitocondrial, no primeiro dia de tratamento ( $1.4 \pm 0.2\%$  *versus*  $0.1 \pm 0.002\%$  no controle não tratado,  $p < 0.05$ ). Contudo, no quinto dia, houve aumento de lesões no DNA mitocondrial, porém, não significativo em relação ao controle não tratado. Não

houve lesões detectáveis no DNA nuclear em nenhuma das condições experimentais. A atividade mitocondrial também não mostrou alterações em nenhuma das condições experimentais, como mostra a figura 9:



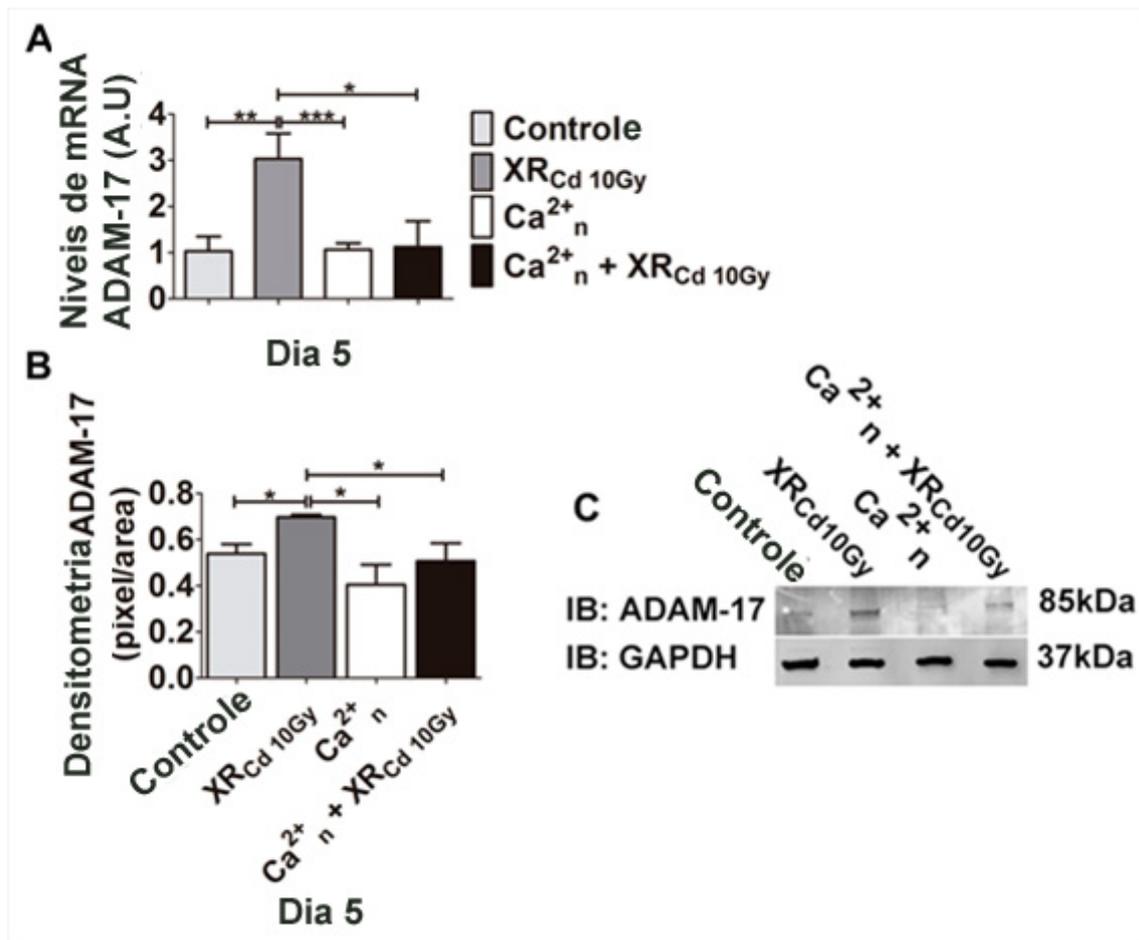
**Figura 9** Quantificação das lesões ao DNA nuclear e mitocondrial de células A431 tratadas com a associação entre tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear e radiação X. O gráfico **A** mostra as lesões por cada 10 kilobases de DNA nuclear. O gráfico **B** mostra as lesões por cada 10 kilobases de DNA mitocondrial, em cada condição experimental, para o primeiro e o quinto dias de irradiação. O gráfico **C** mostra o resultado da atividade mitocondrial, baseado no ensaio de MTT, para o quinto dia de irradiação com dose acumulada em 10Gy. Gráfico representativo de três experimentos independentes onde foram calculados média e erro padrão médio. (\*p<0.05); (N.S = não significativo)

### 5.3.1 Associação entre o tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear e a radiação X previne a superexpressão de ADAM-17 e EGFR, induzidas por radiação ionizante

A família das metaloproteínas ADAM tem sua expressão aumentada quando expostas á radiação ionizante, clivando os ligantes de pro-EGFR e com isso aumenta sua fração solúvel, induzindo maior proliferação celular (135).

### 5.3.1.1 A associação entre o tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear e a radiação X previne a superexpressão de ADAM-17

A radiação X aumentou a expressão de ADAM-17 em nível de RNA mensageiro ( $3.0 \pm 0.5$  AU), comparado ao controle não tratado ( $1.0 \pm 0.3$  AU), porém, o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear não alterou os níveis de expressão de ADAM-17. A associação entre a radiação X e o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear reduziu os níveis de expressão de ADAM-17 ( $1.1 \pm 0.5$  AU) de forma significativa,  $p < 0.05$ . O mesmo efeito foi encontrado em nível de expressão proteica. Os níveis proteicos de ADAM-17 aumentaram após a irradiação ( $0.69 \pm 0.01$  AU). Porém, os níveis reduziram após o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear ( $0.45 \pm 0.1$  AU,  $p < 0.05$ ), bem como a associação também preveniu a superexpressão dessas metaloproteínas após a irradiação com raios X  $0.50 \pm 0.07$  AU,  $p < 0.05$ ), como mostrado na figura 10:

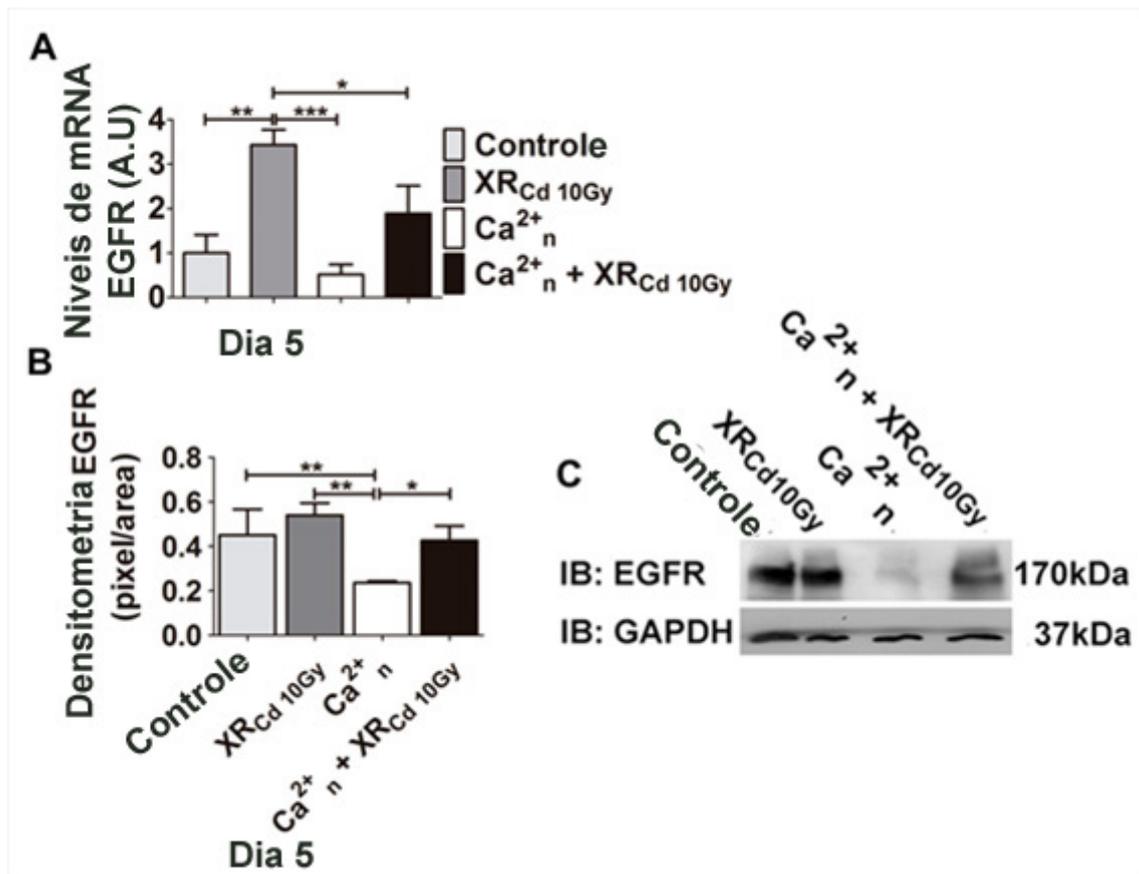


**Figura 10** Níveis de expressão da metaloproteínase ADAM-17. O gráfico **A** mostra os níveis de expressão de RNA mensageiro para a metaloproteínase ADAM-17 em diferentes condições experimentais como irradiação X (XR<sub>Cd</sub>10Gy), tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>) e a associação dos dois (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR<sub>Cd</sub>10Gy). O gráfico **B** mostra análise densitométrica dos níveis

de expressão proteica de ADAM-17 nas diferentes condições experimentais e a figura **C** mostra uma imagem representativa de western blot para ADAM-17 normalizado por GAPDH. N igual a três experimentos independentes onde foram calculados média e erro padrão médio. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### **5.3.1.2 A associação entre o tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear e a radiação X previne a superexpressão de EGFR**

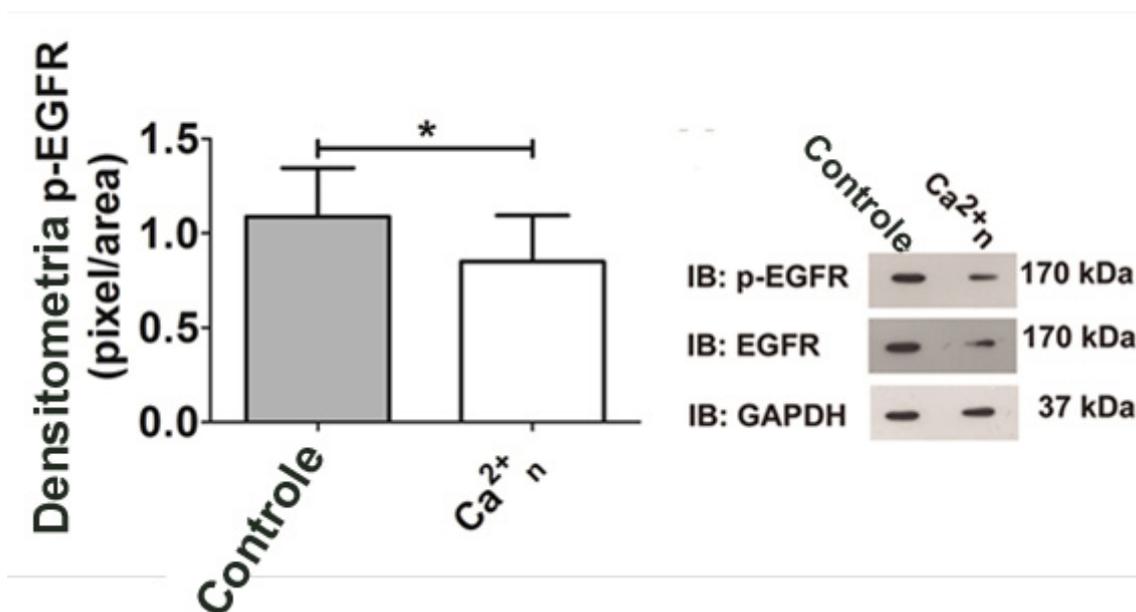
Análises por PCR quantitativo em tempo real mostraram superexpressão dos níveis de expressão de RNA mensageiro para EGFR ( $3.4 \pm 0.3$  AU), comparado ao controle não tratado ( $1.0 \pm 0.4$  AU),  $p < 0.01$ . O tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear reduziu significativamente ( $p < 0.001$ ) os níveis de expressão de EGFR ( $0.5 \pm 0.2$  AU), assim como preveniu a superexpressão de EGFR, induzida pelos raios X, de forma significativa ( $p < 0.05$ ,  $1.8 \pm 0.6$  AU), comparado ao controle não tratado. Em relação aos níveis de expressão proteica não houve aumento após a irradiação, porém, o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear reduziu significativamente os níveis proteicos de EGFR ( $p < 0.01$ ,  $0.23 \pm 0.01$  AU), comparado ao controle não tratado ( $0.45 \pm 0.19$  AU). A associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a irradiação preveniu a superexpressão de EGFR ( $0.42 \pm 0.09$  AU). A figura 11 ilustra os dados acima:



**Figura 11 Níveis de expressão de EGFR.** O gráfico **A** mostra os níveis de expressão de RNA mensageiro para a EGFR em diferentes condições experimentais, como irradiação X (XR<sub>Cd10Gy</sub>), tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>) e a associação dos dois (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR<sub>Cd10Gy</sub>). O gráfico **B** mostra análise densitométrica dos níveis de expressão proteica de EGFR nas diferentes condições experimentais e a figura **C** mostra uma imagem representativa de western blot para EGFR normalizado por GAPDH. N igual a três experimentos independentes onde foram calculados média e erro padrão médio. (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).

### 5.3.2.2 O tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear reduziu a ativação de EGFR

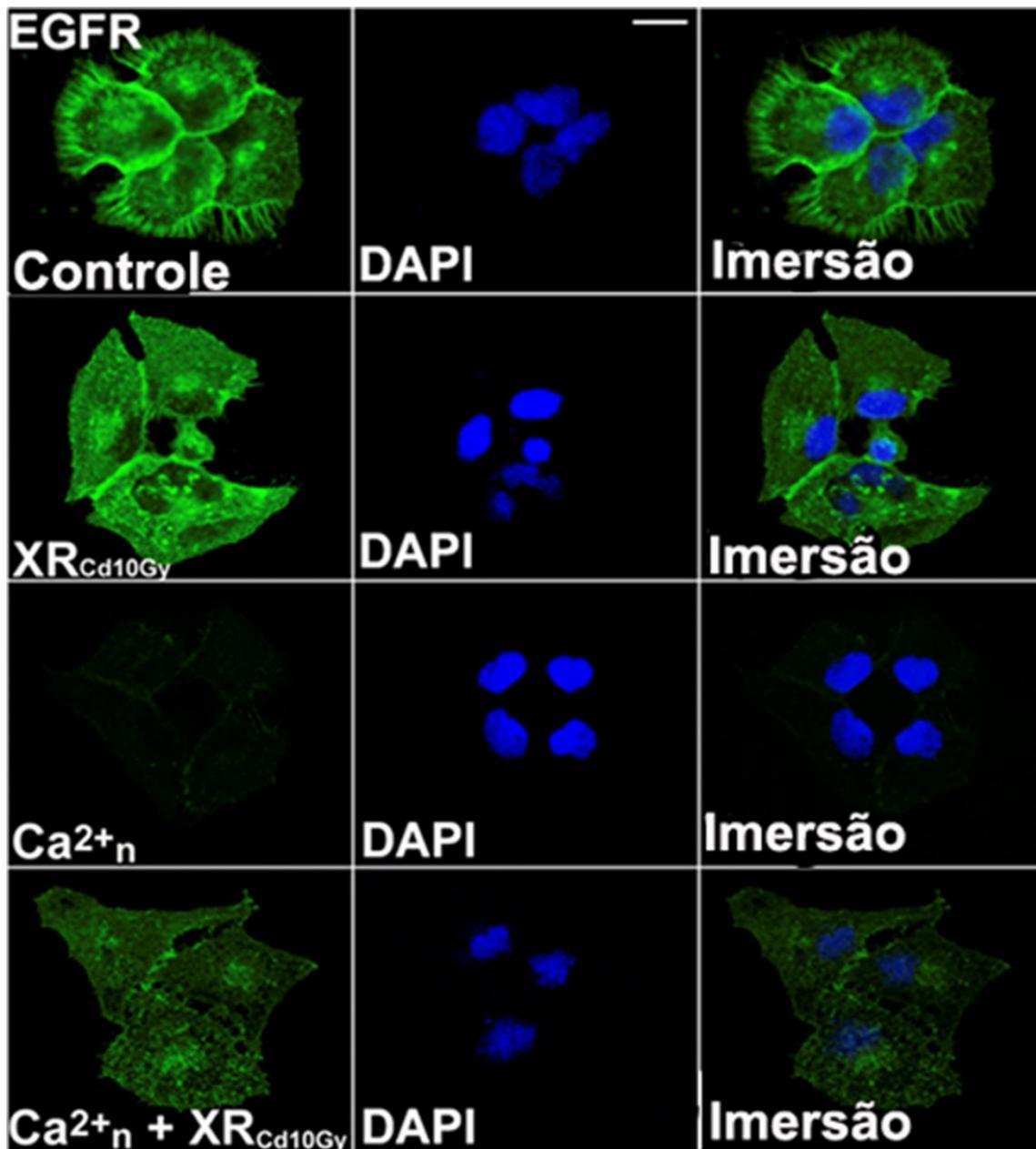
O tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear também reduziu os níveis proteicos de EGFR fosforilado (p<0.05, 0.8 ± 0.18 AU), comparado com o controle não tratado (0.8 ± 0.23 AU), como mostra a figura 12:



**Figura 12 Níveis de ativação de EGFR após tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear.** A figura mostra o gráfico densitométrico para EGFR fosforilado após tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>), à direita, e a esquerda, uma imagem representativa de western blot para EGFR fosforilado normalizado por EGFR total e GAPDH. N igual a três experimentos independentes onde foram calculados média e erro padrão médio. (\*p<0.05)

**5.3.2.3 EGFR foi translocado da membrana plasmática para o interior das células após irradiação e teve sua expressão reduzida após tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear**

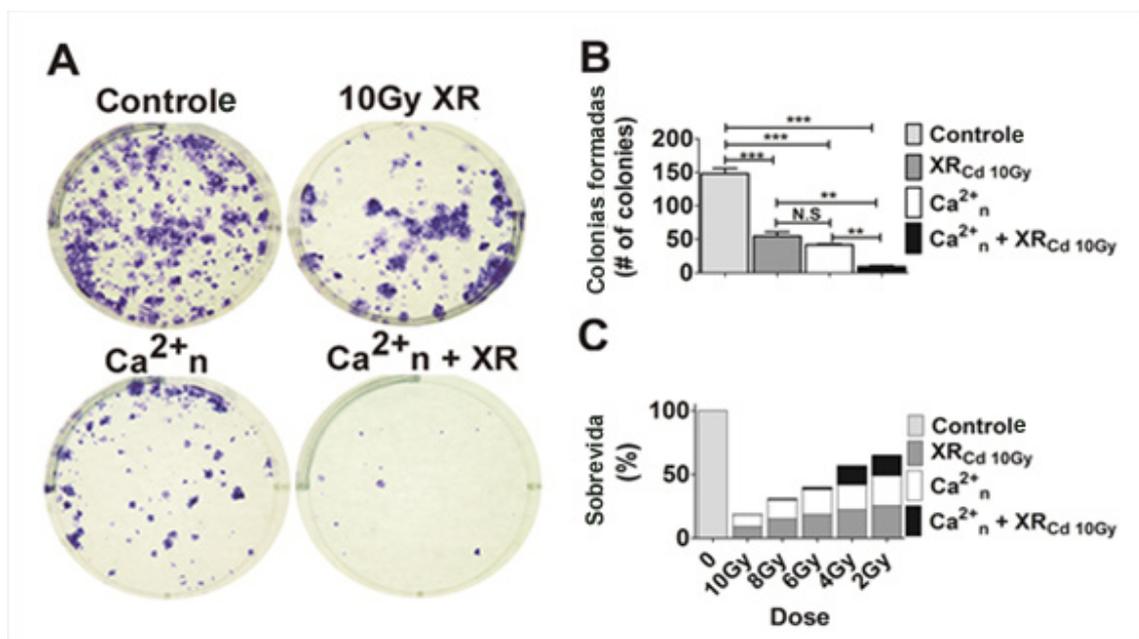
Após exposição á radiação ionizante os receptores de EGF são internalizados para o interior das células, devido á ativação do EGFR (136). O tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear não somente reduziu a expressão do receptor na membrana, como a associação com a radiação X reduziu sua translocação, induzida pela radiação, como mostra a imagem de imunofluorescência na figura 13:



**Figura 13 Translocação do receptor de EGF.** Imunocitoquímica para EGFR: **Alexa 488**, **DAPI**. Na condição controle é possível visualizar o receptor espalhado pela membrana celular. Após irradiação X (XR) o receptor é translocado para o interior das células. O tamponamento de Ca<sup>2+</sup> nuclear (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>) reduziu a expressão do receptor na membrana e a associação com a radiação X (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR) reduziu a translocação do receptor para o interior das células, induzida pela irradiação. Barra relativa ao tamanho do núcleo correspondendo a 10µm. Imagem representativa de três experimentos independentes.

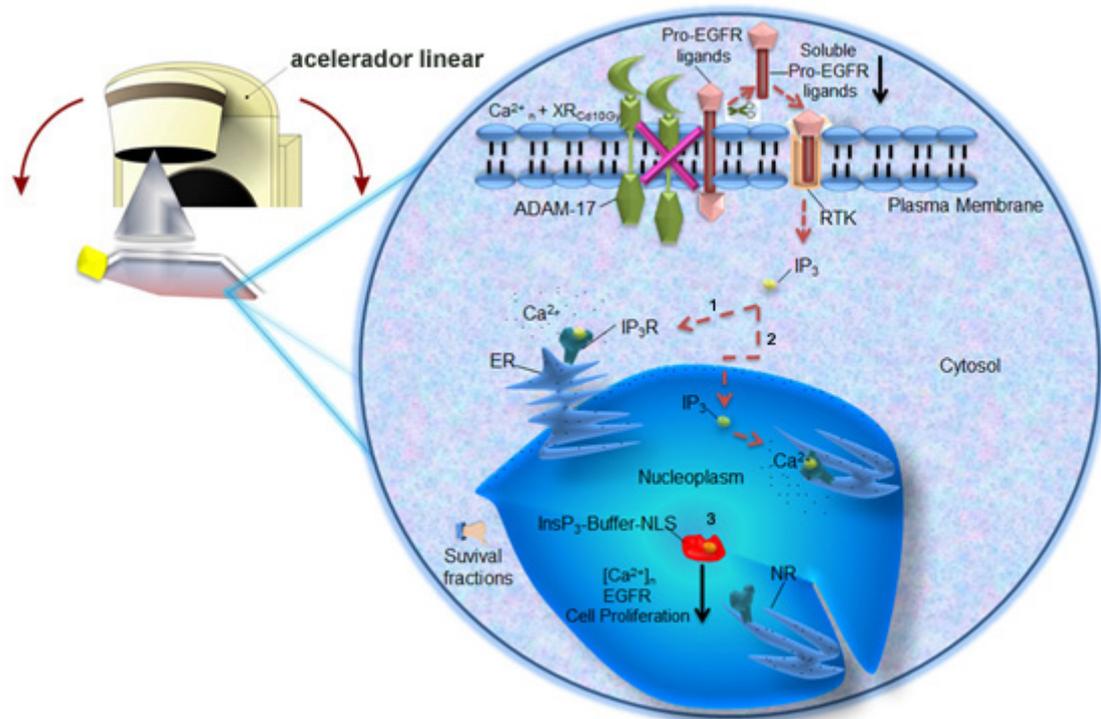
### 5.3.3 Associação entre o tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear e a radiação X reduziu a fração de sobrevivência das células A431, radiosensibilizando o carcinoma de células escamosas

O ensaio clonogênico mostrou uma redução na formação de colônias celulares com o fracionamento de doses ( $\text{XR}_{\text{Cd}10\text{Gy}}$ ) em  $36 \pm 2.5\%$  ( $54 \pm 11$  colônias), juntamente com o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{n}}$ ) que reduziu a formação de colônias em  $28 \pm 2\%$  ( $41 \pm 3$  colônias), comparado com o controle não tratado:  $148 \pm 14$  colônias ( $***p < 0.001$ ). Porém, a associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a radiação X reduziu drasticamente a formação de colônias para  $9 \pm 0.4\%$  ( $9 \pm 2$  colônias), comparado ao controle ( $***p < 0.0001$ ), como mostra a figura 14, painéis A e B. A associação ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{n}} + \text{XR}_{\text{Cd}10\text{Gy}}$ ) conseguiu reduzir a fração de sobrevivência das células A431 com cerca de metade da dose (6Gy) acumulada, como mostra o painel C.



**Figura 14** Fração de sobrevivência das células A431 após associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{n}}$  e a radiação X. O painel A mostra uma imagem representativa da formação de colônias em cada condição experimental. O gráfico B mostra a redução no número de colônias formadas após cada tratamento empregado, em comparação com o controle não tratado. O gráfico C mostra o percentual de fração de sobrevivência relativo às doses aplicadas. ( $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). Dados representativos de três experimentos independentes, com cálculo de média e desvio padrão.

A figura 15 resume os mecanismos encontrados nesta pesquisa:



**Figura 15** Desenho esquemático dos mecanismos envolvidos na associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_n$  e a radiação X em células A431. As setas negras indicam redução e as setas pontilhadas indicam trajetória. A associação entre tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_n$  e a radiação X preveniu a superexpressão de ADAM-17, metaloproteinase que cliva ligantes de EGFR. A redução de expressão de ADAM-17 diminuiu, também, a fração solúvel de pro-EGFR. Após a ligação com seu receptor, o conjunto EGFR é internalizado gerando  $\text{IP}_3$  que se liga ao seu receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) no Reticulo Endoplasmático (ER), no citosol, condição **1** e/ou no seu receptor dentro do Reticulo Nucleoplasmático (NR), no núcleo, condição **2**, liberando  $\text{Ca}^{2+}$ . A construção adenoviral compete com o receptor de  $\text{IP}_3$  no Reticulo Nucleoplasmático, condição **3**, o que impede a ligação do  $\text{IP}_3$  ao  $\text{IP}_3\text{R}$  retendo  $\text{Ca}^{2+}$  na organela e, com isso, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no nucleoplasma diminuiu, reduzindo assim os níveis de expressão de EGFR e a proliferação celular. A associação entre tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}_n$  e a radiação X reduziu a fração de sobrevivência, aplicando cerca de metade da dose de radiação acumulada.

#### **5.4 Estabelecer novas abordagens metodológicas para avaliar os mecanismos desencadeados pela exposição in vitro ao fracionamento diário de radiação X, associado ao tamponamento de $\text{Ca}^{2+}$ nuclear, em carcinoma de células escamosas humanas**

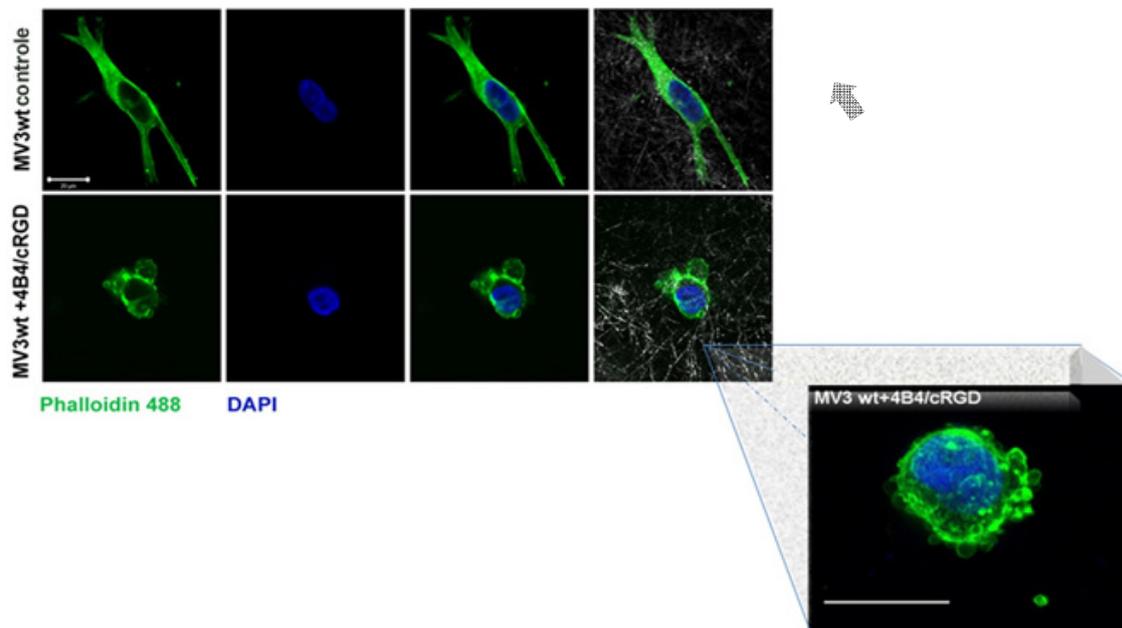
Os resultados obtidos vislumbram novas abordagens para o desdobramento deste estudo, através das metodologias aprendidas no exterior, tanto para o estudo dos efeitos do tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear na migração celular, em melanoma, quanto em carcinoma hepático.

##### **5.4.0 Bloqueadores das subunidades $\beta_1$ e $\alpha\nu\beta_3$ de integrinas alteram a morfologia e a dinâmica das células de melanoma humano da linhagem MV3wt**

Integrinas são uma família de receptores de membrana, com habilidade tanto de sinalização quanto de ancoragem de moléculas de adesão á matriz extracelular participando ativamente da dinâmica celular (137).

##### **5.4.1 O bloqueio das integrinas altera a morfologia das células MV3wt**

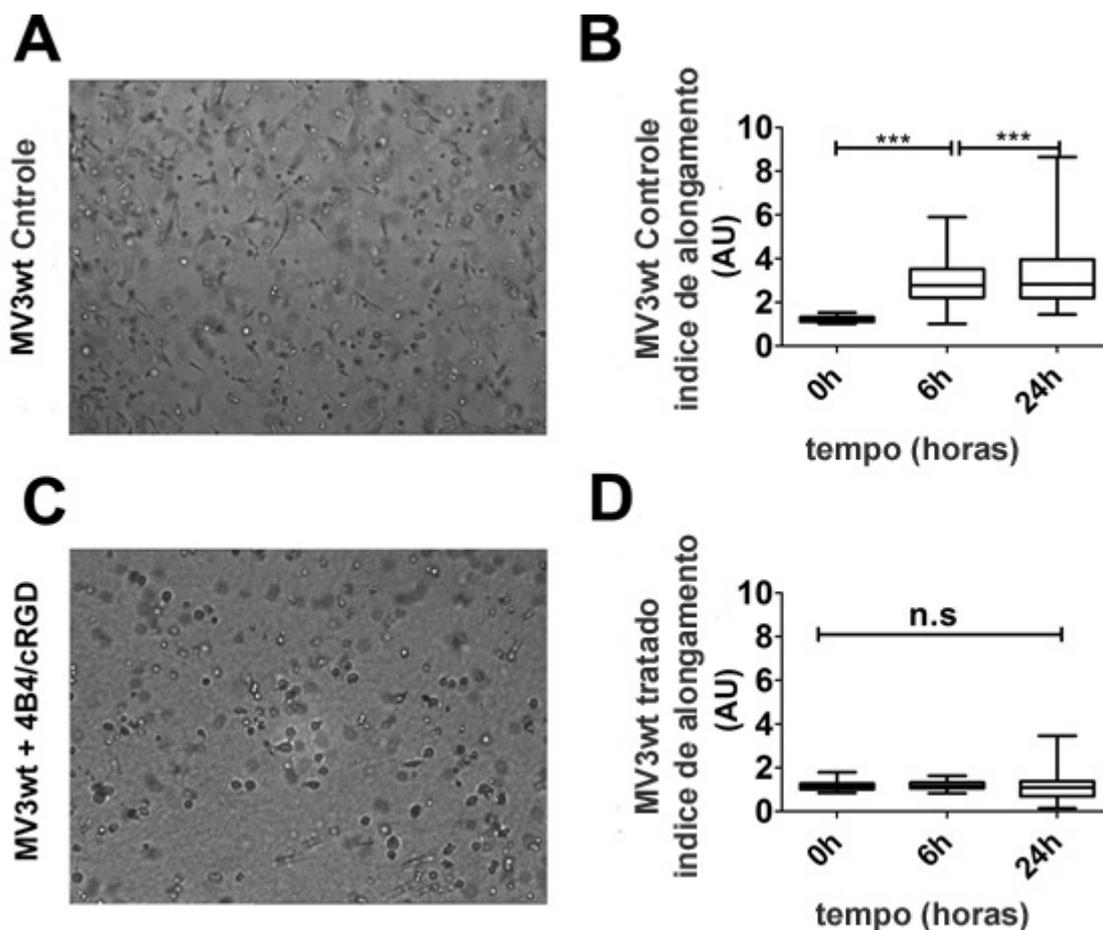
Alguns membros das famílias das integrinas como  $\alpha\nu\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$  e integrina  $\beta_1$  são bem conhecidas por estarem envolvidas em muitos tipos de câncer e, cuja inibição de sua função, tem demonstrado redução na migração celular (138). O bloqueio das subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha\nu\beta_3$ , pelo anticorpo monoclonal 4B4 e o peptídeo cRGD, modificaram a morfologia mesenquimal das células MV3 para uma forma arredondada e com blebs na membrana plasmática, mostrando ausência de polarização e dificultando a migração destas células através da matriz de colágeno, como ilustrado na figura 16:



**Figura 16 Alterações morfológicas oriundas do bloqueio das subunidades de integrinas.** A figura mostra imagem representativa das células MV3wt em cultivo 3D, em matriz de colágeno tipo I, antes e após o tratamento com o anticorpo monoclonal 4B4 e o peptídeo cRGD, que bloqueiam as subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha\beta_3$ , respectivamente. As células MV3wt apresentam morfologia alongada com aspecto mesenquimal, emitindo protrusões citoplasmáticas, polarizando seu movimento pela matriz de colágeno, indicado pela seta branca. O bloqueio das subunidades de integrina altera a morfologia celular para um aspecto mais arredondado e com formação de blebs impedindo o tráfego celular através da matriz, representado pela perda de polaridade. A imagem em detalhe mostra a formação de blebs e a perda do caráter mesenquimal destas células. Barra de escala: 20 $\mu$ m.

#### 5.4.2 O bloqueio das integrinas evita que o alongamento das células MV3wt ocorra

Como consequência da alteração morfológica destas células não houve a formação de protrusões citoplasmáticas para que a migração celular ocorresse através da matriz de colágeno, representado pelo índice de alongamento celular. Nas células tratadas com os bloqueadores de integrina o índice de alongamento celular foi muito menor ( $3.8 \pm 0.6$  AU), quando comparado com o índice do controle não tratado ( $8.5 \pm 1.7$  AU,  $p < 0.001$ ), como mostra a figura 17:

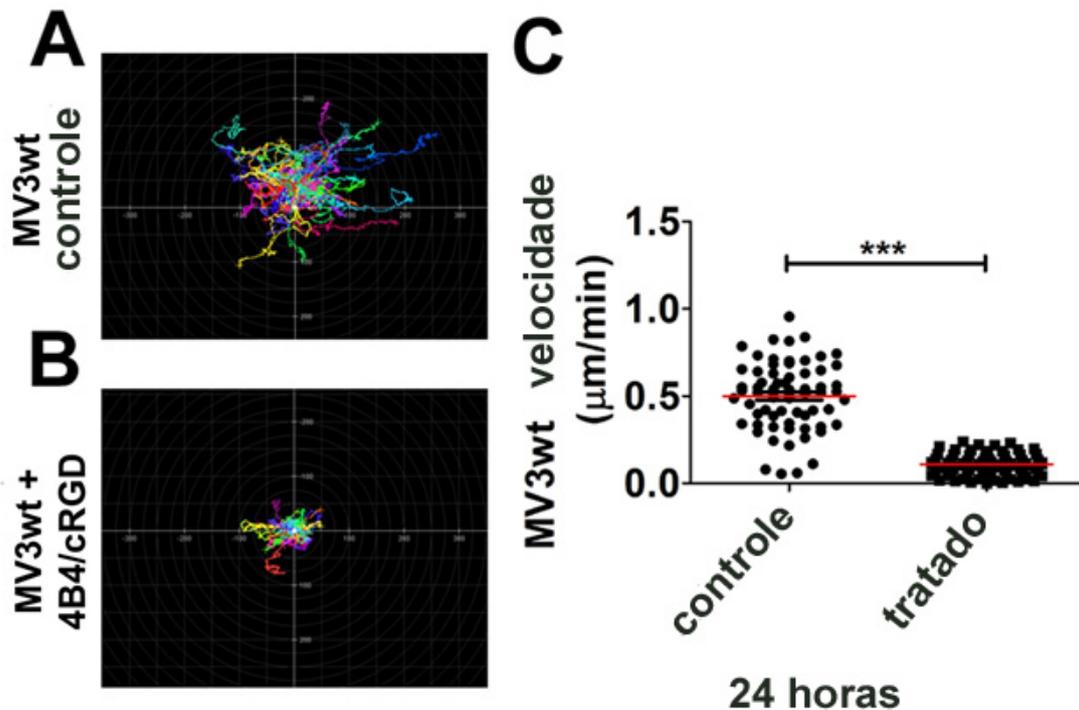


**Figura 17 Índice de alongamento das células MV3wt.** A figura **A** mostra imagem representativa das células MV3wt 24 horas após imersão em meio de cultura 3D, dispersas na matriz de colágeno. A figura **B** mostra aumento do índice de alongamento celular em função do tempo (\*\* $p < 0.001$ ). A figura **C** mostra imagem das células MV3wt, 24 horas após imersão em meio de cultura 3D, dispersas na matriz de colágeno. O bloqueio das integrinas, subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha\beta_3$ , com o anticorpo monoclonal 4B4 e o peptídeo cRGD, mostra que as células MV3wt perderam seu aspecto mesenquimal e a figura **D** mostra que o índice de alongamento celular não teve alteração significativa.. Imagens adquiridas em time lapse, com aumento de 10X. Imagem representativa de três experimentos independentes. (n.s = não significativo).

#### 5.4.3 O bloqueio das integrinas altera a dinâmica e a orientação espacial das células MV3wt

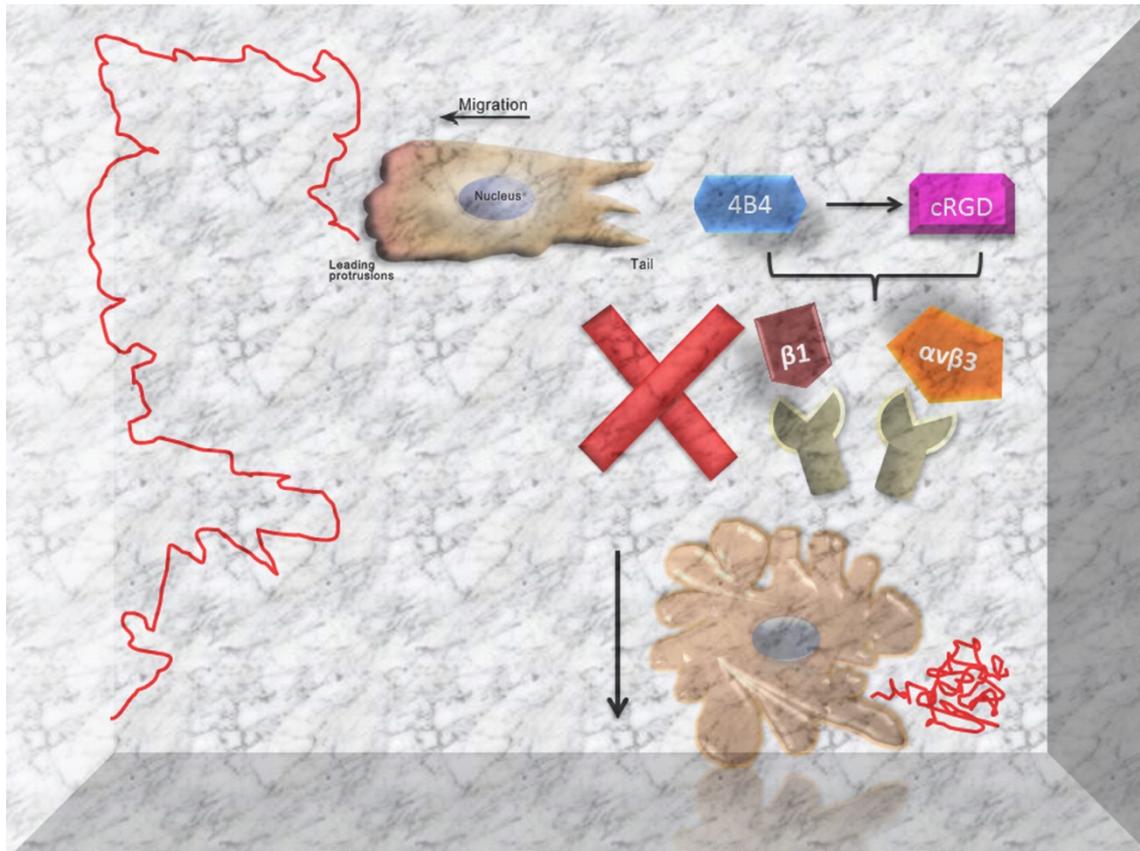
O tráfego de integrinas em células aderentes é importante para a adesão celular dependente de integrinas, bem como espalhamento e migração celular, além de contribuir para a invasão de células tumorais (139) e a velocidade de migração pode determinar um tempo maior ou menor de metastatização tumoral. O bloqueio das subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha\beta_3$  reduziu a média de velocidade de migração das células MV3wt para  $0.1 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{minuto}$  em relação á média

do controle não tratado que foi  $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{minuto}$  ( $p < 0.001$ ). Além disso, os traços de movimento mostram que as células tratadas não foram capazes de percorrer longas distâncias dentro da matriz de colágeno, como ilustrado na figura 18.



**Figura 18 Dinâmica celular dependente de integrinas.** A figura **A** mostra uma imagem representativa da dinâmica celular das células MV3wt em spider graph. Todas as células no campo migram em diferentes direções. A figura **B** mostra as células MV3wt tratadas com bloqueadores das subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha\beta_3$  de integrinas. As células se matem concentradas indicando pouca movimentação através da matriz de colágeno. A figura **C** mostra o cálculo da velocidade média das células MV3wt (linha vermelha) em que o bloqueio das integrinas promoveu a redução da velocidade de migração destas células em função do tempo (\*\* $p < 0.001$ ). N igual a três experimentos independentes.

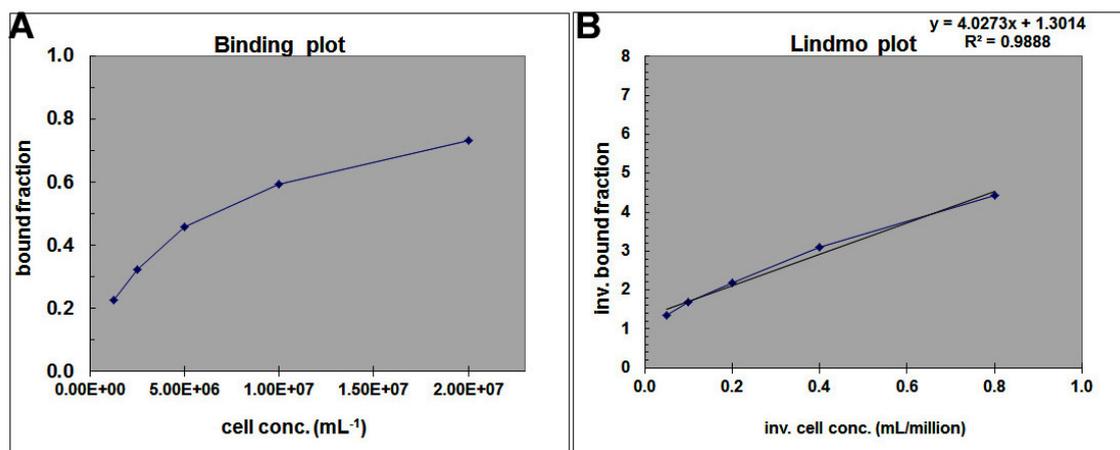
A figura 19 resume os resultados encontrados.



**Figura 19** Desenho esquemático dos efeitos do bloqueio das subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha v\beta_3$  de integrinas nas células MV3wt. As células apresentam uma morfologia mesenquimal emitindo protrusões citoplasmáticas para um determinado padrão de migração. Ao terem as subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha v\beta_3$  de integrinas bloqueadas as células adquirem uma morfologia arredondada e varias blebs, reduzindo a sua capacidade migratória através da matriz extracelular de colágeno. Caminho percorrido pelas células representado pelo traço vermelho.

#### **5.4.4 As células HepG2 apresentam alta ligação do anticorpo monoclonal cetuximab aos receptores de EGF**

Os carcinomas hepatocelulares apresentam resistência a varios quimioterápicos, devido a ativação da cascata de sinalização da vias de tirosina cinase, através dos fatores de crescimento epidérmicos (140) e o bloqueio de EGFR por cetuximab pode controlar o crescimento deste tipo de carcinoma (141). O ensaio de imunorreatividade mostra a alta afinidade (76,8%) especifica das células de hepatocarcinoma humano HepG2 ao anticorpo monoclonal cetuximab, mostrando que este modelo pode ser usado em conjugação com outros alvos para o bloqueio de EGFR no tratamento de tumor hepático, como mostrado na figura 20.



**C**

| cell conc.<br>(cells/mL) | inv. cell conc.<br>(mL/million) | total<br>cpm | bound<br>cpm | nonspec.<br>cpm | bound/total | total/bnd |
|--------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|-----------------|-------------|-----------|
| 2.00E+07                 | 0.1                             | 102925       | 77854        | 2396            | 0.73        | 1.36      |
| 1.00E+07                 | 0.1                             | 104899       | 64658        | 2396            | 0.59        | 1.68      |
| 5.00E+06                 | 0.2                             | 106454       | 51214        | 2396            | 0.46        | 2.18      |
| 2.50E+06                 | 0.4                             | 100975       | 35015        | 2396            | 0.32        | 3.10      |
| 1.25E+06                 | 0.8                             | 94634        | 23785        | 2396            | 0.23        | 4.42      |

| Data binding plot        |             | Data Lindmo plot                |           |
|--------------------------|-------------|---------------------------------|-----------|
| cell conc.<br>(cells/mL) | bound/total | inv. cell conc.<br>(mL/million) | total/bnd |
| 2.00E+07                 | 0.73        | 0.1                             | 1.36      |
| 1.00E+07                 | 0.59        | 0.1                             | 1.68      |
| 5.00E+06                 | 0.46        | 0.2                             | 2.18      |
| 2.50E+06                 | 0.32        | 0.4                             | 3.10      |
| 1.25E+06                 | 0.23        | 0.8                             | 4.42      |

|           |       |
|-----------|-------|
| Intercept | 1.301 |
| IRF       | 76.8% |

**Figura 20** Ligação de cetuximab radiomarcado com  $\text{In}^{111}$ . A figura **A** mostra o gráfico de fração de ligação específica do anticorpo monoclonal cetexumab, radiomarcado com  $\text{In}^{111}$ , às células HepG2, como uma função do aumento da concentração celular. A figura **B** mostra fração de ligação específica como função do inverso da concentração dos mesmos dados plotados em A. A figura **C** mostra o percentual da fração de imunorreatividade (IRF) das células HepG2 mostrando uma eficiência de ligação de quase 80%.

## **6 Discussão**

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e no tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, nas últimas décadas, há poucas evidências de aumento na sobrevida dos pacientes em cinco anos (142;143). A radioterapia oferece excelentes resultados no controle de tumores de cabeça e pescoço, quando a doença é descoberta em estágios iniciais, todavia, essa não é a realidade da maioria dos pacientes que chegam à atenção de média e alta complexidade, apresentando tumores em estágio avançado. O diagnóstico tardio de HNSCC faz com que o prognóstico seja pior, diminuindo as chances de sobrevida global.

Além de medidas que aumentem os investimentos em políticas públicas de prevenção dos tumores do trato aerodigestivo superior, pelo Ministério da Saúde, o intervalo entre a suspeita diagnóstica e o acesso a especialistas e aos serviços deveriam ser drasticamente reduzidos. Na França, assim como no Brasil, o acesso adequado a serviços de saúde tem um papel crucial no estágio precoce ou tardio dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço no momento do diagnóstico (144).

Os custos arcados pelo SUS com o tratamento de tumores envolvendo hospitalização, radioterapia, quimioterapia, bem como o tratamento de comorbidades associadas já são conhecidos (145). Além dos benefícios sociais que políticas bem conduzidas de prevenção e combate ao tabagismo poderiam promover, atacando de frente o principal agente etiológico do carcinoma de células escamosas, e, por conseguinte, reduzindo a casuística destes tumores, bem como programas que auxiliassem os pacientes tabagistas crônicos a abandonarem o cigarro após o tratamento (146), os recursos financeiros destinados a cobrir custos com o tratamento poderiam ser alocados para atender outras necessidades, como por exemplo, reabilitação integral dos pacientes após o tratamento e melhor suporte para ganho de qualidade de vida.

Embora seja o tratamento padrão, a radioterapia ainda está associada a diversas reações adversas, que afetam de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes (147). A radiação reduz o potencial de vascularização dos tecidos e aumenta a hipóxia local, colocando em risco a atividade celular e a formação de colágeno, degenerando a estrutura óssea maxilo-mandibular (7).

As sequelas orais resultantes podem causar problemas substanciais durante e depois da terapia de radiação e são os maiores fatores de determinação na qualidade de vida dos pacientes. Dentre as complicações da radioterapia estão a xerostomia, osteorradionecrose, mucosite e candidose (148).

Não somente ocorre um comprometimento estético, mas também, perda de funções essenciais como deglutição e fala, levando a dificuldades de ingestão, debilitando o sistema imunológico, além do impacto psicológico (149) e em alguns casos, dificuldades de ressocialização, o que demanda atenção multiprofissional durante o processo de reabilitação do paciente pós-tratamento. O cenário atual compele á busca por novas estratégias que ao mesmo tempo aumentem a eficiência terapêutica existente e, também, contribuam para a redução dos efeitos colaterais e sequelas decorrentes dos tratamentos em vigor.

Os estudos *in vitro* são o passo inicial na busca de novas alternativas para terapias futuras. Efeitos biológicos das radiações ionizantes podem ser descritos através de várias técnicas como ensaios bioquímicos e biologia molecular, inclusive a verificação de radiorresistência e radiosensibilidade de células tumorais humanas em cultivo (5), porém, novos modelos capazes de reproduzir condições clínicas são necessários para estudos radiobiológicos, aproximando a bancada do leito (150) e nesta pesquisa conseguimos desenvolver um modelo de irradiação *in vitro* seguindo procedimentos usuais da clinica radioterápica, através de planejamento baseado em imagem de tomografia computadorizada, com definição de campos de irradiação e delimitação das curvas de isodose. Os resultados obtidos da prova de conceito do modelo, através das medidas de irradiação sobre as células, e, também, no fantoma, através da dosimetria, mostram que as células receberam a dose de radiação X prescrita homogeneamente, de forma que as respostas biológicas, apesar da heterogeneidade clonal, especialmente porque, como acontece em situações clínicas, as células tumorais se encontram em fases não sincronizadas de ciclo celular, não se deveram a falta de uniformidade de dose.

O efeito bystander é uma mudança de resposta aos danos provocados pela radiação através da comunicação entre células que receberam doses menores de irradiação e as que receberam doses mais altas ou não foram irradiadas. Esta comunicação ocorre pelas junções tipo gap ou pela liberação

de fatores solúveis para o meio, constituindo o seu principal mecanismo (151). O efeito bystander induzido por radiação (EBIR) já foi demonstrado em vários sistemas experimentais tanto *in vitro* quanto *in vivo* (152), gerando efeitos secundários que alteram a resposta celular aos danos induzidos pela radiação. Tais efeitos são difíceis de serem preditos convencionalmente, sendo a proteômica uma possível estratégia para o estudo destes efeitos (153). Neste aspecto, o sistema de irradiação *in vitro* desenvolvido nesta pesquisa elimina este viés, pois os resultados mostram que houve apenas uma variabilidade de  $\pm 2\%$  de dose aplicada sobre as células A431.

Estudos mostram que quando o meio de cultivo celular de células irradiadas foi transferido para células não irradiadas, o efeito bystander foi observado (151;152), o que não aconteceu nestas células, desta pesquisa, posto que o meio de cultivo celular não foi trocado durante as sessões de irradiação, mostrando mais uma vez que, o sistema de irradiação *in vitro* desta pesquisa, preveniu o efeito bystander, mostrando-se uma excelente estratégia para o estudo dos efeitos primários da radiação ionizante sobre células em cultivo, quais sejam os danos diretos ao DNA e/ou produção de espécies reativas de oxigênio.

Os efeitos das radiações ionizantes sobre o ciclo celular mostram que as células não irradiadas são distribuídas, predominantemente na fase G<sub>1</sub>, enquanto células irradiadas se apresentam majoritariamente distribuídas na fase G<sub>2</sub> (133), efeito também observado nesta pesquisa quando investigamos o impacto do fracionamento de dose sobre células A431, comparado à aplicação de dose única sobre as mesmas células.

Curiosamente, o percentual de células na fase SubG<sub>1</sub>, indicativo de morte celular, foi maior nas células que receberam dose única. Entretanto, não o suficiente para eliminá-las completamente. O percentual menor de células na fase SubG<sub>1</sub>, encontrado na condição de fracionamento de doses, mostra, claramente, a capacidade de recuperação destas células demonstrando que a resposta biológica, frente à radiação ionizante, depende do esquema de dose aplicado. Esse resultado pode explicar, em parte, como células tumorais que escapam da morte induzida por radiação X, iniciam um tumor recorrente em pacientes com carcinoma de células escamosas, tornando-os ainda mais radorresistentes, já que o tratamento clínico é baseado em fracionamento

diário de doses. Mais uma vez, esse resultado mostra que o modelo de irradiação desenvolvido nesta pesquisa é o mais adequado para a investigação de radiorresistência em tumores humanos, bem como sua recorrência após o tratamento radioterápico.

O  $IP_3$  é uma molécula hidrossolúvel pequena que atua como mediador intracelular que, ao ser gerado, difunde-se pelo citoplasma ou nucleoplasma e se liga aos canais de liberação de  $Ca^{2+}$  dependentes de  $IP_3$ , também chamados de receptores de  $IP_3$ , liberando  $Ca^{2+}$ . A construção adenoviral utilizada neste estudo é capaz de competir seletivamente com os receptores endógenos de  $IP_3$ , impedindo a ligação deste ao seu receptor dentro do núcleo e, com isso, o  $Ca^{2+}$  estocado no retículo nucleoplasmático não é liberado para o nucleoplasma.

A regulação de  $Ca^{2+}$  nuclear é um importante mecanismo de sinalização para o controle da proliferação celular, tanto em células normais quanto em células tumorais (111). Estudos prévios demonstraram que a redução da concentração de  $Ca^{2+}$  livre no nucleoplasma reduziu de forma significativa a proliferação em células de carcinoma hepático (130), efeito também observado nesta pesquisa para o carcinoma de células escamosas. Interessante observar que a proliferação celular diminuiu apenas nas células tumorais, pois, sob as mesmas condições experimentais, células de fibroblasto de gengiva humana não sofreram alteração de proliferação face à redução das concentrações de  $Ca^{2+}$  livre no nucleoplasma, indicando maior susceptibilidade das células tumorais às variações de concentração de  $Ca^{2+}$  no núcleo. Como o aumento nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  culmina com a ativação de diferentes fatores de transcrição, incluindo aqueles ligados à proliferação celular (154;155) e células tumorais proliferam mais rápido, os níveis de  $Ca^{2+}$  livre no nucleoplasma são críticos para a modulação destes fatores de transcrição ligados à proliferação, cuja manutenção da capacidade proliferativa destas células fica prejudicada frente ao decréscimo da concentração de  $Ca^{2+}$  no núcleo; o que torna o  $Ca^{2+}$  nuclear um atraente alvo terapêutico, visto que o efeito benéfico de sua redução em células tumorais não afeta a proliferação de células normais.

Seguindo esta linha estudamos a possibilidade de usar o tamponamento de  $Ca^{2+}$  nuclear como adjuvante à radioterapia, associando-o com radiação X

fracionada. Quando a cinética do ciclo celular foi investigada observamos que tanto o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear sozinho, quanto a irradiação sozinha, produziram o mesmo efeito, porém, a associação entre ambos aumentou o percentual de células na fase  $\text{SubG}_1$  que, apesar de ter sido discreto, foi significativo em relação ao controle não tratado. Além disso, o percentual de células em  $\text{G}_2/\text{M}$  foi maior comparado tanto ao controle não tratado, quando com as outras condições experimentais, indicando que a associação promoveu uma estagnação das células nesta fase, impedindo-as de concluir a mitose, o que pode explicar em parte, sua proliferação reduzida.

Se a dose de irradiação for alta o suficiente para induzir parada de ciclo, as células irão parar na fase  $\text{G}_2/\text{M}$  quando os mecanismos de checagem Chk2 promovem, então, atraso na mitose, ganhando mais tempo para o reparo de lesões remanescentes (156;157). Porém, quando avaliamos o efeito da associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a radiação X sobre as lesões ao DNA, verificamos que não houve aumento de lesões nem no DNA nuclear, nem no DNA mitocondrial, e nem mesmo a atividade mitocondrial sofreu alteração, de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio de MTT. Já é sabido que células tumorais de cabeça e pescoço produzem muito mais “scavengers” para neutralizar os radicais livres, induzidos por radiação ionizante, que células não tumorais, utilizando estes “scavengers” como um mecanismo protetor ao seu DNA (158), o que explica a razão de termos encontrado um nível de lesão tão baixo. Além disso, estudos mostram que a radiação ionizante ativa uma resposta antioxidante adaptativa via fator de transcrição Nrf2, tornando as células tumorais mais radorresistentes (159), o que também pode explicar os resultados aqui encontrados.

Exposição às radiações ionizantes aumenta a expressão da metaloproteinase ADAM-17 que, por sua vez, ativa a via Akt/ciclina D1, aumentando a expressão de EGFR e, com isso, aumenta, também, a proliferação celular (160). Neste estudo os resultados também mostram um aumento de expressão de ADAM-17 nas células A431 nos níveis moleculares e proteico, efeito esse que foi prevenido pela associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a radiação X, para níveis bem próximos dos níveis do controle não irradiado e, como esta via de superexpressão de ADAM-17 está intimamente ligada ao aumento de expressão de EGFR, os níveis de

expressão de EGFR também foram modificados com a associação, mostrando, que da mesma forma que a radiação X aumentou a expressão de EGFR, a associação foi capaz de preveni-la.

Além disso, o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear reduziu a expressão tanto do RNA mensageiro quanto proteica do EGFR. Do mesmo modo, a redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no nucleoplasma não somente reduziu a ativação de EGFR, mas também a translocação dele da membrana para o interior das células, fatores que em conjunto contribuíram para que a proliferação celular fosse reduzida.

Não apenas a proliferação celular e os níveis de expressão do receptor de EGF foram alterados pelo tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, posto que efeitos de longo prazo também foram observados neste estudo. O efeito precoce ou tardio do fracionamento de doses e o tempo de resposta celular podem estar relacionados aos mecanismos de reparo do DNA. O reparo incompleto leva as células à perda de sua capacidade mitogênica e, conseqüentemente, menor quantidade de células sobrevivem (99).

De fato, observarmos que o modelo de irradiação desenvolvido nesta pesquisa reduziu a formação de colônias de forma significativa, quando comparada ao controle não tratado. O tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear por si só também foi capaz de reduzir a formação de colônias, na mesma proporção em que a radiação X e, por causa de sua capacidade de interferir com a expressão de fatores de transcrição, ligados à proliferação celular (126), a mitogenicidade também foi reduzida nesta condição. Porém, a associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a radiação X foi capaz de reduzir a formação de colônias e, por conseguinte, a fração de sobrevivência das células A431 em 90%, muito mais do que nas demais condições experimentais, com aproximadamente metade do tratamento, ou seja, utilizando menor dose acumulada sobre as células tumorais, mostrando que o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear pode funcionar como um adjuvante à radioterapia. Além da potencial adjuvância, a perspectiva de tratamento efetivo em um tempo menor não somente reduziria as sequelas e complicações do tratamento como, também, abriria a possibilidade de diminuição do tempo de espera de pacientes para a radioterapia.

Os efeitos em nível celular das terapias convencionais, no tratamento do câncer, não se restringem, somente, ao núcleo das células em si, envolve, também, efeitos sobre proteínas de membrana; dentre elas a família das integrinas. Integrinas  $\beta_1$  exercem importantes papéis na biologia celular tais como proliferação, migração e apoptose, porém, altos níveis de ativação das integrinas  $\alpha\beta_3$  e  $\beta_1$  estão correlacionados com invasão tumoral em melanoma metastático humano (161), sugerindo a forma ativada da integrina  $\beta_1$  como um biomarcador de células de alta invasividade em melanomas (162). Os resultados mostraram que por se tratar de uma proteína transmembrana, as integrinas são susceptíveis de serem bloqueadas e que estes efeitos não somente podem inibir interações mecânicas com o meio extracelular, reduzindo a velocidade de migração, como também, a morfologia, perdendo seu fenótipo mesenquimal, muito provavelmente, alterando a conformação de outras proteínas de membrana.

Em se tratando de estudos relacionados à busca de novas estratégias para o tratamento do câncer, não somente a redução da proliferação celular é importante, mas também, migração e invasão celulares, pois, é muito difícil, se não impossível, ainda, a detecção de micrometástases. Estudos envolvendo cultivo em três dimensões são uma ferramenta bastante útil no entendimento das interações celulares com o meio e, também, como estas interações favorecem a metastatização, especialmente utilizando o modelo de irradiação *in vitro* desenvolvido aqui, pois migração tumoral após irradiação já foi observada, devido ao aumento da expressão das integrinas  $\alpha_3$  e  $\beta_1$  induzidas por radiação X, cujo efeito foi revertido com o uso de anticorpos bloqueadores de  $\alpha_3\beta_1$  (138).

Já é sabido que a superexpressão de Cálcio Calmodulina (CaM), é responsável por aumento da motilidade celular (163) e que a inibição farmacológica de  $Ca^{2+}$  altera a via de sinalização de integrinas em células de melanoma da linhagem VM, além de modificar a morfologia mesenquimatóide para arredondada, pela inibição das fibras de actina, impedindo a migração (164). As integrinas  $\alpha\beta_3$  são fundamentais para a angiogênese e invasão, mediando adesão celular para a matriz e crosstalk com RTK's. A ativação delas pode iniciar uma via de sinalização dependente de  $Ca^{2+}$ , levando ao aumento da mobilidade endotelial. Nesta perspectiva, o estudo aprofundado

dos mecanismos envolvendo tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  na migração e invasividade de melanoma, especialmente os subtipos mais agressivos, desponta como uma nova abordagem em estudos futuros, utilizando metodologias que envolvam dinâmica celular.

Os primeiros estudos do grupo relacionando tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear com proliferação foram desenvolvidos em linhagens de hepatocarcinoma humano, onde foi demonstrado que o  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo é essencial para a proliferação (130). Os resultados de imunoreatividade abrem uma nova perspectiva para o estudo não somente do efeito sinérgico do tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, associado ao anticorpo monoclonal cetuximab, no bloqueio dos receptores de EGF, em linhagens de hepatocarcinoma humano, como também, o monitoramento deste efeito *in vivo*, posto que tumores xenográficos radiomarcados possam ser visualizados por microSPECT. Tomados em conjunto, estes resultados preliminares abrem novas perspectivas para futuros pesquisas do grupo, envolvendo terapia gênica, no controle da migração celular.

### **6.1 O que vem pela frente: tendências e desafios para o melhoramento das terapias contra o câncer**

Câncer em países emergentes constitui um problema de saúde que demanda estratégias urgentes, por alcançar críticas proporções, pois se estima que em 2020 mais de 60% de todos os cânceres serão diagnosticados nestes países (165) e com isso, vários grupos de pesquisa em todo o mundo vêm trabalhando arduamente para melhorar as terapias já existentes.

O tratamento racional e personalizado do câncer que, seguramente, pode oferecer as melhores oportunidades de cura é o 'Santo Graal' buscado pelos pesquisadores e em especial aos que se dedicam às pesquisas em biologia celular, que se valendo dos conhecimentos acumulados, especialmente em transdução de sinal, contribuem para o desenvolvimento de estratégias alvo dirigidas para estas vias, na expectativa de bloquear muitas delas, que são passos chaves para a progressão tumoral. Ciclinas dependentes de cinases (CDK) fosforilam intermediários importantes que regulam o ciclo celular e são, frequentemente, superexpressadas em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Drogas antiproliferativas, que atuam como inibidoras destas

ciclinas, já estão em ensaios clínicos de fase I como o Flavopiridol e o Ci-799 (12).

Antagonistas específicos podem ser desenvolvidos baseando-se no conhecimento das interações entre ligantes e seus receptores, usando, como estratégias, anticorpos monoclonais que neutralizem e/ou interfiram com a atividade dos fatores de crescimento. O aumento da compreensão sobre a transdução de sinal envolvendo fatores de crescimento e angiogênicos tem levado ao desenvolvimento de inibidores moleculares, incluindo os receptores de tirosina cinase e seus efetores downstream (66). Por exemplo, a via PI3K/Akt é importante modulador da resistência das células A431 ao anticorpo monoclonal matuzumab (166), ressaltando a necessidade da aplicação de inibidores de PI3K como adjuvantes em tumores com essas características moleculares. Há estudos demonstrando que a droga TIC10 (TRAIL-inducing compound 10) aumenta a expressão de TRAIL promovendo a desfosforilação e inativação de Akt e ERK via *foxo3a*, levando à morte tumoral por apoptose, sugerindo uma terapia anticâncer baseada na regulação de TRAIL (167).

Já foi observado que ao menos seis ligantes distintos, relacionados ao EGF, incluindo o próprio EGF se ligam e ativam EGFR, mostrando que sua presença, mesmo em carcinomas onde ele não é superexpressado, pode emitir sinais oncogênicos críticos, pela ação ativa de sinalização autócrina ou parácrina, dirigidas pela presença de um ou mais dos seus ligantes (58). Sendo o EGFR um alvo terapêutico para diversos tipos de câncer, pequenas moléculas inibidoras dos receptores de tirosina cinase figuram como uma promissora alternativa para os casos de mutações deste gene, cuja resistência aos anticorpos monoclonais já tenha sido detectada (168), assim como a coadministração de RGD e da proteína viral JO-1, que promoveram maior penetração no tecido tumoral, aumentando a eficiência dos anticorpos monoclonais trastuzumab e cetuximab, em modelo animal, além da fusão do peptídeo alvo neurofilina, que já se mostrou eficaz no melhoramento do efeito antitumoral destes anticorpos (169).

Existe uma tendência ao uso de estadiamento baseado em perfis moleculares que permitam avaliar, individualmente, componentes genéticos que favoreçam a proliferação celular frente à radiação ionizante, para garantir o desenvolvimento de uma radioterapia mais inteligente (170). Em alguns casos

de radiorresistência, a inibição das vias PI3K-Akt-mTOR e histona deacetilase aumentam os efeitos citotóxicos da radioterapia (171) e, seguindo esta tendência, os nossos resultados indicam que associação entre o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e a radiação X também contribui para o desenvolvimento de uma radioterapia mais racional.

Em se tratando dos tumores de cabeça e pescoço, os perfis moleculares já conhecidos revelam um direcionamento racional para a seleção de modelos pré-clínicos (172). Inibidores de EGFR vêm sendo aprovados para tratamento clínico (173), como o anticorpo monoclonal cetuximab, que foi autorizado como terapia concomitante com a radioterapia em pacientes com doença localmente avançada ou como monoterapia nos casos de tumor recorrente após tratamento com compostos platinados (174) e o bevacizumab, também em concomitância com quimio e radioterapia, está em estudo de fase III (175). Entretanto, resistência intrínseca e/ou adquirida á terapia com anticorpos monoclonais, como trastuzumab e cetuximab já foi observada (176;177), o que evidencia o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear como uma promissora estratégia terapêutica na redução da expressão destes receptores de EGF em tumores do trato aerodigestivo superior, bem como os receptores da via  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina, regulando o eixo de sinalização ErbB/Grb7, aparecem como alvos potenciais para a terapia contra do câncer (178).

Outras vertentes apostam na terapia gênica como uma possibilidade real para alterar fenótipos malignos, tratando e modificando o crescimento celular, invasividade ou metastatização (99), bem como carreador de genes que estimulem uma resposta imune celular, como interleucinas, molécula co-estimuladoras ou antígenos tumorais contra estas células cancerosas, tendo como destaque os vetores adenovirais, que somam mais de 60% dos protocolos clínicos de terapia gênica em andamento (179). Igualmente, o conhecimento do genoma humano favorece a aplicação da metabolômica como uma ferramenta potencial para identificação de novos biomarcadores para diagnóstico e monitoramento de tumores, além de ajudar na identificação de novos alvos para a terapia contra o câncer (180).

Em face ao grande número de candidatos a alvos na terapia contra o câncer, um dos maiores desafios reside em se desenvolver uma estratégia capaz de produzir resultados satisfatórios na advância, para a maior parte dos

tumores, sem, contudo, aumentar os efeitos colaterais. Os resultados aqui apresentados, sinalizam para essa possibilidade, especialmente por adotar uma estratégia que reduz a proliferação celular do tumor, preservando as células normais. Muitos estudos ainda precisam ser conduzidos para um melhor entendimento das vias dependentes de sinalização nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  e que possibilitem o desenvolvimento de inibidores específicos, relacionados com a progressão tumoral.

## 7 Conclusão

Esta pesquisa nos permite concluir, primeiramente, que o modelo de irradiação *in vitro* mimetiza o esquema de irradiação clínico, garantindo uniformidade de dose, eliminando o efeito bystander e que dose única ou cumulativa direcionam as células irradiadas para diferentes perfis; em segundo lugar, células tumorais são mais sensíveis ao tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e que, o tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, associado com radiação X, não promove aumento de danos ao DNA das células A431, mas, a associação, reduz a proliferação celular e fração de sobrevivência tumoral por prevenir a superexpressão de ADAM-17 e EGFR aplicando-se, aproximadamente, metade da dose acumulada de radiação e, por conseguinte, torna estes tumores mais sensíveis aos efeitos da radioterapia. Finalmente, alterações promovidas pelos bloqueadores de integrina fornecem parâmetros para aplicação de novas abordagens para futuros estudos relacionando tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e metástase tumoral.

## **8 Anexos**

1-Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus.

2-Nucleoplasmic calcium buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to anticancer therapy.

3-Aprovação do COEPE para uso de células gengivais humanas.

4-Ofício de doação das células gengivais humanas para esta pesquisa.

5-Relação de artigos publicados em co-autoria envolvendo sinalização de Ca<sup>2+</sup>

6-Repercussão social desta pesquisa.

REVIEW

Open Access

## Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus

Rodrigo R Resende<sup>1</sup>, Lidia M Andrade<sup>2</sup>, Andre G Oliveira<sup>3</sup>, Erika S Guimarães<sup>3</sup>, Sílvia Guatimosim<sup>3</sup> and M Fatima Leite<sup>3,4,5\*</sup>

### Abstract

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an essential signal transduction element involved in the regulation of several cellular activities and it is required at various key stages of the cell cycle. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is crucial for the orderly cell cycle progression and plays a vital role in the regulation of cell proliferation. Recently, it was demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies that nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  regulates cell growth. Even though the mechanism by which nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  regulates cell proliferation is not completely understood, there are reports demonstrating that activation of tyrosine kinase receptors (RTKs) leads to translocation of RTKs to the nucleus to generate localized nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling which are believed to modulate cell proliferation. Moreover, nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  regulates the expression of genes involved in cell growth. This review will describe the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling machinery and its role in cell proliferation. Additionally, the potential role of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  as a target in cancer therapy will be discussed.

**Keywords:** Nucleoplasmic reticulum, Nuclear calcium channels, Nuclear calcium, Cell proliferation

### Introduction

Intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) participates as a second messenger in several signaling pathways coordinating key events in a variety of cellular functions [1].  $\text{Ca}^{2+}$  signals are generally initiated by the binding of a hormone or growth factor to a transmembrane receptor, most commonly G protein coupled receptor (GPR) or tyrosine kinase receptor (RTK). The activation of such receptors recruits several second messengers, including phospholipase C (PLC) that, once activated, cleaves phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) producing diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ).  $\text{InsP}_3$  then binds to the  $\text{InsP}_3$  receptor ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ), activating its channel to release  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum. Once in the cytosol,  $\text{Ca}^{2+}$  can participate in several intracellular cascades and activate another class of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the ryanodine receptor (RyR), triggering a process denoted  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release [1]. The type II and III RyR are also sensitive to cyclic ADP-ribose (cADPR) [2,3], a process first demonstrated in sea urchin

eggs [4], but now known to mobilize  $\text{Ca}^{2+}$  in a wide range of mammalian cell types [3,5-8]. Members of a third family of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the two pore channels (TPCs), are activated by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAAD) which promotes release of  $\text{Ca}^{2+}$  from acidic organelles [9,10]. Like cADPR, NAADP was discovered in sea urchin eggs [11] and has now been found to induce  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mammalian cells as well [9,10]. Interactions among these different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels coordinate cellular responses mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ , both in health and disease. However little is known regarding the interaction of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the regulation of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.

One way by which intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulates multiple cell functions is through spatial segregation of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Indeed, subcellular increases in  $\text{Ca}^{2+}$  modulate not only physiological but also pathological events. For example, the physiological secretion of zymogen granules in pancreatic acinar cells is triggered by a localized sub-apical  $\text{Ca}^{2+}$  increase that does not spread throughout the entire cell [12]. In the other hand, the hypertrophic response in cardiomyocytes depends mostly on nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals [13]. Additional examples of cellular processes modulated by subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling include the extension of growth cones in neuronal

\* Correspondence: leitemd@dedalus.icc.ufmg.br

<sup>3</sup>Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, Maryland, MD, USA  
Full list of author information is available at the end of the article



cells [14,15] and the establishment of specific gene transcription signatures [16], regulating development and differentiation [17-20], among others [21].

Moreover, the presence of another regulatory nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  domain, denoted the nucleoplasmic reticulum [22,23] was reported in a wide variety of cells, from plants to animals (reviewed in [24]). The nucleoplasmic reticulum, of which 2 classes have been described, is a reticular membrane network of  $\text{Ca}^{2+}$  stores that is continuous with the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope. The type I contains invaginations of the inner membrane of the nuclear envelope, and the type II contains both the inner and outer nuclear envelope membrane. These two classes of the nucleoplasmic reticulum can coexist within the same nucleus (reviewed in [24]), and their structure undergoes dynamic remodeling [25]. With the capacity to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  signals in subnuclear regions, the presence of such machinery might provide a potential mechanism by which nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  could simultaneously regulate many independent processes in the nucleus.

Although it is well known that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  has biological effects that differ from those mediated by increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  [21], the mechanisms by which  $\text{Ca}^{2+}$  is specifically increased in the nucleoplasm are a topic of debate. It was initially proposed that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling would occur by passive diffusion of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  across the nuclear envelope into the nucleoplasm. However, as it will be discussed in more detail, the nuclear interior has all the machinery required to produce localized  $\text{Ca}^{2+}$  signals, supporting the concept of the nuclear compartment as an independent apparatus to trigger  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Moreover, the mechanisms and pathways by which localized  $\text{Ca}^{2+}$  signals in the nucleus regulate cell growth have only recently been investigated. The emerging model (Figure 1) shows that upon growth factor stimulation, RTKs translocate to the nucleus to induce hydrolysis of nuclear PIP<sub>2</sub>, generating InsP<sub>3</sub> in the nucleoplasm, which leads to nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals that can control cell growth [26-28] (Figure 1). This review highlights recent advances on nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and its role in cell proliferation.

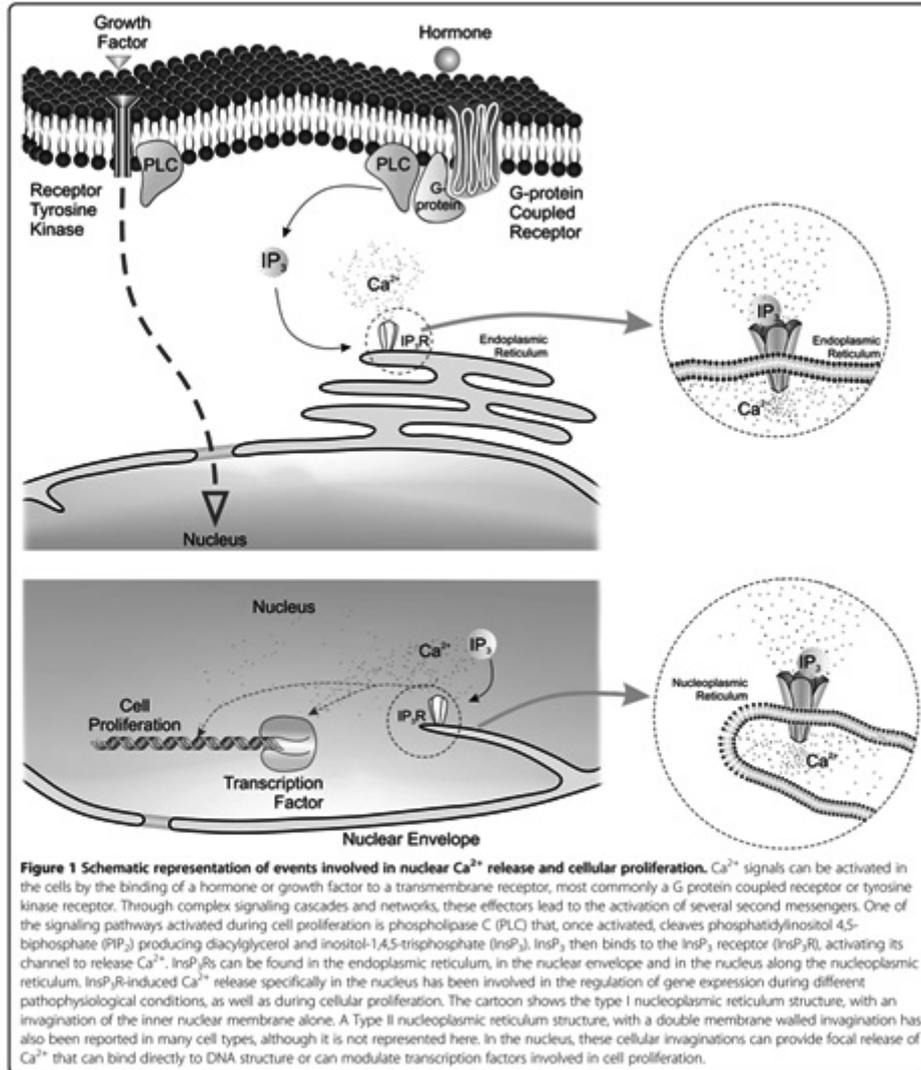
#### **Ca<sup>2+</sup> signaling in the nucleus**

The nucleus is separated from the cytosol by the nuclear envelope, which is a specialized region of the endoplasmic reticulum, comprised of phospholipid bilayers [24]. However, the nuclear envelope contains pores that are permeable to molecules up to 60 kDa in size [29]. In the absence of a gating mechanism, a pore of this size would allow rapid equilibration of  $\text{Ca}^{2+}$  between the nucleus and cytosol. Indeed, under certain circumstances, free diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  through the nuclear pore occurs [30]. For example, stimulation of basophilic leukemia cells

with antigen or photoreleased InsP<sub>3</sub> triggered  $\text{Ca}^{2+}$  waves that spread from the cytosol into the nucleus [31]. Similar observations have been made in hepatocytes stimulated with vasopressin [32]. In contrast, several reports have demonstrated the existence of a nuclear-cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  gradient in a number of cell types [33,34], indicating that the permeability of nuclear pores to this ion can be regulated. However, the detection of such gradient can be incorrectly inferred depending on the technique used to measure intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in different compartments. Some of the commonly used organic  $\text{Ca}^{2+}$  indicators can display uneven distribution in the interior of the cells and can preferentially accumulate in membrane compartments such as the ER and the nucleoplasm. More importantly, the affinity of fluorescent probes for  $\text{Ca}^{2+}$  can vary depending on the cellular environment (reviewed [35]). Although each method for analyzing  $\text{Ca}^{2+}$  has certain drawbacks it is now appreciated that  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is regulated at the subcellular level, and that this level of regulation is necessary for  $\text{Ca}^{2+}$  to act as a second messenger that regulates multiple cell functions simultaneously.

The nuclear envelope itself is a  $\text{Ca}^{2+}$  rich compartment, accumulating  $\text{Ca}^{2+}$  via a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump (SERCA) and a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger [36-38] and releasing it via channels that are sensitive to InsP<sub>3</sub> [37,39], cADPR [39,40], and NAADP [41]. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump was shown to be present only in the outer membrane of the nuclear envelope, while the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, is expressed in the inner membrane [38,42]. Regarding the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the RyRs appears to be present on both leaflets of the nuclear envelope [43]. Similarly, there are reports of InsP<sub>3</sub>Rs in the inner and outer membrane [28,44,45]. In addition, it was shown that ADP-ribosyl (CD38), an enzyme required for generation of cADPR, is located on the inner membrane of the nuclear envelope [40]. In *Aplysia* neurons, depolarization is the signal that triggers the translocation of CD38 to the nucleus [46]. Moreover, the nuclear envelope possess the tool kit necessary to produce InsP<sub>3</sub>, including PIP<sub>2</sub>, and PLC [47], and this machinery may be activated selectively through tyrosine kinase pathway [48].

However, the nuclear envelope is not the only nuclear site containing the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling machinery. The nucleoplasmic reticulum represents another specialized cellular compartment involved in regulation in time and space of specific intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling events. For instance, both the InsP<sub>3</sub>R and the RyR are found in the nucleoplasmic reticulum [22,23]. Importantly, the InsP<sub>3</sub>-Kinase (IP3KB), the isoform that inactivates the InsP<sub>3</sub> by phosphorylating it, was also reported to be located in the nucleoplasmic reticulum, where it may function to terminate the InsP<sub>3</sub> mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signal [49]. In addition, SERCA was also



shown to be expressed along invaginations of the nucleoplasmic reticulum [50]. Therefore, there are several reports describing an active Ca<sup>2+</sup> signaling regulatory domain deep in the nucleus, along the nucleoplasmic reticulum, providing further spatial control of Ca<sup>2+</sup> within this cellular compartment [22,51,52].

Corroborating these findings, there is a growing body of data demonstrating that the nucleus has the capacity to independently generate Ca<sup>2+</sup> signals. Several *in vitro* studies have shown that InsP<sub>3</sub> releases Ca<sup>2+</sup> directly from the nuclear envelop into the nucleus [33,39,44,53,54]. Accordingly, it has been demonstrated in a liver cell line that extracellular

ATP can activate nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  release, via an  $\text{InsP}_3$ -dependent mechanism [55]. In cardiomyocytes, endothelin-1 has also been shown to elicit a local nuclear envelope  $\text{Ca}^{2+}$  release via  $\text{InsP}_3\text{R}$  that activates nuclear CaMKII triggering HDAC5 phosphorylation and its nuclear export [56]. This signaling pathway has been implicated in the regulation of gene transcription in adult ventricular myocytes in response to neurohumoral signals during hypertrophy. Similar to  $\text{InsP}_3$ , cADPR can also increase  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated cell nuclei [33,39,40].

One of the proposed mechanism by which  $\text{InsP}_3$  generates nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is via translocation of activated RTKs from the plasma membrane to the nuclear interior. For instance, it was shown that IGF-1 and integrins caused PIP2 breakdown in the nucleus but not at the plasma membrane [48]. Similarly, activation of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor c-Met in a liver cell line and insulin receptor in primary hepatocytes caused PIP2 breakdown in the nucleus resulting in  $\text{InsP}_3$  formation that was followed by nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals [26,27] (Figure 1). The triggering of this highly localized cascade was dependent on the rapid translocation of the activated HGF receptor to the nucleus, through a mechanism that depends on the adaptor protein Gab-1 and importin- $\beta$  [26]. Moreover, it also has been hypothesized that relocation of MAP kinase to the nucleus activates nuclear phospholipase C to generate  $\text{InsP}_3$  there [43].

Once in the nucleus,  $\text{Ca}^{2+}$  signals directly regulate signaling pathways distinct from those mediated by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , for instance they stimulate the intranuclear activity of PKC [22] and CaMK-IV [57]. Nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  also plays a significant role in regulating the transcription factor CRE-binding protein and its coactivator, CREB-binding protein (CBP) [58]. Transcriptional activation of Elk-1 by EGF was also shown to depend on nuclear rather than cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  [59]. On the other hand, nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  can negatively regulate the activity of transcription factors, such as TEAD [60]. Moreover, nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  has also been implicated in modulating cardiac hypertrophy [13,51] and within the nucleus  $\text{Ca}^{2+}$  was shown to bind to and directly regulate DNA structure [61]. Another evidence of the role of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway came from studies showing that in skeletal muscle cell, two-photon photorelease of caged  $\text{Ca}^{2+}$  near the nucleoplasmic reticulum was found to elicit a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release event within the nucleus [23]. More recently, it was demonstrated that nuclear rather than cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals specifically control the progression through early prophase, showing that nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  regulates cell proliferation [62].

#### Nuclear $\text{Ca}^{2+}$ and cell proliferation

It has been long recognized that  $\text{Ca}^{2+}$  signals have an important role throughout the mammalian cell cycle and are especially important in early  $G_1$  and  $G_1/S$  and  $G_2/M$

transitions [63], with the first major  $\text{Ca}^{2+}$  transient occurring just prior to entry into mitosis, and the second one occurring during the metaphase-anaphase transition [63,64]. Indeed,  $\text{Ca}^{2+}$  is the most prominent messenger required through these cycle points [65,66] and downstream targets of  $\text{Ca}^{2+}$  have also been implicated in cell cycle progression as well [67,68].

Heterologous expression of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein parvalbumin has been used to study the role of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in the regulation of the cell cycle. This protein is normally expressed in skeletal muscle and neurons [69], and is known to buffer  $\text{Ca}^{2+}$  [70]. The first report using parvalbumin as a molecular tool to buffer intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and study cellular growth, showed that reducing  $\text{Ca}^{2+}$  slowed progression through the cell cycle [68]. However, it is now known that the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on proliferation correlate with the subcellular compartment where  $\text{Ca}^{2+}$  is released. Using parvalbumin variants, selectively targeted to distinct intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rich compartments, it was found that buffering mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  inhibits apoptosis and accelerates hepatocyte proliferation [71]. In contrast, buffering cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was shown to retard liver regeneration and progression through the cell cycle after partial hepatectomy [72]. Since cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  can increase through a number of mechanisms, it is believed that, in this compartment,  $\text{Ca}^{2+}$  may have different effects on cell growth [71,73,74]. On the other hand, it was shown that nucleoplasmic rather than cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is essential for liver cell line proliferation, and is necessary in particular for progression through early prophase [62]. It was also found that liver tumors implanted in nude mice grew much more slowly when expressing parvalbumin in their nuclei compared to the cytosol [62]. Moreover, HGF and insulin, two potent growth factors in liver, that induce cell proliferation during liver regeneration, were shown to selectively form  $\text{InsP}_3$  in the nucleus to initiate nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals [22,27] (Figure 1). Since the nucleoplasmic reticulum is known to be abundant in many tumor cell types [24], one would expect that the existence of these nuclear invaginations could provide further specificity to cell proliferation by allowing the focal delivery of  $\text{Ca}^{2+}$  to particular sites within the nucleus.

Although, the proteins that link nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals to cell proliferation have not been clearly identified, more recent findings in liver tumor cells indicated the endopeptidase legumain (LGMN) as a novel target of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  [75]. Using Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) to subtract genes in liver cells expressing the  $\text{Ca}^{2+}$  buffer protein parvalbumin targeted to the nucleus, from genes in cells expressing a mutated form of nuclear-targeted parvalbumin which has one of the two  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites inactivated. The authors identified thirteen genes whose expression was affected by a small alteration in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

LGMN was one of such genes and upon further validation was demonstrated to be regulated by nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals at the transcriptional level. LGMN was first recognized in plants [76] and later in humans and mice [77]. It is present in the tumor microenvironment where it is expressed by macrophages and contributes to metastatic behavior by promoting cell migration and tissue invasion. It is known that increased expression of LGMN is associated with poor tumor differentiation [78]. For instance, it was demonstrated that LGMN co-localizes with integrins at the invading front of tumors and expression of this enzyme was shown to be associated with increased invasiveness [78,79]. So, it was shown that when  $\text{Ca}^{2+}$  was buffered in the nucleus of the cells, LGMN expression decreased, impairing cell proliferation [75]. Additionally, this work also provided evidence that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals regulate cell proliferation at least in part through the modulation of gene expression (Figure 1). Other targets for nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  that are involved in cell proliferation still remain to be described.

Altered nuclear morphology is a common feature of many cancers [24] and it has been proposed that information regarding the nucleoplasmic reticulum invaginations could be used in combination with other nuclear anomalies as markers of malignancy [80]. More recently, it was also proposed that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering could be used in conjunction with radiotherapy as a therapeutic potential for the treatment of carcinoma. Ionizing radiation concomitant with nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering showed superior outcome, compared to irradiation alone [81]. Corroborating previous findings, the beneficial effect of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in the proposed antitumor therapy was shown to be due to changes caused in expression level of genes involved in the regulation of cell proliferation [59]. Moreover, it was also shown that buffering nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  reduced the rate of tumor cell proliferation, without affecting cells from normal tissue [81], suggesting higher selectivity of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  towards controlling cancer cell growth. Further studies are required to determine the mechanistic basis for the differential sensitivity of normal versus cancer cell proliferation to changes in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ . Nonetheless, these findings suggest that buffering nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  could be one strategy employed to inhibit the growth of tumors without affecting normal tissue, either alone or in association therapy.

### Conclusions

$\text{Ca}^{2+}$  is important to several signaling pathways among virtually every cell type. The central mechanism by which  $\text{Ca}^{2+}$  regulates protein functions depends on how and where it is released into the cell. The role of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  in cell proliferation was demonstrated *in vitro* by showing that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering reduced proliferation rate through blocking cell cycle in  $G_2/M$  phase. It was also demonstrated

that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  plays a role on tumor growth *in vivo* and it can alter the expression of genes involved in cell proliferation. Moreover, modulation of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was shown to be a potential target to treat cancer. However further studies are needed to better understand how nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  can be generated and how it regulates cell proliferation and cell cycle progression. These findings would have strong potential as therapeutic targets in degenerative diseases or cancer.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

All authors contributed in the conception and writing of the manuscript. All authors edited and approved the final version.

### Acknowledgements

We thank Howard Hughes Medical Institute (HHMI), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), PRONEX and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### Author details

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>2</sup>René Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>3</sup>Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, Maryland, MD, USA. <sup>5</sup>Institute of Biological Sciences Bloco A4 246, Federal University of Minas Gerais, Av Antônio Carlos, 6627, 30370-920, Belo Horizonte, Brazil.

Received: 5 May 2011 Accepted: 12 February 2013

Published: 21 February 2013

### References

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:517-529.
2. Sonnentner A, Conti A, Bertocchini F, Schindler H, Sorrentino V: Functional properties of the ryanodine receptor type 3 (RyR3)  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *EMBO J* 1998, **17**:2790-2798.
3. Meszoros LG, Bak J, Chu A: Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Nature* 1993, **364**:76-79.
4. Gallone A, Lee HC, Busa WB:  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 1991, **253**:1143-1146.
5. Cancela JM, Petersen OH: The cyclic ADP-ribose antagonist 8-NH<sub>2</sub>-cADP-ribose blocks cholecystokinin-evoked cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch* 1998, **435**:746-748.
6. Kuemmerle JF, Makhlof GM: Agonist-stimulated cyclic ADP-ribose. Endogenous modulator of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in intestinal longitudinal muscle. *J Biol Chem* 1995, **270**:25488-25494.
7. Clementi E, Riccio M, Sciorati C, Nistico G, Meldolesi J: The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem* 1996, **271**:17739-17745.
8. Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Hoyer P, et al: Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 1999, **398**:70-73.
9. Macgregor A, Yamasaki M, Rakovic S, Sanders L, Parkesh R, Churchill GC, et al: NAADP controls cross-talk between distinct  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the heart. *J Biol Chem* 2007, **282**:15302-15311.
10. Cancela JM, Churchill GC, Gallone A: Coordination of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 1999, **398**:74-76.
11. Lee HC, Aarhus R: A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 1995, **270**:2152-2157.

12. Ito K, Miyashita Y, Kasai H: Micromolar and submicromolar Ca<sup>2+</sup> spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells. *EMBO J* 1997, **16**:242-251.
13. Arantes LA, Aguiar CJ, Amaya MJ, Figueiro NC, Andrade LM, Rocha-Resende C, et al: Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2012, **53**:475-486.
14. Gomez TM, Spitzer NC: In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 1999, **397**:350-355.
15. Zheng JQ: Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature* 2000, **403**:89-93.
16. Wiegert JS, Bading H: Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. *Cell Calcium* 2011, **49**:296-305.
17. Resende RR, Adhikari A, da Costa JL, Lorencon E, Ladeira MS, Guatimosim S, et al: Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1803, 2010:246-260.
18. Resende RR, Adhikari A: Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal* 2009, **7**:20.
19. Resende RR, da Costa JL, Kihara AH, Adhikari A, Lorencon E: Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma and mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010, **19**:379-394.
20. Tonelli FM, Santos AK, Gomes DA, Da Silva SL, Gomes RN, Ladeira LD, et al: Stem cells and calcium signaling. *Adv Exp Med Biol* 2012, **740**:891-916.
21. Rodrigues MA, Gomes DA, Nathanson MH, Leite MF: Nuclear calcium signaling: a cell within a cell. *Braz J Med Biol Res* 2009, **42**:17-20.
22. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH: Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 2003, **5**:440-446.
23. Marius P, Guerra MT, Nathanson MH, Ehrlich BE, Leite MF: Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2006, **39**:65-73.
24. Malhas A, Goulbourne C, Vaux D: The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends Cell Biol* 2011, **21**:362-373.
25. Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D: Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1997, **136**:531-544.
26. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Vamai P, Bala T, et al: c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 2008, **283**:4344-4351.
27. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH: Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 2008, **48**:1621-1631.
28. Stehno-Bittel L, Luckhoff A, Clapham DE: Calcium release from the nucleus by InsP<sub>3</sub> receptor channels. *Neuron* 1995, **14**:163-167.
29. Gerace L, Burke B: Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 1988, **4**:335-374.
30. Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R: Nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J* 1993, **12**:4813-4819.
31. Albritton NL, Oancea E, Kuhn MA, Meyer T: Source of nuclear calcium signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:12458-12462.
32. Lin C, Hajnoczky G, Thomas AP: Propagation of cytosolic calcium waves into the nuclei of hepatocytes. *Cell Calcium* 1994, **16**:247-258.
33. Santella L, Kyozuka K: Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca<sup>2+</sup> transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium* 1997, **22**:11-20.
34. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H: Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997, **385**:260-265.
35. Perez-Terzic C, Jaconi M, Clapham DE: Nuclear calcium and the regulation of the nuclear pore complex. *Bioessays* 1997, **19**:787-792.
36. Lanini L, Bachs O, Carafoli E: The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992, **267**:11548-11552.
37. Nicotera P, McConkey DJ, Jones DP, Orenius S: ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> uptake and increases the free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:453-457.
38. Xie X, Wu G, Lu ZH, Ledeen RW: Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J Neurochem* 2002, **81**:1185-1195.
39. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH: ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell* 1995, **80**:439-444.
40. Adebajo OA, Anandatheerthavarada HK, Koval AP, Moonga BS, Brijwas G, Sun L, et al: A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Nat Cell Biol* 1999, **1**:409-414.
41. Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K, Dolman NJ, Tepikin AV, Petersen OH, et al: NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* 2003, **163**:271-282.
42. Wu G, Xie X, Lu ZH, Ledeen RW: Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:10829-10834.
43. Santella L, Carafoli E: Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J* 1997, **11**:1091-1109.
44. Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem* 1996, **271**:478-485.
45. Cardenas C, Escobar M, Garcia A, Osorio-Reich M, Hamel S, Foskett JK, et al: Visualization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the nuclear envelope outer membrane by freeze-drying and rotary shadowing for electron microscopy. *J Struct Biol* 2010, **171**:372-381.
46. Bezin S, Charpentier G, Lee HC, Baux G, Fossier P, Cancela JM: Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization. *J Biol Chem* 2008, **283**:27859-27870.
47. Divecha N, Rhee SG, Letcher AJ, Irvine RF: Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem J* 1993, **289**(Pt 3):617-620.
48. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995, **268**:233-239.
49. Gerasimenko O, Gerasimenko J: New aspects of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* 2004, **117**:3087-3094.
50. Collado-Hilly M, Shivani H, Jallard D, Mauger JP: Differential redistribution of Ca<sup>2+</sup> + -handling proteins during polarisation of MDCK cells: effects on Ca<sup>2+</sup> signalling. *Cell Calcium* 2010, **48**:215-224.
51. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gomez-Viquez NL, et al: Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium* 2008, **44**:230-242.
52. Soliman EM, Rodrigues MA, Gomes DA, Sheung N, Yu J, Amaya MJ, et al: Intracellular calcium signals regulate growth of hepatic stellate cells via specific effects on cell cycle progression. *Cell Calcium* 2009, **45**:284-292.
53. Hennager DJ, Welsh MJ, DeLisle S: Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 1995, **270**:4959-4962.
54. Malviya AN, Rogue P, Vincendon G: Stereospecific inositol 1,4,5-[32P] trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:9270-9274.
55. Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, et al: Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:2975-2980.
56. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al: Local InsP<sub>3</sub>-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 2006, **116**:675-682.
57. Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW: Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 1998, **392**:198-202.
58. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H: CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 1998, **281**:1505-1509.
59. Pust T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, Berchtold MW, et al: Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 2002, **277**:27517-27527.

60. Thompson M, Andrade VA, Andrade SI, Pudi T, Ortega JM, Goes AM, et al: **Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **301**:267-274.
61. Dobi A, Agoston D: **Submillimolar levels of calcium regulates DNA structure at the dinucleotide repeat (TG/AC)n.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:5981-5986.
62. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, et al: **Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation.** *J Biol Chem* 2007, **282**:17061-17068.
63. Roderick HL, Cook SJ: **Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:361-375.
64. Groigno L, Whitaker M: **An anaphase calcium signal controls chromosome disjunction in early sea urchin embryos.** *Cell* 1998, **92**:193-204.
65. Taylor JT, Zeng XB, Pottle JE, Lee K, Wang AR, Yi SG, et al: **Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**:4984-4991.
66. Trump BF, Berezsky IK: **Calcium-mediated cell injury and cell death.** *FASEB J* 1995, **9**:219-228.
67. Patel R, Holt M, Philippova R, Moss S, Schulman H, Hidaka H, et al: **Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells.** *J Biol Chem* 1999, **274**:7958-7968.
68. Rasmussen CD, Means AR: **Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis.** *EMBO J* 1989, **8**:73-82.
69. Berchtold MW, Cello MR, Heizmann CW: **Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization.** *J Biol Chem* 1984, **259**:5189-5196.
70. Andresen C, Gotzov V, Berchtold MW, Pauls TL, Schwaller B, Fellay B, et al: **Changes in shape and motility of cells transfected with parvalbumin cDNA.** *Exp Cell Res* 1995, **219**:420-426.
71. Guerra MT, Fonseca EA, Melo FM, Andrade VA, Agular CJ, Andrade LM, et al: **Mitochondrial calcium regulates rat liver regeneration through the modulation of apoptosis.** *Hepatology* 2011, **54**:296-306.
72. Lagoudakis L, Garcin I, Julien B, Nahum K, Gomes DA, Combettes L, et al: **Cytosolic calcium regulates liver regeneration in the rat.** *Hepatology* 2010, **52**:602-611.
73. Nicou A, Serriere V, Prigent S, Boucherie S, Combettes L, Guillon G, et al: **Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte Ca<sup>2+</sup> signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow.** *FASEB J* 2003, **17**:1901-1903.
74. Kahl CR, Means AR: **Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways.** *Endocr Rev* 2003, **24**:719-736.
75. Andrade V, Guerra M, Jardim C, Melo F, Silva W, Ortega JM, et al: **Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain.** *J Hepatol* 2011, **55**:626-635.
76. Kembhavi AA, Buzzle DJ, Knight CG, Barrett AJ: **The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays.** *Arch Biochem Biophys* 1993, **303**:208-213.
77. Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, et al: **Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase.** *J Biol Chem* 1997, **272**:8090-8098.
78. Gawenda J, Traub F, Luck HJ, Kreipe H, von Wasielewski R: **Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **102**:1-6.
79. Loak K, Li DN, Manouy B, Bilson J, Morton F, Hewitt E, et al: **Novel cell-permeable acylamethylketone inhibitors of asparaginyl endopeptidase.** *Biol Chem* 2003, **384**:1239-1246.
80. Batistatou A, Scopa CD: **Pathogenesis and diagnostic significance of nuclear grooves in thyroid and other sites.** *Int J Surg Pathol* 2009, **17**:107-110.
81. Andrade LM, Geraldo JM, Gonçalves OK, Leite MTT, Catarina AM, Guimardes MM, et al: **Nucleoplasmic calcium buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to anticancer therapy.** *J Cancer Sci Ther* 2012, **4**:131-139.

doi:10.1186/1478-811X-11-14

Cite this article as: Resende et al: Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell Communication and Signaling* 2013 **11**:14.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





## Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy

Lidia M. Andrade<sup>1</sup>, Jony M. Geraldo<sup>2</sup>, Osvaldo X. Gonçalves<sup>2</sup>, Miguel T. T. Leite<sup>2</sup>, Anderson M. Catarina<sup>2</sup>, Melissa M. Guimarães<sup>3</sup>, Adriana F. Paes Leme<sup>4</sup>, Sami Yokoo<sup>4</sup>, Carlos R. Machado<sup>5</sup>, Matheus A. Rajão<sup>5</sup>, Sandhra M. Carvalho<sup>6</sup>, Dawidson A. Gomes<sup>5</sup>, Carla J. Aguiar<sup>7</sup>, Elaine M. Souza-Fagundes<sup>7</sup>, Carlos L. Zani<sup>1</sup>, Rodrigo R. Resende<sup>5</sup>, Olindo A. Martins-Filho<sup>1</sup> and M. Fátima Leite<sup>7,8\*</sup>

<sup>1</sup>René Rachou Research Center, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>São Francisco Radiotherapy Institute, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Vales do Jequitinhonha and Mucuri, Diamantina, Brazil

<sup>4</sup>National Laboratory of Biosciences, Campinas, Brazil

<sup>5</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>6</sup>School of Engineering, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>7</sup>Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>8</sup>Howard Hughes Medical Institute, USA

### Abstract

**Background:** Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling within the nucleus is known to play a crucial role in cell proliferation. The aim of this study was to investigate whether nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering could improve the antitumor effect of X-rays therapy on Human Squamous Cell Carcinoma (HSCC).

**Methods:** For these purpose, we developed an experimental protocol that simulated clinical radiotherapy and prevented bystander effects of irradiation. HSCC, A431 cell line, was submitted to 10Gy cumulative X-rays therapy alone ( $\text{XR}_{\text{cum}}10\text{Gy}$ ) or in association with the strategy that selectively buffer nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ ) signaling.

**Results:** Upon  $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$  buffering, A431 cell proliferation rate decreased significantly as compared to control. Cell cycle analysis showed that association of  $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$  buffering with  $\text{XR}_{\text{cum}}10\text{Gy}$  increased the percentage of A431 cells at G<sub>2</sub>/M and did not increase nuclear/mitochondrial DNA damages. Nonetheless,  $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$  buffering prevented the increase of the radioresistance-related biomarker ADAM-17 expression and EGFR activation induced by irradiation. Furthermore, the association therapy almost completely abolished cell survival fraction even using approximately half of the X-rays cumulative dose.

**Conclusions:** Nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to X- rays irradiation treatment.

**Keywords:** Human squamous cell carcinoma; Nuclear calcium buffering; X-rays irradiation; A431 cells; Head and neck tumor

### Introduction

Head and neck cancer is the eighth leading cause of cancer death worldwide [1]. In patients diagnosed with head and neck cancer, Squamous Cell Carcinoma (SCC) is the most frequent tumor type, characterized by local tumor aggressiveness, and high frequency of second primary tumors [2]. Although, radiotherapy plays a pivotal role in head and neck SCC treatment, recurrent tumors frequently show increased radioresistance [3]. It is known for instance, that exposure of SCC to X-rays therapy triggers compensatory pathways that can induce cell survival and repopulation following radiation [4]. Therefore, for SCC, resistance to radiotherapy is one of the major barriers in the treatment [5], and little is known about the molecular and cellular mechanisms that leads to radioresistance. Moreover, the combined effects of radiation field uniformity and dose fractionation schedules on SCC have not been studied in detail [6]. One molecular target demonstrated to be important for the SCC treatment has been the Epidermal Growth Factor (EGF) [7]. EGF receptor (EGFR) exhibits tyrosine-kinase activity and through activation of its downstream signals regulates cell proliferation, differentiation and survival [8]. It has been demonstrated that EGFR is frequently over expressed in malignant tumors, and its over expression correlates with increased cellular resistance to consecutive radiation exposure [4,8]. Radiation activates EGFR, which in turn stimulates phospholipase C (PLC) activity, inositol-1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) production and release of  $\text{Ca}^{2+}$  from internal stores [9]. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  participates as a second

messenger in several signaling pathways, coordinating key events in a variety of cellular functions [10]. Particularly, nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is known to play an important role on tumor growth [11,12]. For instance, we had previously demonstrated that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  regulates the expression of genes involved in cell proliferation, and also showed that the buffering of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  impairs the growth of cancer cells *in vitro* as well as *in vivo* [11,12]. Nevertheless, there is no report regarding the cellular effect of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering associated to X-rays on cell proliferation. In the present work, we investigated whether nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering could improve the effect of clinical doses of X-rays on human SCC growth. For that, we developed a refined *in vitro* daily fractionated irradiation model, based on head and neck radiotherapy protocol, to evaluate the role of the association therapy on cell proliferation. We found that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  buffering increased radiation efficacy, at least

\*Corresponding author: M. Fátima Leite, Ph.D. Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil 31270-901. Tel: (55+31)3409-2947; Fax: (55+31)3409-2924; E-mail: [leitemd@dedalus.lcc.ufmg.br](mailto:leitemd@dedalus.lcc.ufmg.br)

Received April 08, 2012; Accepted May 23, 2012; Published May 25, 2012

Citation: Andrade LM, Geraldo JM, Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, et al. (2012) Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. J Cancer Sci Ther 4: 131-139. doi:10.4172/1948-5956.1000127

Copyright: © 2012 Andrade LM, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

in part, by preventing ADAM-17 over expression and consequently EGFR activation.

## Materials and Methods

### Cell culture, human material and reagents

We used skin human squamous epidermoid carcinoma (HSCC), A431 cell line. SCC of skin is known to have a predilection for the head and neck region [13], and we used squamous cell carcinoma cell line because of its well-known radioresistance behavior [14-17]. A431 cell line was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank-RJCB (Rio de Janeiro, Brazil), and primary cell culture of human gingival fibroblast was kindly donated by Dr. Melissa M. Guimarães from Federal University of Vales do Jequitinhonha and Mucuri, Brazil. Human materials used in this study were undertaken under Institutional Review Board approved protocol (RD OO3/09), after obtaining informed consent. Upon arrival, A431 cells were immediately expanded and frozen. These cells could be restarted every 3 months from a frozen vial of the same batch of cells. Cells were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 supplemented with 5% FBS or DMEM containing 1 mM sodium pyruvate, supplemented with 10% FBS, respectively, plus 50 units/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin, all from Gibco (Grand Island, NY). Horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG and TRI-reagent from Sigma Aldrich (St Louis, USA), polyclonal anti-rabbit ACE from Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, USA), monoclonal anti-rabbit EGFR from Cell Signaling (Boston, USA), anti-phospho-EGFR (Tyr1173), clone 9H2 from Millipore (Billerica, MA), First-Strand cDNA Synthesis Kit from Fermentas (Ontário, Canada), SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix and StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System from Applied Biosystems (Foster City, USA), Alexa-488 from Invitrogen (Maryland, USA). All other reagents were of the highest quality that was commercially available.

### Irradiation planning and dosimetry

Acrylic platform, measuring 27 x 25 cm, was designed to maintain the cells correctly positioned during irradiation. The platform was positioned in the middle of the water bath and CT images were acquired using Sensation 64 Siemens (Malvern, USA). CAT 3D for WIN 32 software was used for radiotherapy planning. Isodose curves were determined using two vertical parallel opposed radiation fields. For dosimetry, the 25 x 25 cm<sup>2</sup> field sizes and Monitor Units (MU) linear accelerator setting were used. The phantom was scanned in depth along central ray and in cross plane direction of the radiation field. For details see supplementary material and methods.

### Radiotherapy procedures

X-rays beam from 4MV linear accelerator CLINAC 4X (Varian, USA) was used for these studies. The cells were irradiated using isocentric technique with the linear accelerator positioned at the base of the adhered cells. Two vertical parallel opposed fields were used. The Source-axis distance (SAD) was 80 cm, the gantry angles were 180° and 0°, and for a question of choice the Source-surface distance (SSD) were 684.9 mm and 653.5 mm, respectively. The field size of 25 x 25 cm<sup>2</sup> at the isocenter plane was the same for both fields. The cells were irradiated with fractionated daily doses of 2Gy during five days. The geometrical arrangement described above was MU: 116 for the anterior field and 129 for the posterior field. To maintain the electronic equilibrium during X-rays irradiation, T25 tissue flasks were filled with supplemented RPMI. Room conditions were: 20°C, relative air humidity of 42%, and atmospheric pressure of 92.2 kPa. Assays were initiated 5h after irradiation.

### In vitro irradiation geometrical arrangement

Geometrical *in vitro* irradiation can be described mathematically as:

$$MU = \frac{D}{2F_{cal} \times TMR(d, r_d) \times S_c(r_c) \times S_p(r_d)} \times \left( \frac{SAD}{SCD} \right)^2$$

where *MU* is monitor units; *D* is dose; *F<sub>cal</sub>* is calibration factor; *TMR* is tissue maximum ratio; *d* is depth; *r<sub>d</sub>* is field width at depth; *S<sub>c</sub>* is collimator scatter; *r<sub>c</sub>* is field width defined by collimator jaws; *S<sub>p</sub>* is phantom scatter; *SAD* is source axis distance and *SCD* is source chamber distance.

### Nuclear Ca<sup>2+</sup> buffering

To selectively buffer nuclear Ca<sup>2+</sup>, we used a vector containing the cDNA for the IP<sub>3</sub> binding domain (residues 224-605) of the human type I IP<sub>3</sub> receptor that was tagged with monomeric red fluorescent protein (mRFP) and the Nuclear Localization Signal (NLS), as described [18]. A type V recombinant adenovirus (200 MOI) containing the nuclear IP<sub>3</sub> buffer vector was used to selectively deliver the Ca<sup>2+</sup> buffer construct into the cells.

### Cell proliferation assay

A431 cells and human gingival fibroblasts were directly counted as previously described [11].

### Clonogenic assay

Clonogenic assay was performed as previously described [19]. Briefly, after progressively cumulative dose and after each day of experimental conditions, 1.0 x 10<sup>3</sup> and 2.0 x 10<sup>3</sup> cells were seeded onto 6 well tissue culture plates, containing 5 mL culture medium. The cells were incubated to 15 days and then dyed using a mixture of 6% of glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.5% crystal violet (Vetec, Duque de Caxias, Brazil) for 12 h. Mixture was removed and colonies formation was counted.

### Flow cytometry assay

Cell cycle phase was performed as previously described [20]. Briefly, A431 cells were stained with HFS 0.5% solution (0.5% sodium citrate w/v, from Merck, 0.5 mg/mL propidium iodide (PI), from Sigma and 0.5% Triton X-100 v/v, from USB, Cleveland, USA). DNA content was determined using a FACSCalibur (BD Biosciences, USA). Data were analyzed by BD Cell Quest software (USA).

### Immunoblotting

Standard methods were used for immunoblots [12]. Briefly, 40 µg of whole cell protein was subject to sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 8% Tris-HCl gels, as indicated. Proteins were transferred to PVDF membranes followed by antibody labeling. Primary antibodies used to ADAM-17 and EGF Receptor were: polyclonal anti-rabbit TACE (1:1000); monoclonal anti-rabbit EGF Receptor (1:1000). Antibodies were incubated overnight at 4°C. After washing, blots were incubated with a horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:5000) at room temperature for 1 h. Westerns were developed with ECL-plus reagent and films were scanned with a GS-700 imaging densitometer (Bio-Rad, USA). The analyses of these images were performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

### Real-time PCR

Real-time PCR was performed as previously described [12,21]. Total

RNA was obtained using the TRIzol reagent and 2 µg of total RNA were used for retro-transcription using the First-Strand cDNA Synthesis Kit. Real-time quantitative PCR for ADAM-17 was performed using SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, and the dissociation curves were performed to confirm the specificity of products.

The ADAM-17 forward primer was 5'-GGACCCCTCCCAAATAGCA -3' and reverse primer was 5'-ATGGTCCGTGAGATCCTCAA -3'. The threshold cycles (CT) values of target genes were normalized relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, and relative expression ratios were calculated by the 2<sup>-ΔΔ</sup> Ct method. EGFR forward primer was 5'-CTTTCGATACCCAGGACCAAG-3' and reverse primer was 5'-CAACTTCCCAAATGTGCC-3'. Negative controls were treated with water and total RNA was non-reverse transcribed. DNA templates were amplified by real time PCR on the StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System using the SYBR<sup>®</sup> green method; β-actin was used as an internal control to normalize variations in DNA concentrations. Experiments were performed in triplicate for each data point. After amplification, electrophoresis of 10 µL reaction mixture on a 2% NuSieve:agarose gel (3:1) (FMC product, Rockland, ME) was visualized under UV illumination after staining with ethidium bromide.

#### Immunofluorescence

These experiments were performed as described [12,18]. Images were obtained using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Thornwood, NY) with excitation at 488 nm and observation at 505-550 nm.

#### Statistical analysis

The results are expressed as means and SEM. Prism (Graph Pad Prism software, San Diego, CA) was used. Statistical significance was tested with one-way analysis of variance and the *t* test or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test depending on the parametric or non-parametric data nature. In all cases, the *p*<0.05 was considered to indicate statistical significance.

### Results

#### Water phantom improves dose distribution across cells using fractionated schedule

Radiotherapy is based on traditional radiobiological models in which cells hit by radiation, either directly or indirectly, present increased probability of death [22]. Despite large improvements in cancer therapy, a better understanding of cell biology effects induced by radiation still needs further investigation. Here, we developed an *in vitro* irradiation model to monolayer cells, based on head and neck treatment parameters, using tissue flasks fulfilled with medium, and immersed into water phantom positioned by an acrylic platform (Supplementary Figure 1A-1C). Reproducibility in planning target volume during radiotherapy is one of the most important parameters to treatment success [23]. Therefore, the platform was constructed to maintain tissue flasks in a fixed position, ensuring target cells reproducibility during irradiation and allowing a better X-rays absorption and scattering.

Computed Tomography localization and virtual dose simulation are tools used to provide more accurate tumor target, in order to reduce geographical misses and treatment-related toxicity [24]. To ensure that in our experimental setup the SCC cell line would be able to receive the total prescribed dose, we performed radiotherapy planning of the cells, similarly to what is done for *in vivo* studies (Figure 1A-1B). The color lines represent the isodoses curves and the percentage of absorbed

dose. The radiotherapy planning shows that inside irradiation field, all cells receive the same percentage of doses. We also observed uniform distribution of absorbed dose across tissue flasks in parallel opposed fields including lateral flasks borders (Supplementary Movie 1). Since radiotherapy demands accurate dose determination for delivery of highly dose uniformity we evaluated the dose-volume histogram as well as real dosimetry measurements, using ionization chambers (Figure 1C-1D). We found that independent of the flasks position inside irradiation field, all tissue flasks can receive 100 ± 2% of the total calculated dose (Figure 1C). Moreover, depth dose measurements, using our setup, showed that there is no difference in the dose delivered to the cells compared to the computational dosimetry (Figure 1D). It also showed that depth dose curves for parallel opposed field normalized to midpoint value were similar to what has been proposed for 4MV energy beam [25]. While a correctly delivery of X-rays has many potential benefits, a poor delivery may lead to the opposite outcome [26]. Therefore, the position accuracy of the tissue culture flasks was verified using oncologic film (Supplementary Figure 2).

Several methods are available for *in vitro* irradiation of cell monolayers [22]; however, non-uniformity of doses along field profile hampers cell biology conclusions. Our *in vitro* radiobiology model provides uniform irradiation to monolayer cells minimizing uncertainties. Moreover, Monitor Units (MU) relates the dose at any point on the central ray of the treatment beam as a function of beam parameters such as source axis distance (SAD), field size (rd) and depth *d* of the interest [27]. We also tested a MU equation that permits the cells to be treated based on radiotherapy equipment parameters, applying it in diverse radiotherapy machines (Supplementary Figure 3A-3B). In contrast with conventional models for *in vitro* irradiation that uses tissue flasks irradiated under air column, dosimetry measurements in our proposed model, confirmed dose uniformity across cells (Figure 1E-1G). Using our irradiation setup, we then investigated cell cycle profile of A431 cells, under the conventional *in vitro* irradiation protocol of 10Gy single X-rays dose (XR<sub>sd</sub>10Gy), in comparison with 10Gy cumulative dose, fractionated schedule of 2Gy for up to 5 days (XR<sub>cd</sub>10Gy), (Figure 2A-2B). In cells that received XR<sub>sd</sub>10Gy, there was a significant (*p*<0.001) decrease in G<sub>1</sub>/G<sub>1</sub> phase (34.8 ± 2.5%), but an increase in the percentage of cells in the SubG<sub>1</sub>(19.4 ± 2%), G<sub>2</sub>/M (23.9 ± 1.5%), and S(21.5 ± 2.3%) phases relative to control. Under XR<sub>cd</sub>10Gy, compared to control, there was no significant change in the SubG<sub>1</sub>, an indicative of radioresistance. However, there was a decrease in the G<sub>1</sub>/G<sub>1</sub> phase (57 ± 1.5%) and increase in the G<sub>2</sub>/M phase (29.6 ± 1.3%), relative to control, respectively (71.7 ± 2.8% and 13.7 ± 2%, *p*<0.001). Clearly, cell death (SubG<sub>1</sub>) was more pronounced (*p*<0.01) in XR<sub>sd</sub>10Gy (19.4% ± 3.6%) compared to XR<sub>cd</sub>10Gy (4.3% ± 2%), suggesting an intrinsic adaptive response against cell death induced by fractionated X-rays injury. These findings show that using single or cumulative irradiation protocol drives cells towards distinct cell cycle profile. The observed differences in fractionated schedule cannot be attributed to bystander effect, because all cells received an uniform irradiation dose.

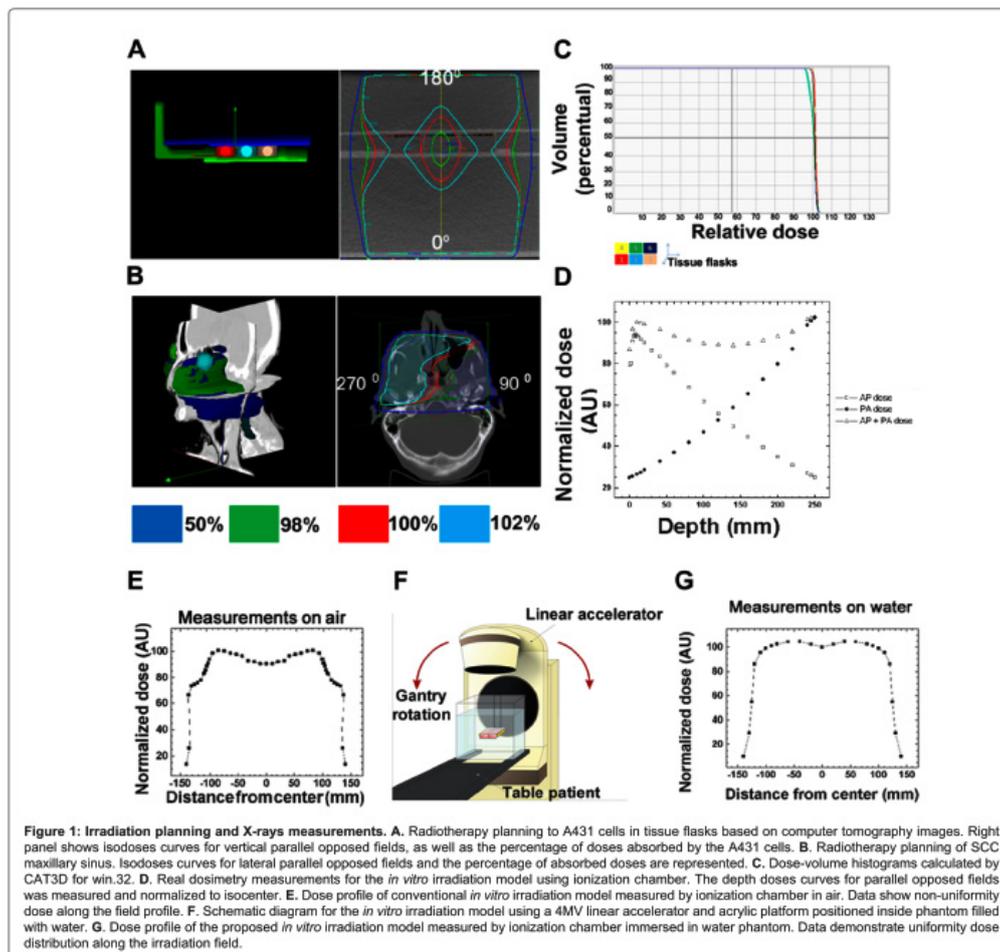
Taking together, our data demonstrated that not only the irradiation setup but also the irradiation protocol, represented by single versus cumulative dose, are important patterns to consider when studying cell biology events that happen under radiotherapy treatment.

#### Buffering nuclear Ca<sup>2+</sup> decreases cell proliferation and alter EGFR activation

Although radiotherapy is a standard protocol for SCC therapy, in many cases, radioresistance and even enhanced proliferation of

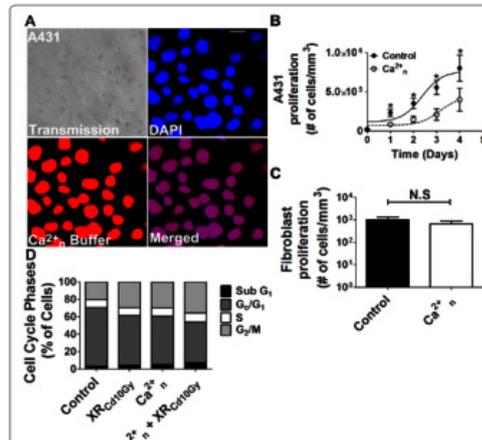
surviving tumor cell fractions occurs. There is, therefore, an urgent need to exploit new targets, which in combination with X-rays could improve therapeutic options for human SCC. An important molecular target to address is the intracellular  $Ca^{2+}$ , since it plays a vital role in cell proliferation [28]. In fact, it was recently demonstrated that nuclear, rather than cytosolic  $Ca^{2+}$  regulates the growth of liver tumors [11]. We now investigated whether nuclear  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}_n$ ) is involved in the proliferation rate of human SCC and whether it affects the cell sensitivity to irradiation. For that, A431 cells were infected with a construct that has the ligand binding site domain (residues 224-605) of the intracellular  $Ca^{2+}$  channel, type I  $IP_3R$ . This segment of  $IP_3R1$  specifically binds to  $IP_3$  with sufficient affinity to compete for the binding to the native receptor [29]. The construct is targeted to the nucleus using a

nuclear localization signal and it contains mRFP to verify intracellular localization [18]. The efficiency and selectivity of the vector to buffer  $Ca^{2+}$  in the nucleus were previously demonstrated [18,30]. In order to maximize the expression of the  $Ca^{2+}_n$  to a higher number of cells we now use an adenovirus delivery system (Figure 3A). We measured cell proliferation directly by cell counting and found that  $Ca^{2+}_n$  buffering significantly decrease A431 proliferation rate to approximately 50% of controls (Figure 3B). On the other hand,  $Ca^{2+}_n$  buffering did not affect proliferation of normal human gingival fibroblast (Figure 3C). It was previously demonstrated that  $Ca^{2+}_n$  buffering increased the fraction of tumor liver cells in  $G_2/M$  transition phase acting during early mitosis to decrease cell proliferation [11]. We then used flow cytometry to analyze A431 cell cycle phases. The cells were submitted to  $XR_{ca}10Gy$

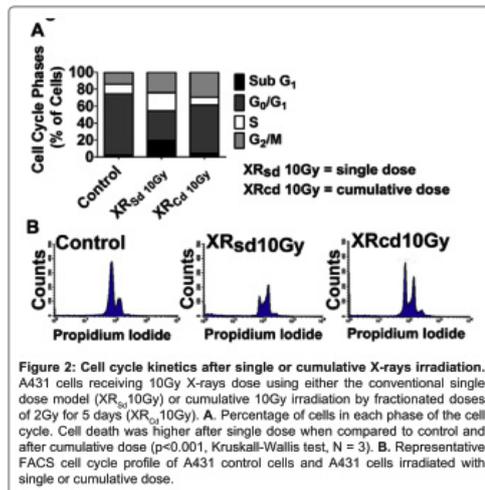


or  $Ca^{2+}_n$  buffering single therapies, as well as to association therapy, and compared to untreated cells. In populations that received either X-rays irradiation or expressed  $Ca^{2+}_n$  buffer, there was a significant ( $p < 0.01$ ) increase in the percentage of cells in the  $G_2/M$  phase ( $29.6 \pm 2.7\%$ , and  $29.9 \pm 3.4\%$ , respectively), but a reduction in the  $G_1/G_1$  phase ( $57.1 \pm 3.6\%$ , and  $55.4 \pm 4.5\%$ , respectively), with no change in the percentage of cells in Sub $G_1$  phase ( $4.3 \pm 2.4\%$ , and  $5.1 \pm 1.7\%$ , respectively), relative to control ( $3.0 \pm 1.5\%$ ,  $p > 0.05$ ) (Figure 3D). However, association therapy increased even more the percentage of cells in  $G_2/M$  phase ( $35.7 \pm 2.0\%$ ,  $p < 0.001$ ), and caused a small, but significant increase in the percentage of cells in Sub $G_1$  phase ( $7.3 \pm 2.5\%$ ,  $p < 0.05$ ), compared to control (Figure 3D). We then investigated whether  $Ca^{2+}_n$  buffering, besides affecting cell cycle profile, would be able to drive tumor cells to a more susceptible radiation-induced DNA damage. Therefore, we evaluated nuclear and mitochondrial DNA lesions, in cells that were exposed to association therapy in comparison with each treatment alone and untreated cells (Supplementary Figure 4A-4B). We observed no difference in nuclear DNA lesions among the experimental conditions. At earlier time point of the association therapy we observed a small increase in mitochondrial DNA lesions ( $1.4 \pm 0.2\%$  vs  $0.1 \pm 0.002\%$  in control cells,  $p < 0.05$ ), an effect not observed at later time interval. Additionally, we found no effect on mitochondrial activity under any experimental condition (Supplementary Figure 4C). Together, these findings show that  $Ca^{2+}_n$  buffering decreases the rate of human SCC proliferation, and when associated with cumulative X-rays irradiation it arrests the cells in  $G_2/M$  transition to a higher extent compared to each treatment alone, without affecting nuclear or mitochondrial DNA lesions. In fact, the observed absence of DNA damage correlates with the well-known ability of SCC to repair DNA lesions induced by irradiation [31].

Aggressive tumor behavior and increased tumor resistance to cytotoxic agents, such as X-rays, is known to present dysregulated EGFR signaling cascade [4,7,32]. Moreover, X-rays can increase the expression of members of metalloproteinase (ADAM) family that are thought to mediate the shedding of EGFR ligands, a critical step

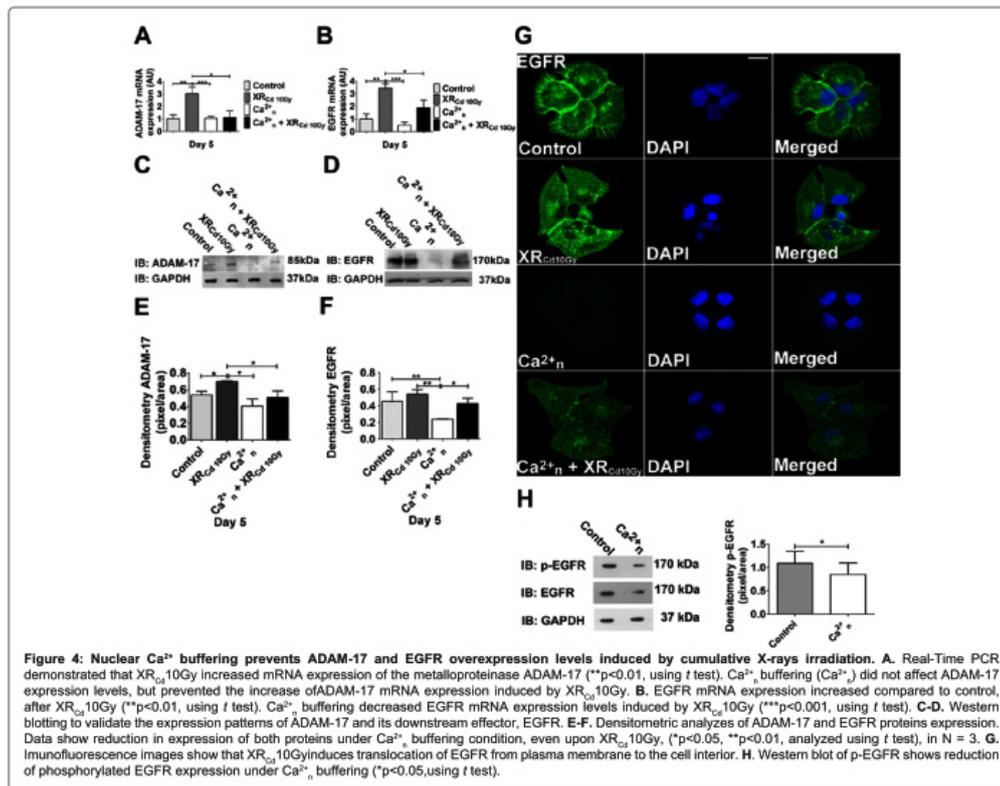


**Figure 3: Association therapy affects cell cycle progression.** A. Representative image of adenovirus infection on A431 cells. Superior panels show transmission image of A431 cells and nuclei stained with DAPI (blue). Left inferior panel shows expression of the  $Ca^{2+}_n$  buffering cassette (red). Merged image on right inferior panel confirms expression of nuclear  $Ca^{2+}_n$  buffering in 100% of the cells. B. Cell growth curve of A431 cells 24, 48, 72 and 96 h in control conditions and after infection with a type V adenovirus construct that buffers  $Ca^{2+}_n$  signaling. Proliferation is decreased upon  $Ca^{2+}_n$  buffering compared to control, ( $p < 0.0001$ , *t* test was used for each day of experiment, and one-way analysis of variance, Bartlett's test for equal variances, for all groups,  $N = 3$ ). C. Cell proliferation of human gingival fibroblast at 96 h under control or  $Ca^{2+}_n$  buffering condition. There were no significant changes in cell proliferation between control and fibroblasts that had  $Ca^{2+}_n$  buffered ( $N = 3$ ). D. Cell cycle phase analysis of A431 cells under control conditions, XR $_{cd}$ 10Gy,  $Ca^{2+}_n$ , and after  $Ca^{2+}_n + XR_{cd}$ 10Gy conditions. Under association therapy the number of cells in  $G_2/M$  phase increased compared to control. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate measurements and are representative of  $N = 3$  experiments ( $p < 0.05$ , one-way analysis of variance).



**Figure 2: Cell cycle kinetics after single or cumulative X-rays irradiation.** A431 cells receiving 10Gy X-rays dose using either the conventional single dose model (XR $_{sd}$ 10Gy) or cumulative 10Gy irradiation by fractionated doses of 2Gy for 5 days (XR $_{cd}$ 10Gy). A. Percentage of cells in each phase of the cell cycle. Cell death was higher after single dose when compared to control and after cumulative dose ( $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test,  $N = 3$ ). B. Representative FACS cell cycle profile of A431 control cells and A431 cells irradiated with single or cumulative dose.

for the production of soluble functional agonists for growth factor receptors [33]. We then investigated whether association of  $Ca^{2+}_n$  buffering would affect expression of ADAM-17 and EGFR induced by XR $_{cd}$ 10Gy, at RNA and protein levels (Figure 4). Real-time PCR showed, as expected, that X-rays irradiation increased expression of ADAM-17 and EGFR to  $3.0 \pm 0.5AU$ , and to  $3.4 \pm 0.3AU$ , respectively, compared to  $1.0 \pm 0.3AU$  and  $1.0 \pm 0.4AU$  in control conditions (Figure 4A-4B,  $^{**}p < 0.01$ ).  $Ca^{2+}_n$  buffering did not alter the expression levels of ADAM-17 but reduced expression of EGFR to  $0.5 \pm 0.2AU$ , below the expression level of untreated cells ( $^{***}p < 0.001$ ). Under association therapy the expression of ADAM-17 and EGFR were  $1.1 \pm 0.5AU$ , or  $1.8 \pm 0.6AU$ , compared to control ( $^{*}p < 0.05$ ). These results were also investigated at protein level (Figure 4C-4F). We found that the expression of ADAM-17 increased to  $0.69 \pm 0.01AU$  in cells submitted to XR $_{cd}$ 10Gy and reduced to  $0.45 \pm 0.1AU$ , or to  $0.50 \pm 0.07AU$  in cells under  $Ca^{2+}_n$  buffering or association therapy, respectively ( $p < 0.05$ ). On the other hand, we found that X-rays irradiation did not alter EGFR protein expression level, but the buffering of  $Ca^{2+}_n$  decreased EGFR expression below control level, even under XR $_{cd}$ 10Gy ( $0.23 \pm 0.01AU$  in  $Ca^{2+}_n$  buffered cells vs  $0.42 \pm 0.09AU$  in association therapy vs  $0.45 \pm 0.19AU$  in control cells,  $^{*}p < 0.05$   $^{**}p < 0.01$ ), (Figure 4C-4F). The observed changes in the expression level of ADAM17 and EGFR are



specific, since the internal control (GADPH) used in each situation was unaffected under similar nuclear  $Ca^{2+}$  buffering condition.

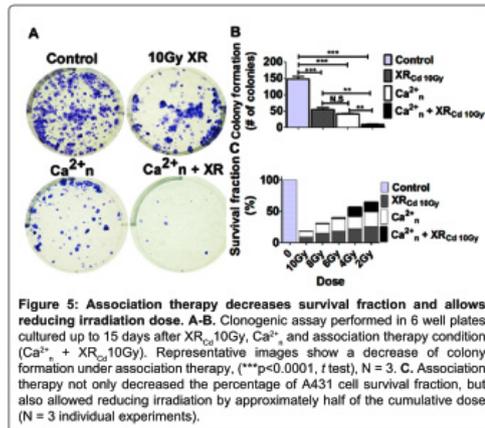
It is known that exposure to irradiation triggers internalization of EGFR from the plasma membrane to cell interior due to EGFR activation [34]. Therefore, we investigated whether  $Ca^{2+}_n$  buffering would alter EGFR internalization induced by  $XR_{Ca}10Gy$ . For that, we performed immunofluorescence, and found that  $Ca^{2+}_n$  buffering not only reduced EGFR expression level, but also reduced EGFR internalization, upon  $XR_{Ca}10Gy$  (Figure 4G). Additionally, phosphorylation levels of EGFR were reduced following  $Ca^{2+}_n$  buffering, indicating less activation of the receptor (Figure 4H). Together, these data show that  $XR_{Ca}10Gy$  triggers prosurvival mechanisms in A431 cells, which could be regarded as an adaptive response to radiation damage, and be associated with radioresistance.  $Ca^{2+}_n$  buffering were shown to render these tumor cells more susceptible to radiation, by preventing ADAM-17 over expression and consequently EGFR activation.

#### Association therapy decreases cell survival fractions and allows reducing X-rays dose

Activation of EGFR signaling by radiation is known to be related with increased cellular proliferation between radiation fractions,

what may accelerate repopulation of tumor cell clonogens during treatment [31]. Rapid repopulation of tumor cells can lead to an earlier appearance of post-irradiation recurrences, and can therefore reduce the probability of tumor cure by radiotherapy. We then investigated, by clonogenic assay, whether  $Ca^{2+}_n$  buffering would decrease or delay post-irradiation proliferation of human SCC (Figure 5). For that, A431 cells were exposed to  $Ca^{2+}_n$  buffering in association with  $XR_{Ca}10G$ , followed by an *in vitro* cell clonogenic assay, performed 15 days after the end of the irradiation protocol. We observed that  $XR_{Ca}10Gy$  decreased colony formation by  $36 \pm 2.5\%$  ( $54 \pm 11$  colonies), while  $Ca^{2+}_n$  buffering decreased colony formation by  $28 \pm 2\%$  ( $41 \pm 3$  colonies) compared to  $148 \pm 14$  colonies in control (\*\* $p < 0.001$ ), (Figure 5A-5B). Association therapy almost completely abolished colony formation. We found a decrease in colony formation by  $91 \pm 0.4\%$  ( $9 \pm 2$  colonies) compared to control (\*\* $p < 0.0001$ ). The radiation enhancement ratio of colony formation between X-rays treatment alone and X-rays associated with nuclear  $Ca^{2+}$  buffering strategy was 6. These data indicates that repopulation of cells is significantly reduced under association therapy.

Intensification of radiotherapy for locally advanced SCC, by use of altered fractionation schedules or concomitant chemotherapy, has resulted in substantially improved loco regional control and survival.



**Figure 5: Association therapy decreases survival fraction and allows reducing irradiation dose.** A-B. Clonogenic assay performed in 6 well plates cultured up to 15 days after XR<sub>Ca</sub>10Gy, Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> and association therapy condition (Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> + XR<sub>Ca</sub>10Gy). Representative images show a decrease of colony formation under association therapy, (\*\*\*p<0.0001, t test), N = 3. C. Association therapy not only decreased the percentage of A431 cell survival fraction, but also allowed reducing irradiation by approximately half of the cumulative dose (N = 3 individual experiments).

However, these improvements have come at the cost of increased acute, and late, toxic effects. For instance, in case of head and neck radiotherapy, dysphagia and xerostomia have a negative impact on quality of life [35,36]. Then, we investigated whether the association treatment modality would allow reducing the X-rays dose instead. For that, we evaluated the percentage of survival fraction in cells that received progressively less cumulative irradiation doses, under association with Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> buffering treatment. We found that decreasing cumulative irradiation dose to 6Gy in association with Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> buffering treatment, maintained the survival fraction to values similar to what was observed for 10Gy (Figure 5C). These results show that association therapy not only reduced the percentage of survival cells, but also allowed reducing the X-rays cumulative dose to approximately half of the total dose.

Collectively, we now show that Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> buffering reduces A431 cell proliferation and radiosensitizes these cells to fractionated X-rays irradiation, at least in part through a mechanism that involves reducing expression of ADAM-17 and EGFR activation. Combining Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> buffering with XR<sub>Ca</sub>10Gy also decreases survival fraction percentage of A431 cells and allows reducing the cumulative radiation dose. Therefore, Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> buffering may have a therapeutic potential for the treatment of SSC.

## Discussion

It is well established that increases in Ca<sup>2+</sup> signals occur in the cytoplasm and in the nucleus. Initial studies suggested that nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> passively follow changes in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> [37-40]. However, additional studies demonstrated that intranuclear IP<sub>3</sub> can increase Ca<sup>2+</sup> directly within the nucleus, both in isolated nuclei [41-43], and in nuclei within intact cells [44,45]. It was also demonstrated that the nucleus contains Ca<sup>2+</sup> stores including a nucleoplasmic reticulum [44], plus PIP<sub>2</sub> [46], PLC [47], and IP<sub>3</sub> receptors [48-52], collectively showing that the nucleus has the machinery needed to locally increase Ca<sup>2+</sup>, independently from the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> signals. Additionally, there is evidence that Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> signals result from PIP<sub>2</sub> hydrolysis and IP<sub>3</sub> formation directly within the nucleus [18,30]. It has been long recognized that Ca<sup>2+</sup> signals exerts an important role throughout the mammalian cell cycle and is especially important during early G<sub>1</sub>, at

G<sub>1</sub>/S and G<sub>2</sub>/M transitions, with the first Ca<sup>2+</sup> transient occurring just prior to entry into mitosis and the second one occurring during the metaphase-anaphase transition [53]. However, more recent findings demonstrated that nucleoplasmic, rather than cytosolic Ca<sup>2+</sup> is essential for cancer cell proliferation, regulating cell cycle progression through early prophase [11]. This finding was confirmed in *in vivo* study, showing that liver tumors implanted in nude mice grew much more slowly when expressing a Ca<sup>2+</sup> chelating protein, parvalbumin, in tumor cells nuclei, but not in the cytosol [11]. We now found that Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> is also important in regulating SCC proliferation rate, an effect that was not observed in normal human gingival fibroblast, suggesting higher selectivity of Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> towards controlling cancer cells growth. Our results are in agreement with previous data that demonstrated that although Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> regulates the growth of liver cancer cell line [11], hepatocyte proliferation during liver regeneration is regulated by cytosolic Ca<sup>2+</sup> instead [54].

Further studies are needed to determine the mechanistic basis for differential sensitivity of normal versus cancer cell proliferation to Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub>. Nonetheless, one benefit of these findings altogether is that buffering Ca<sup>2+</sup><sub>n</sub> could be a strategy used to inhibit the growth of tumors, either alone or in association therapy, to decrease the overall tumor burden, without affecting normal tissue. Although radiotherapy is the standard procedure indicated to treat SCC [35], radioresistance is often observed [2]. In this context, there is urgent need to incorporate combined protocols to radiotherapy, with the goal to become a potentially curative option. In our current study, we designed an irradiation setup similar to routine clinical radiotherapy protocol, allowing evaluation of the cellular effects of X-rays on cell survival. Using our setup model, we demonstrated that the association therapy stately decreased SCC repopulation. We further demonstrated that the association therapy had the potential to minimize the irradiation toxicity, by keeping the surviving clonogenic cells to a lower rate, even under reduced total X-rays dose. Although, colony formation assay may involve events that reflect cell cycle progression, apoptosis, necrosis, and others, we had previously reported in liver cancer cells that nuclear Ca<sup>2+</sup> buffering does not play a role in apoptosis [11]. Our previous and current data indicate that the beneficial effect of nuclear Ca<sup>2+</sup> buffering in antitumor therapy is not due to its role in apoptosis, but instead due to changes caused in expression level of genes involved in the regulation of cell proliferation. Moreover, our findings could not be attributed to bystander effects, since in our irradiation model, in which tissue flasks are fulfilled with medium and immersed into water phantom, the dose applied to the cells monolayer was accurately calculated. This is distinct from the majority of the *in vitro* irradiation models in which tissue flasks containing cell monolayer are irradiated under air column. In this aspect, it is already demonstrated that when the thickness of the nutrient medium height above cells monolayer is lower than the electronic equilibrium depth (buildup depth) it is very difficult to determine the dose received by the cells [55]. The buildup depth is a function of energy photon beam [25] and as a result higher energy beam needs higher column of nutrient medium to assure complete electronic equilibrium in the cells position. When culture flasks are irradiated in air, because of the loss of lateral equilibrium, the buildup effect impinges the same uncertainty in the received dose by the cells, which is in the flask border, even if the column height of nutrient medium is sufficient to assure buildup. This is an important aspect to be considering when studying the effects of X-rays on cancer cells, since there are several evidences demonstrating changes in cell survival after irradiation, due to differences among energy spectrum and scattering caused by bystander effects [22,56].

Multiple factors have been shown to be involved in the cellular radiosensitivity of cancer cells [22,56]. For instance, it has been demonstrated that irradiation activates ADAM's members and induces cell growth through the release of EGFR ligand [33]. EGFR activation in turn, also mediates cytoprotective responses that reduces cell sensitivity to radiotherapy [4,57]. Moreover, it is also known that ADAM-17 over expression correlates with shorter survival rate of the patients due to several distinct growth and invasive pathways activated by this protease [58]. Indeed, in line with these data, we found that under our fractionated irradiation protocol in A431 cells, ADAM-17 expression and EGFR activation increased. However,  $Ca^{2+}_n$  buffering not only prevented the increase in ADAM-17 expression and EGFR activation induced by irradiation, but also, by itself, it was able to decrease the expression of EGFR below control levels. Although, characterization of the link between  $Ca^{2+}_n$  signals and changes in ADAM-17 and EGFR expression levels are beyond the scope of this study, our recent findings showed that  $Ca^{2+}_n$  can regulate genes involved in cell proliferation, through a putative Elk-1 binding site present in the gene promoter region [12]. Indeed, Elk-1 transactivation was demonstrated to be dependent on nuclear rather than cytosolic  $Ca^{2+}$  [59]. Therefore, it is possible that  $Ca^{2+}_n$  regulate ADAM-17 and EGFR expression through modulation of a  $Ca^{2+}$ -dependent transcription factor activity.

Numerous EGFR blockers have been studied, as a therapeutic agent for the treatment of SCC [60]. Similarly, anti-ADAM-17 antibodies, as well as orally administrated ADAM inhibitor, have been used for treatment of solid tumors [60,61]. ADAM-17 and EGFR activate several physiological functions and systemic inhibition of these pathways represents a greater risk of multiple and severe side effects. The buffering of  $Ca^{2+}_n$  seems a promising strategy, since under our experimental condition, nucleoplasmic  $Ca^{2+}$  was only slightly reduced, and not completely chelated [18,30]. In this aspect, physiological functions mediated by  $Ca^{2+}_n$ , at least in part, could be preserved. Moreover, using ionizing radiation concomitant with  $Ca^{2+}_n$  buffering, showed a superior outcome, compared to irradiation alone, and allowed to reduce the irradiation dose. Together, our findings indicate  $Ca^{2+}_n$  buffering in conjunction with radiotherapy as a therapeutic potential for the treatment of human squamous cell carcinoma.

#### Author Contribution

L.M.A., J.M.G., A.F.P.L., C.R.M., R.R.R., E.M.S.F., C.L.Z. and M.F.L. designed research; L.M.A., J.M.G., A.M.C., S.Y., M.A.R., C.J.A., S.M.C. and M.F.L. performed research; O.X.G., M.T.T.L. and D.A.G. contributed new reagent or analytic tools; L.M.A., J.M.G., O.A.M.F. and M.F.L. analyzed data; L.M.A., J.M.G., O.A.M.F. and M.F.L. wrote the paper.

#### Conflict of Interest

All authors disclose that there is no conflict of interest as any financial and personal relationship with people or organizations, employment, consultancies, stock ownership, honoraria, patent registration that could influence this research inappropriately.

This research was supported by grants from Brazilian agencies FAPEMIG/PRONEX, CNPq, CAPES and from United States Howard Hughes Medical Institute

#### Acknowledgements

We acknowledge Dr. Rogério Aguiar from Axial Image Center; Dr. Mateus T. Guerra and Dr. Michael H. Nathanson for carefully reading the manuscript; Cristina Armond, Ana B. Queiróz and Gilson Nogueira for their technical support. We also thank Acrilidam by platform construction, PDTIS/FIOCRUZ and CEMEL/UFMG for use their facilities. This research was supported by Grants from HHMI (USA), CAPES, CNPq, FAPEMIG and PRONEX (Brazil).

#### References

1. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM (2007) The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86:104-114.

2. Diaz EM, Kies MS, Sturgis EM, Clayman L, Laramore GE, et al. (2006) *Head and Neck: Cancer Medicine* (7th edn), BC Decker, Hamilton, Ontario.
3. Affolter A, Fruth K, Brochhausen C, Schmidtman I, Mann WJ, et al. (2011) Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism. *Head Neck* 33: 1448-1457.
4. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G, Lin PS (2003) ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 22: 5855-5865.
5. Jonathan RA, Wijffels KI, Peeters W, de Wilde PC, Marres HA, et al. (2006) The prognostic value of endogenous hypoxia-related markers for head and neck squamous cell carcinomas treated with ARCON. *Radiother Oncol* 79: 288-297.
6. Paganetti H (2005) Changes in tumor cell response due to prolonged dose delivery times in fractionated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63: 892-900.
7. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, et al. (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62: 7350-7356.
8. Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z (2003) The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 246-254.
9. Todd DG, Mikkelsen RB (1994) Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free  $[Ca^{2+}]_i$  in human epithelial tumor cells. *Cancer Res* 54: 5224-5230.
10. Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1793: 933-940.
11. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, et al. (2007) Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* 282: 17061-17068.
12. Andrade V, Guerra M, Jardim C, Melo F, Silva W, et al. (2011) Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain. *J Hepatol* 55: 626-635.
13. Foo CC, Lee JS, Gullanno V, Yan X, Tan SH, et al. (2007) Squamous cell carcinoma and Bowen's disease of the skin in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 36: 189-193.
14. Bonner JA, Trummel HQ, Willey CD, Plants BA, Raisch KP (2009) Inhibition of STAT-3 results in radiosensitization of human squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 92: 339-344.
15. Sah NK, Munshi A, Nishikawa T, Mukhopadhyay T, Roth JA, et al. (2003) Adenovirus-mediated wild-type p53 radiosensitizes human tumor cells by suppressing DNA repair capacity. *Mol Cancer Ther* 2: 1223-1231.
16. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, et al. (1997) Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 15: 1191-1197.
17. Xiao H, Zhang Q, Shen J, Bindokas V, Xing HR (2010) Pharmacologic inactivation of kinase suppressor of Ras1 sensitizes epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras-dependent tumors to ionizing radiation treatment. *Mol Cancer Ther* 9: 2724-2736.
18. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P, et al. (2008) c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 283: 4344-4351.
19. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 1: 2315-2319.
20. Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1: 1458-1461.
21. Guerra MT, Fonseca EA, Melo FM, Andrade VA, Aguiar CJ, et al. (2011) Mitochondrial calcium regulates rat liver regeneration through the modulation of apoptosis. *Hepatology* 54: 296-306.
22. Hall EJ, Giaccia AJ (2006) *Radiobiology for the Radiologist*. (3rd edn), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
23. Yan D, Lockman D, Brabbins D, Tyburski L, Martinez A (2000) An off-line strategy for constructing a patient-specific planning target volume in adaptive treatment process for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48: 289-302.
24. Kantzou I, Platoni K, Sandilos P, Gouliamos A, Kouvaris I, et al. (2011)

Conventional versus virtual simulation for radiation treatment planning of prostate cancer: final results. *J BUON* 16: 309-315.

25. Khan FM (2010) The physics of radiation therapy. (4th edn), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

26. Yorke E, Geilblum D, Ford E (2011) Patient safety in external beam radiation therapy. *AJR Am J Roentgenol* 196: 768-772.

27. Purdy JA (2008) Principles of radiologic physics, dosimetry and treatment planning: Principles and Practice of Radiation Oncology. (5th edn), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

28. Cerella C, Diederich M, Ghibelli L (2010) The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol* 2010: 546163.

29. Várnai P, Lin X, Lee SB, Tuymetova G, Bondeva T, et al. (2002) Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J Biol Chem* 277: 27412-27422.

30. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH (2008) Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48: 1621-1631.

31. Rosier JF, Michaux L, Ameye G, Cedervall B, Libouton JM, et al. (2003) The radioenhancement of two human head and neck squamous cell carcinomas by 2'-2' difluoro deoxycytidine (gemcitabine; dFdC) is mediated by an increase in radiation-induced residual chromosome aberrations but not residual DNA DSBs. *Mutat Res* 527: 15-26.

32. Milas L, Fan Z, Andrascshke NH, Ang KK (2004) Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 966-971.

33. Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 32-43.

34. Cai CQ, Peng Y, Buckley MT, Wei J, Chen F, et al. (2008) Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations. *Oncogene* 27: 3201-3210.

35. Dirix P, Nuyts S (2010) Evidence-based organ-sparing radiotherapy in head and neck cancer. *Lancet Oncol* 11: 85-91.

36. Ramaekers BL, Joore MA, Grutters JP, van den Ende P, Jong J, et al. (2011) The impact of late treatment-toxicity on generic health-related quality of life in head and neck cancer patients after radiotherapy. *Oral Oncol* 47: 768-774.

37. Albritton NL, Oancea E, Kuhn MA, Meyer T (1994) Source of nuclear calcium signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12458-12462.

38. Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, et al. (1993) Nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J* 12: 4813-4819.

39. Hennager DJ, Welsh MJ, DeLisle S (1995) Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 270: 4959-4962.

40. Lipp P, Thomas D, Berridge MJ, Bootman MD (1997) Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J* 16: 7166-7173.

41. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell* 80: 439-444.

42. Malviya AN, Rogue P, Vincendon G (1990) Stereospecific inositol 1,4,5-[32P] trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9270-9274.

43. Stehno-Bittel L, Perez-Terzic C, Clapham DE (1995) Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca<sup>2+</sup> store. *Science* 270: 1835-1838.

44. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5: 440-446.

45. Santella L, Kyoizuka K (1997) Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca<sup>2+</sup> transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium* 22: 11-20.

46. Cocco L, Gilmour RS, Ognibene A, Letcher AJ, Manzoli FA, et al. (1987) Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J* 248: 765-770.

47. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, et al. (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358: 242-245.

48. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, et al. (2008) Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium* 44: 230-242.

49. Koppler P, Matter N, Malviya AN (1993) Evidence for stereospecific inositol 1,3,4,5-[3H]tetrakisphosphate binding sites on rat liver nuclei. Delineating inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate interaction in nuclear calcium signaling process. *J Biol Chem* 268: 26248-26252.

50. Mak DO, Foskett JK (1994) Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J Biol Chem* 269: 29375-29378.

51. Malviya AN (1994) The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors. *Cell Calcium* 16: 301-313.

52. Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham DE (1995) Calcium release from the nucleus by InsP<sub>3</sub> receptor channels. *Neuron* 14: 163-167.

53. Roderick HL, Cook SJ (2008) Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8: 361-375.

54. Lagoudakis L, Garcin I, Julien B, Nahum K, Gomes DA, et al. (2010) Cytosolic calcium regulates liver regeneration in the rat. *Hepatology* 52: 602-611.

55. Severin E, Kronholz HL, Köhlein W, Göhde W (2005) Dosimetry of soft x-rays in thin liquid layers. *Phys Med Biol* 50: 1459-1467.

56. Bewes JM, Suchowerska N, Jackson M, Zhang M, McKenzie DR (2008) The radiobiological effect of intra-fraction dose-rate modulation in intensity modulated radiation therapy (IMRT). *Phys Med Biol* 53: 3567-3578.

57. Newsheem S, Bonner JA, Lobuglio AF, Trummell H, Whitley AC, et al. (2011) Cetuximab augments cytotoxicity with poly (adp-ribose) polymerase inhibition in head and neck cancer. *PLoS One* 6: e24148.

58. Kornfeld JW, Meder S, Wohlberg M, Friedrich RE, Rau T, et al. (2011) Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression. *Br J Cancer* 104:138-145.

59. Pustl T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, et al. (2002) Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 277: 27517-27527.

60. Nestor M, Sundström M, Anniko M, Tolmachev V (2011) Effect of cetuximab in combination with alpha-radioimmunotherapy in cultured squamous cell carcinomas. *Nucl Med Biol* 38: 103-112.

61. Witters L, Scherle P, Friedman S, Fridman J, Caulder E, et al. (2008) Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res* 68: 7083-7089.

**Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions**

**Unique features:**

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

**Special features:**

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at [www.editorialmanager.com/cancerscience/](http://www.editorialmanager.com/cancerscience/)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI  
Comitê de Ética em Pesquisa/CEP



Ofício nº 019/09

Diamantina, 10 de março de 2009.

A Sua Senhoria, a Senhora  
Profª. Melissa Monteiro Guimarães  
Departamento de Ciências Básicas - FCBS  
UFVJM

Assunto: Parecer Consubstanciado Projeto 088/08

Prezada Pesquisadora,

O projeto protocolado sob o registro provisório nº 088/08 e intitulado: "Avaliação da liberação de mediadores químicos de fibroblastos humanos *in vitro* submetidos a estímulo com a proteína solúvel  $\beta$ -amilóide", sob sua coordenação, foi reavaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e, tendo em vista a apresentação das correções sugeridas por este Comitê e, portanto, a conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, recebeu o parecer **APROVADO**. Seu número de registro definitivo é 003/09.

O estudo tem como objetivo geral "verificar o perfil liberação de mediadores químicos de fibroblastos humanos *in vitro* submetidos a estímulo com a proteína  $\beta$ -amilóide".

Deverá ser apresentado relatório de pesquisa a este Comitê um ano após a aprovação do projeto.

Atenciosamente,

  
**Prof. M.Sc. Nádia Verônica Halboth**  
Coordenadora CEP/UFVJM  
Nadia Verônica Halboth  
Coordenadora  
CEP / UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS



Diamantina, 04 de dezembro de 2011

### OFÍCIO

Eu, Melissa Monteiro Guimarães, professora de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da UFVJM; confirmo a doação de fibroblastos gengivais humanos (*in vitro*) obtidos a partir de fragmentos cirúrgicos de pacientes da Clínica de Odontologia desta mesma instituição para desenvolvimento do projeto de doutorado da aluna Lídia Maria de Andrade sob orientação da Professora Maria de Fátima Leite (Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG). Ratifico ainda, que os pacientes incluídos neste estudo foram esclarecidos pelos pesquisadores sobre os objetivos do trabalho e em concordância, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo comitê de ética da UFVJM (sob o número 003/09). Em anexo encontra-se o comprovante de aprovação do comitê de ética.

Atenciosamente,

---

Melissa Monteiro Guimarães  
melissa.ufvjm@gmail.com  
(professora de Farmacologia  
Departamento de Ciências Básicas  
UFVJM)

**Display Settings:** Summary, Sorted by Recently Added

## Results: 5

- [The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver.](#)
  1. Amaya MJ, Oliveira AG, Guimarães ES, Casteluber MC, Carvalho SM, Andrade LM, Pinto MC, Mennone A, Oliveira CA, Resende RR, Menezes GB, Nathanson MH, Leite MF. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):274-83. doi: 10.1002/hep.26609. Epub 2013 Jul 29. PMID: 23839970 [PubMed - in process]
  
- [Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus.](#)
  2. Resende RR, Andrade LM, Oliveira AG, Guimarães ES, Guatimosim S, Leite MF. *Cell Commun Signal*. 2013 Feb 21;11(1):14. doi: 10.1186/1478-811X-11-14. PMID: 23433362 [PubMed] [Free PMC Article](#)
  
- [Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity.](#)
  3. Amaral SS, Oliveira AG, Marques PE, Quintão JL, Pires DA, Resende RR, Sousa BR, Melgaço JG, Pinto MA, Russo RC, Gomes AK, Andrade LM, Zanin RF, Pereira RV, Bonorino C, Soriani FM, Lima CX, Cara DC, Teixeira MM, Leite MF, Menezes GB. *Cell Commun Signal*. 2013 Feb 5;11(1):10. doi: 10.1186/1478-811X-11-10. PMID: 23384127 [PubMed] [Free PMC Article](#)
  
- [Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy.](#)
  4. Arantes LA, Aguiar CJ, Amaya MJ, Figueiró NC, Andrade LM, Rocha-Resende C, Resende RR, Franchini KG, Guatimosim S, Leite MF. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Oct;53(4):475-86. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.06.017. Epub 2012 Jul 2. PMID: 22766271 [PubMed - indexed for MEDLINE]
  
- [Mitochondrial calcium regulates rat liver regeneration through the modulation of apoptosis.](#)
  5. Guerra MT, Fonseca EA, Melo FM, Andrade VA, Aguiar CJ, Andrade LM, Pinheiro AC, Casteluber MC, Resende RR, Pinto MC, Fernandes SO, Cardoso VN, Souza-Fagundes EM, Menezes GB, de Paula AM, Nathanson MH, Leite Mde F. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):296-306. doi: 10.1002/hep.24367. PMID: 21503946 [PubMed - indexed for MEDLINE] [Free PMC Article](#)

# Câncer enfraquecido

Aprisionar o cálcio em compartimento no núcleo das células torna o tumor mais vulnerável à radioterapia

Igor Zolnerkevic

**B**ombardear um tumor com raios X pode impedir que ele se espalhe pelo corpo. Mas é uma operação delicada. Mesmo que a radioterapia elimine a maioria das células cancerígenas por danificar o DNA e a induzi-las à morte, as poucas restantes podem sofrer mutações que as tornam imunes aos efeitos da radiação e aumentam sua capacidade de se reproduzir. Assim, o tumor volta a crescer, mais rápido e mais resistente, e a única opção dos médicos é removê-lo por meio de cirurgia. No caso do câncer de cabeça e pescoço, no entanto, esse último recurso é muitas vezes mutilador. Ele prejudica a estética, a deglutição, a fala e até mesmo a respiração.

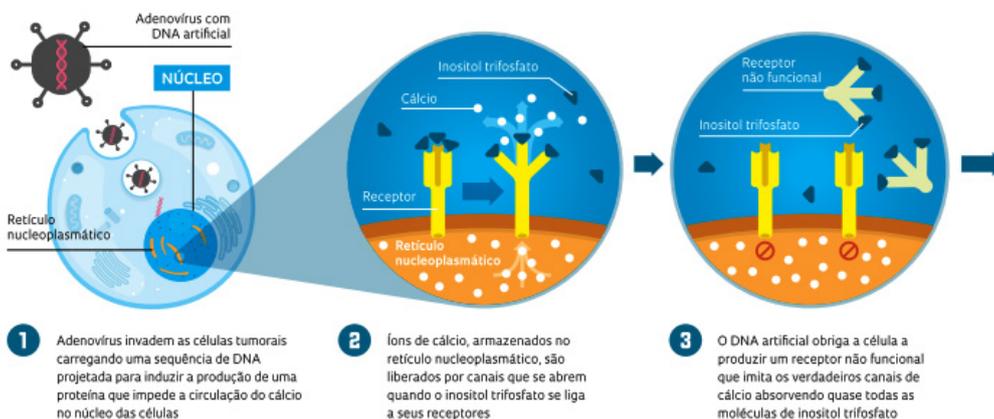
Buscando um modo mais eficiente de combater esse tipo de tumor, uma equipe multidisciplinar de 18 pesquisadores de Minas Gerais e de São Paulo desenvolveu uma estratégia promissora para tornar as células tumorais mais sensíveis à radiação. Publicados em maio deste ano no *Journal of Cancer Science and Therapy*, os resultados da pesquisa, ainda em fase pré-clínica, sugerem que a radioterapia, acompanhada de um procedimento que impede a livre circulação de íons de cálcio no núcleo das células pode reduzir

pela metade o tempo de exposição à radiação e diminuir drasticamente o risco de reincidência do tumor.

Sob a supervisão da bióloga celular Maria de Fátima Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e do imunologista Olindo Assis Martins Filho, do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte, a pesquisadora Lídia Maria Andrade concebeu essa estratégia. Quando ainda era estudante de odontologia, Lídia teve a oportunidade de acompanhar de perto o sofrimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Provocado principalmente pelo fumo e pelo consumo de álcool, ele é a oitava maior causa de morte por câncer no mundo. Só o câncer na cavidade oral deve atingir mais de 14 mil pessoas este ano no Brasil, estima o Instituto Nacional do Câncer. O médico João Victor Salvajoli, especialista em radioterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, em São Paulo, explica que no tratamento do câncer de cabeça e pescoço a radioterapia é geralmente aliada a uma quimioterapia com substâncias que deixam as células mais sensíveis à radiação. Os efeitos colaterais são uma série de lesões na pele e na mucosa que

## Paralisando um tumor

Terapia gênica tampona cálcio no núcleo de células tumorais, impedindo que se reproduzam



podem afetar gravemente a deglutição, o paladar e a salivação. Além disso, há um alto risco de recidiva da doença.

Em 2008, interessada em descobrir algo que pudesse diminuir ainda mais a resistência das células do câncer de cabeça e pescoço à radiação, Lídia procurou Maria de Fátima, cujas pesquisas na última década se concentraram no estudo do papel que os íons de cálcio do núcleo celular desempenham na multiplicação de tumores. As pesquisadoras decidiram então investigar se o tamponamento do fluxo de cálcio nuclear diminuiria a resistência à radiação dessas células.

### CANAIS BLOQUEADOS

Os íons de cálcio são peças fundamentais da maquinaria que faz funcionar as células. A concentração maior ou menor de cálcio dispara ou suprime uma série de processos vitais, como a ativação de genes. Dentro das células há uma organela com vários compartimentos que armazenam os íons de cálcio e é conhecida pelo nome de retículo endoplasmático. As paredes desse retículo são repletas de proteínas, entre as quais algumas funcionam como canais. São os chamados canais de cálcio, que permanecem fechados a maior parte do tempo e só se abrem, deixando o íon sair para o citoplasma, quando uma substância específica, o inositol trifosfa-

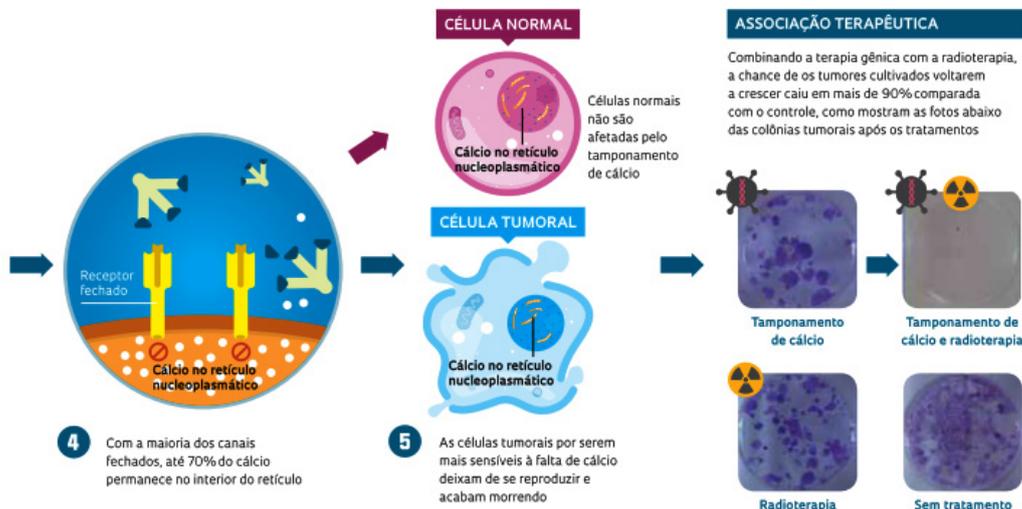
## Aliada ao bloqueio de cálcio, a radioterapia poderia ser feita cortando a dose de radiação pela metade

to, se liga a eles. Passada a necessidade, os íons de cálcio são bombeados de volta ao interior do retículo.

Em 2003, em colaboração com pesquisadores das Universidades de Cornell e Yale, nos Estados Unidos, Maria de Fátima descreveu em um artigo na revista *Nature Cell Biology* como o cálcio do núcleo celular é controlado de maneira independente do cálcio localizado no restante da célula. No núcleo há outro reservatório desses íons, chamado

de retículo nucleoplasmático. Em 2007, com seus colegas de Yale, a pesquisadora publicou um trabalho no *Journal of Biological Chemistry* demonstrando que bloquear a saída de 70% do cálcio do retículo nucleoplasmático reduzia a reprodução das células de um tumor de fígado implantado em camundongos. “O tumor cresceu absurdamente menos que o normal”, lembra a pesquisadora. “Sabe-se, há muito tempo, que o cálcio participa das diferentes fases de multiplicação das células, o chamado ciclo celular”, explica. “O bloqueio do cálcio interrompe o ciclo celular e, assim, a célula não consegue se dividir.”

Tanto no tumor de fígado quanto agora nas células de câncer de cabeça e pescoço cultivadas em laboratório o bloqueio do cálcio foi obtido por meio de uma técnica de engenharia genética. Com o auxílio de um adenovírus artificial, os pesquisadores induziram as células tumorais a produzirem dentro do núcleo uma proteína que imita a parte dos canais de cálcio que se liga ao inositol trifosfato. Com quase todo o inositol trifosfato neutralizado por essas proteínas, a maioria dos verdadeiros canais de cálcio do retículo nucleoplasmático permanece fechada (ver *infográfico acima*). Sem a quantidade necessária de cálcio, as células tumorais diminuem sua capacidade de reprodução.



Esse procedimento proporcionou uma vantagem adicional. O bloqueio do cálcio reduziu apenas a proliferação das células tumorais. Células saudáveis de gengiva, quando submetidas à terapia gênica, continuaram a se reproduzir normalmente. Segundo os pesquisadores, as células saudáveis demonstraram ser menos sensíveis à retenção do cálcio nuclear. Essa constatação sugere que uma terapia baseada nessa estratégia poderia não danificar os tecidos saudáveis em volta do tumor.

#### TESTE REALISTA

Nos testes, Lídia e a equipe do físico Jony Marques Geraldo, do Instituto de Radioterapia São Francisco, em Belo Horizonte, irradiaram com raios X as culturas de células tomando cuidado para que cada uma delas recebesse a mesma quantidade de radiação – o experimento poderia chegar a resultados equivocados caso algumas células recebessem mais ou menos radiação do que as outras. Houve também o cuidado de tentar reproduzir as condições reais de uma radioterapia em seres humanos, um esforço, segundo os pesquisadores, inédito em pesquisas *in vitro*. A irradiação foi realizada em sessões diárias, com a mesma máquina de radioterapia usada em pacientes com câncer, com os frascos das culturas de células dentro de uma plataforma de acrílico de água, que imitava

um corpo humano com tumores. “Nossa preocupação foi chegar o mais próximo possível da situação clínica”, diz Lídia.

O resultado da combinação das terapias foi bastante encorajador. Os pesquisadores observaram nas células tratadas uma redução dos níveis de duas proteínas: a ADAM17 e a EFGR, associadas à resistência à radiação. Mais importante ainda, houve um decréscimo de mais de 90% na formação de novas colônias de células tumorais após o tratamento conjunto. Comparada ao grupo de controle, a radioterapia sozinha reduziu em 36% a formação de colônias. Mesmo com o uso de aproximadamente metade da dose padrão de radiação, a probabilidade de sobrevivência do tumor permaneceu baixa. Isso sinaliza que o emprego conjunto da radioterapia e da proteína que bloqueia o cálcio no núcleo das células de câncer poderia combater o tumor de modo mais eficiente, expondo menos o paciente aos danos do tratamento padrão.

“É uma prova de conceito bastante elegante”, comenta o oncologista Roger Chammas, da Universidade de São Paulo. Ele ainda ressalta que, apesar de o estudo ter utilizado células de câncer de cabeça e pescoço, a terapia proposta poderia ser aplicada, em princípio, a outros tipos de câncer resistentes à radioterapia. Helena Segretto, oncologista especialista em

radiobiologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), nota que a radioterapia associada ao bloqueio de cálcio paralisou o processo de divisão das células tumorais justamente nas fases em que elas são mais sensíveis à radiação, induzindo um aumento da morte celular. “A melhora da resposta das células tumorais à radiação é o grande desejo dos médicos radioterapeutas”, afirma.

Todos os especialistas, entretanto, concordam que ainda há um longo caminho pela frente até se provar a viabilidade dessa estratégia. Helena afirma que, antes dos primeiros testes com seres humanos, serão necessários experimentos com animais de laboratório, nos quais as células tumorais interagem com as saudáveis, para se ter certeza de que as últimas realmente não serão afetadas pela terapia. “Os primeiros testes com animais já começaram e as parcerias para futuros ensaios com equipes do Hospital das Clínicas da UFMG já estão em andamento”, diz Maria de Fátima. ■

#### Artigos científicos

ANDRADE, L.M. *et al.* Nucleoplasmic calcium buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to anticancer therapy. *Journal of Cancer Science and Therapy*. 25 mai. 2012.

RODRIGUES, M.A. *et al.* Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 282. 8 jun. 2007.

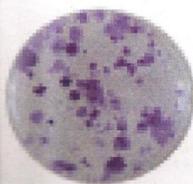
## TERAPIA que "aprisiona" CÁLCIO é trunfo contra o câncer de cabeça-pescoço

As possibilidades de cura do câncer de cabeça-pescoço, que este ano deverá registrar 14 mil novos casos no Brasil, devem aumentar sensivelmente com a terapia gênica desenvolvida pela UFMG que bloqueia a circulação de cálcio, evitando a proliferação de células carcinogênicas. Associado à tradicional radioterapia, o tratamento reduz pela metade a dose necessária de radiação e minimiza as chances de retorno da doença.

Páginas 4 e 5

## Livro revela as múltiplas dimensões do futebol

Página 8



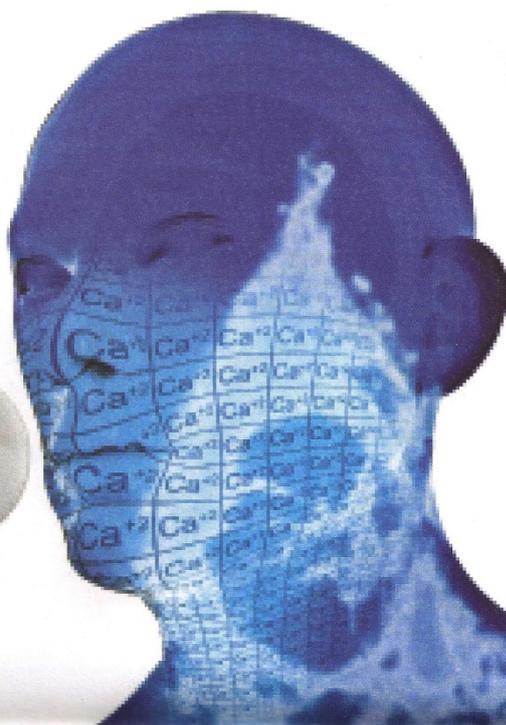
Células tratadas com radioterapia



Células tratadas com a terapia gênica desenvolvida na UFMG



Associação das duas terapias





- Login
- Assine a Folha
- Atendimento
- Versão Impressa

# FOLHA DE S. PAULO

★ ★ ★ UM JORNAL A SERVIÇO DO BRASIL

TERÇA-FEIRA, 25 DE FEVEREIRO DE 2014 13:48

PUBLICIDADE

Tenha acesso limitado a Folha Digital. Apenas R\$ 1,90 no primeiro mês. ASSINE JÁ

Opinião - Política - Mundo - Economia - Cotidiano - Esporte - Cultura - F5 - Tec - Classificados - Blogs - Seções - 29°C SÃO PAULO

Últimas notícias Evento do MST que terminou em confronto teve patrocínio do BNDES

Buscar... Site buscar

## ciência

### Estudo da UFMG aponta terapia que diminui proliferação de células de câncer

MARCO VARELLA  
COLABORAÇÃO PARA A FOLHA  
23/10/2012 12h58

Recomendar 118 Tweetar 2 18 Ouvir o texto Mais opções

Pesquisadores da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) desenvolveram uma forma de terapia gênica que "aprisiona" o cálcio do núcleo das células cancerosas, diminuindo a taxa de proliferação delas. A novidade é que quando essa técnica é associada à radioterapia, ela aumenta a eficácia do tratamento

PUBLICIDADE

TUDO COM DESCONTOS IMPERDÍVEIS!

PUBLICIDADE

Contos e Fábulas R\$ 16,90 cada livro - C

envie sua notícia

Fotos Vídeos Relatos

PUBLICIDADE

MINHA BREVE HISTÓRIA Stephen Hawking Por: R\$ 19,90 COMPRAR

### siga a folha

f t g+ in p

t r y

PUBLICIDADE

**CORRA**  
VENHA MARCAR ESTE GOLAÇO EM SUA VIDA

**Medicina do Futuro: pesquisa pode mudar tratamento do câncer no Brasil RedeTV News**

20/06/2012 21h13



**BAND MINAS segunda edição**  
27/06/2012 19h





- Homepage
- Notícias
- Profissionais de saúde
  - Revista
  - Estudos clínicos
  - Casos clínicos
  - Investigação / Formação
  - Grupos de estudo
  - Medicina familiar
  - Ferramentas
  - Agenda
- Imprensa
  - Press release
  - Ferramentas
- Público em geral
  - O cancro
  - Tipos de cancro
  - Factores de risco
  - Sinais e sintomas
  - Deteção e diagnóstico
  - Estadiamento ou fases

pesquisa



## Notícias

[« voltar](#)



### Terapia génica desenvolvida no Brasil combate cancro da cabeça e pescoço



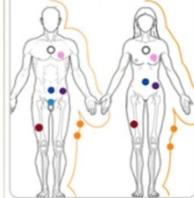
A terapia génica que interfere no cálcio presente dentro do núcleo da célula tumoral pode ajudar na cura de cancro da cabeça e pescoço, mesmo em carcinomas epiteliais resistentes à radioterapia, avança a Federal de Minas Gerais, no seu site.

Desenvolvida no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Centro de Pesquisa René Rachou e no Instituto de Radioterapia São Francisco, a pesquisa da doutoranda Lídia Andrade mostra que a fracção de sobrevida do tumor é reduzida drasticamente quando se associa o tradicional tratamento radioterápico ao bloqueio de uma função do reticulo nucleoplasmático, organela responsável por actividades celulares como síntese de proteínas e armazenamento de cálcio, descoberta em 2003 pela professora Maria de Fátima Leite, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB.

O estudo mostra ainda que o tratamento proposto consegue diminuir pela metade a dose de radiação necessária e minimizar a recidiva, isto é, o retorno da doença. Orientado pela própria professora Maria de Fátima e pelo professor Olindo Assis Martins Filho, com colaboração do físico Jony Marques Geraldo, o estudo foi aceite para publicação na revista científica *Journal of Cancer Science & Therapy*, de alto impacto na área. A pesquisa é financiada por Fapemig, Capes, CNPq e Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

Escolha um tipo de cancro ▼

### Cancro e suas localizações



<< Fevereiro 2014 >>

| S  | T  | Q  | Q  | S  | S  | D  |
|----|----|----|----|----|----|----|
|    |    |    |    |    | 1  | 2  |
| 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
| 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |    |    |



Vai ver que faz sentido

## 9 Referências Bibliográficas

- (1) Sant'Ana DR, Thuler LCS, Rezende MCR. ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer. Thuler LCS, editor. First[1], 1-128. 24-8-2011. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. 30-8-2011.
- (2) Mendonça GAS, Noronha CP, Almeida LM. A situação do câncer no Brasil. Carvalho M, editor. First[1], 6-119. 15-4-2006. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. 15-4-2006.
- (3) Silveira A, Goncalves J, Sequeira T, Ribeiro C, Lopes C, Monteiro E et al. [Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives]. Rev.Bras.Epidemiol. 15[1], 38-48. 2012.
- (4) Le Tourneau C, Michiels S, Gan HK, Siu LL. Reporting of time-to-event end points and tracking of failures in randomized trials of radiotherapy with or without any concomitant anticancer agent for locally advanced head and neck cancer. J Clin.Oncol. 27[35], 5965-5971. 10-12-2009.
- (5) Andrade LM, Campos TPR, Leite MF, Goes AM. In vitro response of the human breast cancer cell line MDAMB-231 and human peripheral blood mononuclear cells exposed to 60Co at single fraction. Brazilian Archives of Biology and Technology 48[2], 205-213. 24-10-2005.
- (6) Alvarenga LM, Ruiz T, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. Rev Bras Otorrinolaringol 74[1], 68-73. 11-8-2007.
- (7) Freitas DA, Caballero AD, Herrera AH, Mercado LF, Freitas FA, Antunes SLNO. A saúde oral e a radioterapia de cabeça e pescoço. Arquivos Catarinenses de Medicina 40[3], 12-16. 4-11-2011.
- (8) Borges DM, Sena MF, Ferreira MA, Roncalli AG. [Mortality for oral cancer and socioeconomic status in Brazil]. Cad.Saude Publica 25[2], 321-327. 2009.
- (9) Almeida FCR, Silva DP, Amoros MA, Brito e Dias R, Crivello Junior O, Araújo ME. Popularização do autoexame da boca: um exemplo de educação não formal - Parte II. Ciência & Saúde Coletiva 15[1], 1589-1598. 2011.
- (10) Silva APR, Noronha CP, Silva JLO, Ferreira JMO, Oliveira JFP, Santos MO et al. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Fascina T, editor. first, 1-118. 3-3-0011. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. 26-11-2013.

- (11) Maciel SSSV, Maciel WV, Silva RB, Sobral LV, Souza IRS, Siqueira MJ. Morbimortalidade por cânceres da boca e faringe em capitais brasileiras. *Revista da AMRIGS* 56[1], 38-45. 15-1-2012.
- (12) Diaz Jr EM, Kies MS, Sturgis EM, Clayman L, Laramore GE, Lippman SM et al. *Noeplasms of the Head and Neck*. Kufe DW, Bast jr RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editors. *Cancer Medicine*. 7th[79], 1131-1178. 2006. Hamilton. 8-3-2006.
- (13) Melo LC, Silva MC, Bernardo JMP, Marques EB, Leite ICG. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. *Rev Gaúcha Odontol* 58[3], 351-355. 7-7-2010.
- (14) Bergamasco VD, Marta GN, Kowalski LP, Carvalho AL. Perfil epidemiológico do câncer de cabeça e pescoço no Estado de São Paulo. *Rev.Bras.Cir.Cabeça Pescoço* 37[1], 15-19. 20-1-2008.
- (15) Rocha OKMS, Oliveira ACM, Bonan PGF. Perfil Clínico e Epidemiológico de Pacientes com Neoplasias Malignas de Cabeça e Pescoço em um Hospital de Referência em Piracicaba-SP. *R bras ci Saúde* 17[2], 155-160. 13-10-2013.
- (16) Leite ICG, Nunes LC, Moreira LC, Couto CA, Teixeira MTB. Mortalidade por Câncer de Boca e Faringe em Cidade de Médio Porte na Região Sudeste do Brasil, 1980-2005. *Revista Brasileira de Cancerologia* 56[1], 17-23. 2009.
- (17) Moraes ED, Lessa GL, Agra I, Carvalho E. Tumores de Cabeça e Pescoço. José Renan Q.Guimarães, editor. *Manual de Oncologia*. primeira[43], 429-453. 2-5-2004. São Paulo, BBS.
- (18) Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 29[8], 779-792. 2007.
- (19) Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 18[2], 541-550. 2009.
- (20) Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin.Proc.* 83[4], 489-501. 2008.
- (21) Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 17[8], 1974-1981. 2008.
- (22) Troy JD, Grandis JR, Youk AO, Diergaarde B, Romkes M, Weissfeld JL. Childhood passive smoke exposure is associated with adult head and neck cancer. *Cancer Epidemiol.* 37[4], 417-423. 2013.

- (23) Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D et al. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 131[6], 986-993. 2004.
- (24) Urashima M, Hama T, Suda T, Suzuki Y, Ikegami M, Sakanashi C et al. Distinct effects of alcohol consumption and smoking on genetic alterations in head and neck carcinoma. *PLoS.One.* 8[11], e80828. 2013.
- (25) Colombo J, Rahal P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia* 55[2], 165-174. 2009.
- (26) Panwar A, Batra R, Lydiatt WM, Ganti AK. Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: A growing epidemic. *Cancer Treat.Rev.* 14-9-2013.
- (27) Bunn BK, van Heerden WF. HIV/AIDS associated malignancies of the head and neck. *SADJ.* 67[10], 590-592. 2012.
- (28) Guha N, Boffetta P, Wunsch F, V, Eluf NJ, Shangina O, Zaridze D et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am.J Epidemiol.* 166[10], 1159-1173. 15-11-2007.
- (29) Langevin SM, Michaud DS, Marsit CJ, Nelson HH, Birnbaum AE, Eliot M et al. Gastric reflux is an independent risk factor for laryngopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 22[6], 1061-1068. 2013.
- (30) Torres-Pereira CC, Angelim-Dias A, Melo NS, Lemos CA, Jr., Oliveira EM. [Strategies for management of oral cancer in primary and secondary healthcare services]. *Cad.Saude Publica* 28 Suppl, s30-s39. 2012.
- (31) Lingen MK. cabeça e pescoço. Kumar v, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. *Robbins & Cotran Patologia Bases patológicas das doenças.* 8th[16], 747-770. 2010. Rio de Janeiro, Elsevier.
- (32) Silveira EJD, Lopes MFF, Silva LMM, Ribeiro BF, Lima KC, Queiroz LMG. Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. *J Bras Patol Med Lab* 45[3], 233-238. 2009.
- (33) Carlson J, Licitra L, Locati L, Raben D, Persson F, Stenman G. SALIVARY GLAND CANCER; AN UPDATE ON PRESENT AND EMERGING THERAPIES. *ASCO EDUCATIONAL BOOK* 1[1], 257-263. 2013.
- (34) Domingues AM, Rosa JE. Tumores Malignos dos Maxilares. Freitas A, editor. *Radiologia Odontológica.* 6th[26], 553-579. 2004. São Paulo, Artes Médicas.

- (35) Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz.J Otorhinolaryngol.* 79[2], 239-247. 2013.
- (36) Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin.Proc.* 82[7], 878-887. 2007.
- (37) Pivot X, Felip E. Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 19[2], 79-80. 2008.
- (38) Sandulache VC, Ow TJ, Daram SP, Hamilton J, Skinner H, Bell D et al. Residual nodal disease in patients with advanced-stage oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with definitive radiation therapy and posttreatment neck dissection: Association with locoregional recurrence, distant metastasis, and decreased survival. *Head Neck* 35[10], 1454-1460. 2013.
- (39) Bázquez HVO. Carcinoma de células escamosas invasivo diferenciado: presentación de un caso. *Revista Archivo Médico de Camagüey* 14[4], 1-9. 2010.
- (40) Fritsch VA, Lentsch EJ. Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx: Analysis of 145 cases with comparison to conventional squamous cell carcinoma. *Head Neck* . 14-6-2013.
- (41) Linton OR, Moore MG, Brigance JS, Gordon CA, Summerlin DJ, McDonald MW. Prognostic Significance of Basaloid Squamous Cell Carcinoma in Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngol.Head Neck Surg.* 24-10-2013.
- (42) Albers AE, Chen C, Koberle B, Qian X, Klussmann JP, Wollenberg B et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit Rev Oncol.Hematol.* 81[3], 224-240. 2012.
- (43) Ojjopi EPB, Neto ED. Genôma e oncologia. Mir L, editor. *Genômica.* first[19], 363-387. 2004. São Paulo, Atheneu.
- (44) Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol.* 11-10-2013.
- (45) Varilla V, Atienza J, Dasanu CA. Immune alterations and immunotherapy prospects in head and neck cancer. *Expert.Opin.Biol.Ther* 13[9], 1241-1256. 2013.
- (46) Jie HB, Gildener-Leapman N, Li J, Srivastava RM, Gibson SP, Whiteside TL et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br.J Cancer* 109[10], 2629-2635. 12-11-2013.

- (47) Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. *Int.J Mol.Med* 26[1], 67-75. 2010.
- (48) Martens-de Kemp SR, Brink A, Stigter-van Walsum M, Damen JM, Rustenburg F, Wu T et al. CD98 marks a subpopulation of head and neck squamous cell carcinoma cells with stem cell properties. *Stem Cell Res.* 10[3], 477-488. 2013.
- (49) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Câncer. Renard G, editor. *Biologia Molecular da Célula*. 5th[20], 1209-1268. 2010. Porto Alegre, ArtMed.
- (50) Willman CL, Hromas RA. Genomic alterations and chromosomal aberrations in human cancer. Kufe DW, Bast jr RC, Hait WN, Ikegami M, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editors. *Cancer Medicine*. 7th[8], 104-134. 2006. Hamilton, BC Decker Inc.
- (51) Ghosh A, Ghosh S, Maiti GP, Mukherjee S, Mukherjee N, Chakraborty J et al. Association of FANCC and PTCH1 with the development of early dysplastic lesions of the head and neck. *Ann.Surg.Oncol.* 19 Suppl 3, S528-S538. 2012.
- (52) Pereira CS, Oliveira MV, Barros LO, Bandeira GA, Santos SH, Basile JR et al. Low expression of MSH2 DNA repair protein is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Appl.Oral Sci* 21[5], 416-421. 2013.
- (53) Bernaldo dQ, Merlo A, Secades P, Zambrano I, de SM, I, Ugidos N et al. Identification of TRPC6 as a possible candidate target gene within an amplicon at 11q21-q22.2 for migratory capacity in head and neck squamous cell carcinomas. *BMC.Cancer* 13, 116. 2013.
- (54) Liang C, Marsit CJ, Houseman EA, Butler R, Nelson HH, McClean MD et al. Gene-environment interactions of novel variants associated with head and neck cancer. *Head Neck* 34[8], 1111-1118. 2012.
- (55) Zhang C, Sturgis EM, Zheng H, Song X, Wei P, Jin L et al. Genetic variants in TNF-alpha promoter are predictors of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of oropharynx after definitive radiotherapy. *Int.J Cancer* . 7-10-2013.
- (56) Alves LR, Fraga CA, Oliveira MV, Sousa AA, Jorge AS, Marques-Silva L et al. High HIF-1alpha expression genotypes increase odds ratio of oral cancer. *Head Neck Oncol.* 4[5], 87. 2012.
- (57) Gattas GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 28[9], 819-826. 2006.

- (58) Weinberg RA. A biologia do Câncer. Weinberg RA, editor. first, 1-813. 2008. Porto Alegre, ArtMed.
- (59) Ganci F, Sacconi A, Bossel Ben-Moshe N, Manciocco V, Sperduti I, Strigari L et al. Expression of TP53 mutation-associated microRNAs predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Ann.Oncol.* 24[12], 3082-3088. 2013.
- (60) Xie TX, Zhou G, Zhao M, Sano D, Jasser SA, Brennan RG et al. Serine substitution of proline at codon 151 of TP53 confers gain of function activity leading to anoikis resistance and tumor progression of head and neck cancer cells. *Laryngoscope* 123[6], 1416-1423. 2013.
- (61) Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, Kowalski LP. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz.J Med Biol.Res.* 45[12], 1327-1333. 2012.
- (62) Ghosh A, Maiti GP, Bandopadhyay MN, Chakraborty J, Biswas J, Roychoudhury S et al. Inactivation of 9q22.3 tumor suppressor genes predict outcome for patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 33[3], 1215-1220. 2013.
- (63) Ekizoglu S, Dalay N, Karaman E, Akdeniz D, Ozaydin A, Buyru N. LKB1 downregulation may be independent of promoter methylation or FOXO3 expression in head and neck cancer. *Transl.Res.* 162[2], 122-129. 2013.
- (64) karp G. *Biologia Celular e Molecular, conceitos experimentais.* Gubert IC, editor. 3rd, 1-737. 2005. São Paulo, Manole.
- (65) Pierotti MA, Frattini M, Sozzi G, Croce CM. *Oncogene.* Kufe DW, Bast jr RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editors. *Cancer Medicine.* 7th[6], 68-84. 2006. Hamilton, BC Decker.
- (66) Bafico A, Aaronson SA. *Growth Factors and Signal Transduction in Cancer.* Kufe DW, Basile JR, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editors. *Cancer Medicine.* 7th[5], 53-67. 2006. Hamilton, BC Decker.
- (67) Moghal N, Sternberg PW. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11[2], 190-196. 1999.
- (68) Psyrris A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer. *Am.Soc.Clin.Oncol.Educ.Book* , 246-255. 2013.
- (69) Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin.Oncol.* 24[17], 2666-2672. 10-6-2006.
- (70) Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck

cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Mol.Oncol.* 12-10-2013.

- (71) Chu TH, Yang CC, Liu CJ, Lui MT, Lin SC, Chang KW. miR-211 promotes the progression of head and neck carcinomas by targeting TGFbetaRII. *Cancer Lett.* 337[1], 115-124. 28-8-2013.
- (72) Vogl TJ, Balzer J, Mack M, Steger W. Diagnóstico diferencial por imagem da cabeça e pescoço. Gebrim EMS, editor. first, 2-372. 2003. Rio de Janeiro, Revinter.
- (73) Whaites E. Princípios de radiologia odontologica. Haiter Neto F, editor. 3rd, 17-433. 2003. Porto Alegre, Artmed.
- (74) Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. Libbs F, editor. first, 27-721. 2004. São Paulo, BBS.
- (75) Chan JY, Tsang RK, Eisele DW, Richmon JD. Transoral Robotic Surgery (TORS) of the parapharyngeal space: A case series and systematic review. *Head Neck* . 29-11-2013.
- (76) De Ceulaer J, De Clercq C, Swennen GR. Robotic surgery in oral and maxillofacial, craniofacial and head and neck surgery: a systematic review of the literature. *Int.J Oral Maxillofac.Surg.* 41[11], 1311-1324. 2012.
- (77) Karatzanis AD, Psychogios G, Zenk J, Waldfahrer F, Hornung J, Velegrakis GA et al. Evaluation of available surgical management options for early supraglottic cancer. *Head Neck* 32[8], 1048-1055. 2010.
- (78) Silveira LA. Principio das drogas Antineoplásicas. Libbs F, editor. Manual de oncologia. first[4], 55-64. 2004. São Paulo, BBS.
- (79) Halliday D, Resnick R, Krane KS. Física Atômica. Souza JA, editor. Física 4. 4th[52], 196-213. 1996. Rio de Janeiro, LTC.
- (80) Pasler FA. Radiologia Odontológica. Marques MFC, editor. 3rd, 1-449. 1999. São Paulo, Medsi.
- (81) Silva JLF, Arruda FF. Radioterapia nos tumores de cabeça e pescoço- aspectos gerais. Libbs F, editor. Manual de Oncologia. first[45], 475-488. 2004. São Paulo, BBS.
- (82) Ministério dS. Programa de Qualidade em Radioterapia Curso de Atualização para Físicos em Radioterapia. 3-17. 2013.
- (83) Patrocínio HJ, Parker WA, Liu MCC. Radioterapia conformacional: simulação e planejamento do tratamento. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL, editors. Radioterapia em Oncologia. first[7], 127-145. 1999. São Paulo, Medsi.

- (84) Liu MCC, Parker WA, Patrocínio HJ, Souhami L. Radioterapia Conformacional: aspctos clinicos. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL, editors. first[7], 146-160. 1999. São Paulo, Medsi.
- (85) Purdy JA. Principles of radiologic physics, dosimetry and treatment planning. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[5], 142-165. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (86) Yan D, Lockman D, Brabbins D, Tyburski L, Martinez A. An off-line strategy for constructing a patient-specific planning target volume in adaptive treatment process for prostate cancer. Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 48[1], 289-302. 1-8-2000.
- (87) Mañon RR, Myers JN, Khuntia D, Harari PM. Oral Cavity Cancer. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[41], 891-912. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (88) Salvajoli JV, Maia MPC, Novaes PERS. Tumores de Cabeça e Pescoço. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL, editors. Radioterapia em Oncologia. first[17], 335-368. 1999. São Paulo, Medsi.
- (89) Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, Mancuso AA, Vilaret DB, Werning JW. Larynx. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[44], 975-995. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (90) Shak HK, Khuntia D, Hoffman HT, Harari PM. Hypopharynx cancer. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[43], 958-974. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (91) Terhaard CHJ. Salivary Glands. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[40], 874-890. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (92) Schlupp WR. Glândulas Salivares. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL, editors. Radioterapia em Oncologia. first[17], 444-467. 1999. São Paulo, Medsi.
- (93) Simplício FI, Maionchi F, Hioka N. TERAPIA FOTODINÂMICA: ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, APLICAÇÕES E AVANÇOS RECENTES NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS. Quim.Nova, 25[5], 801-807. 2002.
- (94) Sunar U. Monitoring photodynamic therapy of head and neck malignancies with optical spectroscopies. World J Clin.Cases. 1[3], 96-105. 16-6-2013.

- (95) Allison RR, Sibata CH. Photodynamic Therapy. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th[24], 599-603. 2008. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (96) Shultis JK, Faw RE. Radiation Interactions with Matter. FUNDAMENTALS OF NUCLEAR SCIENCE AND ENGINEERING. [7], 1-41. 2002.
- (97) Kaplan I. Los Rayos X y la estructura atomica. Física Nuclear. First[IV], 60-76. 1961. Madrid.
- (98) Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. J Pharm.Pharmacol. 60[8], 977-985. 2008.
- (99) Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologists. McAllister L, editor. 6th, 5-521. 2006. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- (100) Petersen C, Zips D, Krause M. Repopulation of FaDu human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation. Int.J.Rad.Onc.Biol.Phys 51[2], 483-493. 2012.
- (101) Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. Oncogene 15[10], 1191-1197. 4-9-1997.
- (102) Ogino H, Shibamoto Y, Sugie C, Ito M. Biological effects of intermittent radiation in cultured tumor cells: influence of fraction number and dose per fraction. J.Radiat.Res.(Tokyo) 46[4], 401-406. 2005.
- (103) Ganguly M, Szulik MW, Donahue PS, Clancy K, Stone MP, Gold B. Thermodynamic Signature of DNA Damage: Characterization of DNA with a 5-Hydroxy-2'-Deoxycytidine\*2'-Deoxyguanosine Base Pair. Biochemistry . 14-2-2012.
- (104) Banuelos CA, Banath JP, Kim JY, Aquino-Parsons C, Olive PL. gammaH2AX expression in tumors exposed to cisplatin and fractionated irradiation. Clin.Cancer Res. 15[10], 3344-3353. 15-5-2009.
- (105) Alonso MT, Garcia-Sancho J. Nuclear Ca(2+) signalling. Cell Calcium 49[5], 280-289. 2011.
- (106) Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. Mol.Immunol. 15-11-2013.
- (107) Pereira GJS. Sinalização de Cálcio Mediada pelo NAADP via Receptores TCPs em Células Gástricas de Músculo Liso de Ratos. 5-99. 2010. Universidade Federal de São Paulo.

- (108) Aguiar CJ, Arantes LAM, Leite MF. Receptores de Inositol 1,4,5-Trifosfato. Resende RR, Guatimosim S, Leite MF, editors. Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares. first[4], 54-73. 2012. São Paulo, Savier.
- (109) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1[1], 11-21. 2000.
- (110) Leite MF, Hirata K, Pusi T, Burgstahler AD, Okazaki K, Ortega JM et al. Molecular basis for pacemaker cells in epithelia. *J.Biol.Chem.* 277[18], 16313-16323. 3-5-2002.
- (111) Andrade LM. Sinalização de Cálcio e Crescimento da Célula Cancerígena. Resende RR, Guatimosin S, Leite MF, editors. Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares. first[18], 401-421. 2012. São Paulo, Savier.
- (112) Roderick HL, Cook SJ. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat.Rev Cancer* 8[5], 361-375. 2008.
- (113) Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat.Rev Cancer* 7[7], 519-530. 2007.
- (114) Taylor JT, Zeng XB, Pottle JE, Lee K, Wang AR, Yi SG et al. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol.* 14[32], 4984-4991. 28-8-2008.
- (115) Gong Y, Blok LJ, Perry JE, Lindzey JK, Tindall DJ. Calcium regulation of androgen receptor expression in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Endocrinology* 136[5], 2172-2178. 1995.
- (116) Cocco L, Gilmour RS, Ognibene A, Letcher AJ, Manzoli FA, Irvine RF. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem.J.* 248[3], 765-770. 15-12-1987.
- (117) Divecha N, Banfic H, Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 10[11], 3207-3214. 1991.
- (118) Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358[6383], 242-245. 16-7-1992.
- (119) Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100[5], 2975-2980. 4-3-2003.

- (120) Mak DO, Foskett JK. Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J.Biol.Chem.* 269[47], 29375-29378. 25-11-1994.
- (121) Malviya AN, Rogue P, Vincendon G. Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87[23], 9270-9274. 1990.
- (122) Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat.Cell Biol.* 5[5], 440-446. 2003.
- (123) Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J.Biol.Chem.* 271[1], 478-485. 5-1-1996.
- (124) Stehno-Bittel L, Luckhoff A, Clapham DE. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* 14[1], 163-167. 1995.
- (125) Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48[5], 1621-1631. 2008.
- (126) Resende RR, Andrade LM, Oliveira AG, Guimaraes ES, Guatimosim S, Leite MF. Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell Commun.Signal.* 11[1], 14. 2013.
- (127) Andrade LM, Geraldo JM, Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, Guimarães MM et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. *J Cancer Sci Ther* 4[5], 131-139. 25-5-2012.
- (128) Gomes DA. Funções do cálcio nuclear e citosólico na sinalização celular. 1-82. 2006. Universidade Federal de Minas Gerais.
- (129) Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P, Balla T et al. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol.Chem.* 283[7], 4344-4351. 15-2-2008.
- (130) Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol.Chem.* 282[23], 17061-17068. 8-6-2007.
- (131) Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat.Protoc.* 1[3], 1458-1461. 2006.

- (132) Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PA, Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol.Methods* 72[1], 77-89. 3-8-1984.
- (133) Powathil GG, Adamson DJ, Chaplain MA. Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model. *PLoS.Comput.Biol.* 9[7], e1003120. 2013.
- (134) Andrade V, Guerra M, Jardim C, Melo F, Silva W, Ortega JM et al. Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain. *J Hepatol.* 55[3], 626-635. 2011.
- (135) Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat.Rev Mol.Cell Biol.* 6[1], 32-43. 2005.
- (136) Cai CQ, Peng Y, Buckley MT, Wei J, Chen F, Liebes L et al. Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations. *Oncogene* 27[22], 3201-3210. 15-5-2008.
- (137) Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat.Rev.Cancer* 3[5], 362-374. 2003.
- (138) Goodman SL, Picard M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol.Sci* 33[7], 405-412. 2012.
- (139) Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr.Opin.Cell Biol.* 23[5], 607-614. 2011.
- (140) Hoffmann K, Xiao Z, Franz C, Mohr E, Serba S, Buchler MW et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the modulation of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Cancer Cell Int.* 11, 40. 2011.
- (141) Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem.Pharmacol.* 70[11], 1568-1578. 25-11-2005.
- (142) Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int.J Cancer* 114[5], 806-816. 1-5-2005.
- (143) Rikiishi H. Autophagic action of new targeting agents in head and neck oncology. *Cancer Biol.Ther* 13[11], 978-991. 2012.

- (144) Adrien J, Bertolus C, Gambotti L, Mallet A, Baujat B. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. *Oral Oncol.* 20-11-2013.
- (145) Pinto M, Uga MA. Cost of treating patients with smoking history in a specialized cancer hospital. *Rev Saude Publica* 45[3], 575-582. 2011.
- (146) Chen AM, Vazquez E, Courquin J, Donald PJ, Farwell DG. Tobacco use among long-term survivors of head and neck cancer treated with radiation therapy. *Psychooncology.* 8-9-2013.
- (147) Jham BC, Freire ARS. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorrinolaringol* 72[5], 704-708. 2006.
- (148) Freitas DA, Caballero AD, Pereira MM, Oliveira SKM, Pinho e Silva G, Hernandez CIV. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. *Rev.CEFAC.* 13[6], 1103-1108. 2011.
- (149) Andrade LM, Viana AMFC. Estudo das complicações pós-radioterapia para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço para o aumento da qualidade de vida. *Revista Dentística on line* 7[14], 31-37. 2006.
- (150) Tesei A, Sarnelli A, Arienti C, Menghi E, Medri L, Gabucci E et al. In vitro irradiation system for radiobiological experiments. *Radiat.Oncol.* 8[1], 257. 1-11-2013.
- (151) Soleymanifard S, Bahreyni Toossi MT, Sazgarnia A, Mohebbi S. The role of target and bystander cells in dose-response relationship of radiation-induced bystander effects in two cell lines. *Iran J Basic Med Sci* 16[2], 177-183. 2013.
- (152) Sokolov MV, Neumann RD. Radiation-induced bystander effects in cultured human stem cells. *PLoS.One.* 5[12], e14195. 2010.
- (153) Leszczynski D. Radiation Proteomics: A Brief Overview. *Proteomics.* 23-12-2013.
- (154) Andrade V, Guerra M, Jardim C, Melo F, Silva W, Ortega JM et al. Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain. *J Hepatol.* 55[3], 626-635. 2011.
- (155) Lucena PI, Robbs BK, Viola JPB. Sinalização de Cálcio na Transcrição Gênica. Resende RR, Guatimosin S, Leite MF, editors. *Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares.* first[23], 513-539. 2012. São Paulo, Savier.
- (156) Rainey MD, Black EJ, Zachos G, Gillespie DA. Chk2 is required for optimal mitotic delay in response to irradiation-induced DNA damage incurred in G2 phase. *Oncogene* 27[7], 896-906. 7-2-2008.

- (157) Heuskin AC, Michiels C, Lucas S. Toward computer simulation of high-LET in vitro survival curves. *Phys.Med Biol.* 58[18], 6495-6510. 21-9-2013.
- (158) Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458[7239], 780-783. 9-4-2009.
- (159) McDonald JT, Kim K, Norris AJ, Vlashi E, Phillips TM, Lagadec C et al. Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Res.* 70[21], 8886-8895. 1-11-2010.
- (160) He YY, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Res.* 68[10], 3752-3758. 15-5-2008.
- (161) Seftor RE, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E et al. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 89[5], 1557-1561. 1-3-1992.
- (162) Kato H, Liao Z, Mitsios JV, Wang HY, Deryugina EI, Varner JA et al. The primacy of beta1 integrin activation in the metastatic cascade. *PLoS.One.* 7[10], e46576. 2012.
- (163) Yuan J, Shi GX, Shao Y, Dai G, Wei JN, Chang DC et al. Calmodulin bound to stress fibers but not microtubules involves regulation of cell morphology and motility. *Int.J Biochem.Cell Biol.* 40[2], 284-293. 2008.
- (164) Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Belkin V, Baryshnikov A et al. Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. *Microcirculation.* 18[5], 390-399. 2011.
- (165) Hanna TP. Radiation Oncology in the Developing World. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. *Principles and Practice of Radiation Oncology.* 5th[25], 604-610. 2006. Philadelphia, Wolters Kluwer.
- (166) Meira DD, Almeida VH, Mororo JS, Caetano MS, Nobrega IP, Batista D et al. Efficient blockade of Akt signaling is a determinant factor to overcome resistance to matuzumab. *Mol.Cancer* 10, 151. 2011.
- (167) Allen JE, Krigsfeld G, Mayes PA, Patel L, Dicker DT, Patel AS et al. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects. *Sci Transl.Med* 5[171], 171ra17. 6-2-2013.
- (168) Niu FY, Wu YL. Novel agents and strategies for overcoming EGFR TKI resistance. *Exp.Hematol.Oncol.* 3[1], 2. 11-1-2014.

- (169) Shin TH, Sung ES, Kim YJ, Kim KS, Kim SH, Kim SK et al. Enhancement of the tumor penetration of monoclonal antibody by fusion of a neuropilin-targeting peptide improves the anti-tumor efficacy. *Mol.Cancer Ther* . 16-1-2014.
- (170) Halperin EC, Perez CA, Brennan P. The Discipline of Radiation Oncology. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. 5th[1], 2-75. 2008. Principles and Practice of Radiation Oncology, Wolters Kluwer.
- (171) Choi EJ, Cho BJ, Lee DJ, Hwang YH, Chun SH, Kim HH et al. Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases. *BMC.Cancer* 14[1], 17. 13-1-2014.
- (172) Li H, Wawrose JS, Gooding WE, Garraway LA, Lui VW, Peyser ND et al. Molecular Profiling of HNSCC Cells and Tumors Reveals a Rational Approach to Preclinical Model Selection. *Mol.Cancer Res*. 14-1-2014.
- (173) Mak MP, William WN, Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor for head and neck cancer chemoprevention. *Oral Oncol*. 9-1-2014.
- (174) Cripps C, Winkvist E, Devries MC, Stys-Norman D, Gilbert R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer. *Curr.Oncol*. 17[3], 37-48. 2010.
- (175) Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour.Biol*. 33[3], 707-721. 2012.
- (176) Dancey JE. Recent advances of molecular targeted agents: opportunities for imaging. *Cancer Biol.Ther* 2[6], 601-609. 2003.
- (177) Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp.Cell Res*. 316[7], 1083-1100. 15-4-2010.
- (178) Villalobo A, Garcia-Palmero I, Stateva SR, Jellali K. Targeting the calmodulin-regulated ErbB/Grb7 signaling axis in cancer therapy. *J Pharm.Pharm.Sci* 16[2], 177-189. 2013.
- (179) Nardi NB, Ventura AM. Terapia Gênica. Mir L, editor. *Genômica*. First[30], 625-642. 2004. São Paulo, Atheneu.
- (180) Ruddon RW, Kufe DW, Hait WN. Biochemistry of Cancer. Kufe DW, Bast jr RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editors. *Cancer Medicine*. 7th[9], 135-147. 2006. Hamilton, BC Decker.