

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

**IMPACTO DO TAMPONAMENTO DO Ca^{2+} NUCLEAR NA EXPRESSÃO
GÊNICA ASSOCIADA À RADIORESISTÊNCIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO.**

por

Camila Arlen Diniz Jardim

Belo Horizonte

Outubro/2013

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR C.A.D. JARDIM 2013

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

**IMPACTO DO TAMPONAMENTO DO Ca^{2+} NUCLEAR NA EXPRESSÃO
GÊNICA ASSOCIADA À RADIORESISTÊNCIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO.**

por

Camila Arlen Diniz Jardim

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do título de Mestre em Ciências, na área
de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Co-orientação: Dra. Maria de Fátima Leite

Belo Horizonte

Outubro/2013

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

J37i Jardim, Camila Arlen Diniz.
2013

Impacto do tamponamento do CA^{2+} nuclear na expressão gênica associada à radioresistência em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço / Camila Arlen Diniz Jardim. – Belo Horizonte, 2013.

XV, 59 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 63 - 74

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre 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. Carcinoma/genética 2. Calpaina/isolamento & purificação 3. Neoplasias de Cabeça e Pescoço/radioterapia
I. Título. II. Martins Filho, Olindo Assis (Orientação).III. Leite, Maria de Fátima (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.994

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

**IMPACTO DO TAMPONAMENTO DO Ca^{2+} NUCLEAR NA EXPRESSÃO
GÊNICA ASSOCIADA À RADIORESISTÊNCIA EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO.**

por

Camila Arlen Diniz Jardim

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.Dr. Olindo Assis Martind filho (Presidente)

Prof Dr^a. Carlos Eduardo Calvazara Silva

Prof. Dr^a Mariléia Chaves Andrade

Suplente: Prf. Dr^a Danielle Alves Gomes Zauli

Dissertação defendida e aprovada em:11/10/2013.

COLABORADORES

**Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática- Departamento de Genética
da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP**

Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Anemari Ramos Dinarte dos Santos

Instituto São Francisco de Radioterapia

Dr. Johny Marques e demais membros da equipe

SUPORTE FINANCEIRO

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais, pela base sólida sem a qual não seria possível construir nada e ao Paulo, pelo incentivo e apoio a cada nova vitória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade que me foi ofertada.

Aos meus pais, por tudo. Todo o amor, toda a dedicação, pelo exemplo de profissionais e seres humanos maravilhosos no qual me inspiro sempre.

Ao Paulo, por não duvidar nunca, me fazendo acreditar... Pela compreensão, ombro, paciência e pela formatação.

À Carol, pelas muitas longas conversas.

À Professora Fátima, pelas oportunidades incríveis, pelos ensinamentos durante todos os anos em que estive no Laboratório e por acreditar sempre na minha capacidade.

Ao Professor Olindo, pela oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao pessoal do Laboratório de Sinalização de Ca^{2+} , pelos momentos de trabalho e pelos de descontração. Pedrosa, valeu demais por toda a ajuda naquela reta final e Lídia, espero que saiba que sem você eu realmente não teria conseguido. Muito obrigada pela dedicação, solicitude e amizade.

Sumário

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas	XI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XII
Resumo	XIV
Abstract.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	17
1.2 A radioterapia.....	19
1.3 A sinalização intracelular de Ca ²⁺	21
1.3.1 O Ca ²⁺ nuclear	25
1.4 A regulação da transcrição gênica	27
1.4.1 O Ca ²⁺ e a regulação da transcrição gênica	28
1.5 Os alvos moleculares como agentes sensibilizadores no tratamento do câncer..	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Materiais e reagentes.....	37
4.2 Linhagem celular.....	37
4.3 Tamponamento do Ca ²⁺ nuclear.....	37
4.4 Irradiação de células.....	38
4.5 RaSH (Rapid Subtraction Hybridization)	38
4.5.1 Extração de RNA total	38

4.5.2 Síntese da primeira e segunda fitas de cDNA	39
4.5.3 Preparação da biblioteca de cDNA baseada em PCR	40
4.5.4 Hibridização subtrativa e geração da biblioteca subtrativa	40
4.5.5 Screening das colônias	41
4.5.6 Sequenciamento e análise dos resultados	41
4.6 PCR em Tempo Real.....	43
4.7 Western Blot	43
4.8 Silenciamento	43
4.9 Ensaio clonogênico	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Identificação de genes diferencialmente expressos por células do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço submetidas à terapia cumulativa de radiação X associada ou não ao tamponamento de Ca ²⁺ nuclear.	46
5.2 Validação da expressão gênica diferencial induzida pelo tamponamento do Ca ²⁺ nuclear associado à terapia cumulativa de raios X.	Erro! Indicador não definido.
5.3 Investigação do papel dos genes selecionados pela subtração na radioresistência em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	53
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Figuras

Figura 1. Sinalização de Ca^{2+} via receptores de IP_3	24
Figura 2. Regulação da expressão gênica.....	28
Figura 3. Protocolo de irradiação das células.....	39
Figura 4. Representação esquemática do protocolo RaSH.....	42
Figura 5. Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	49
Figura 6. Expressão da proteína Kinesina.....	51
Figura 7. Expressão da proteína Calpaína.....	52
Figura 8. Expressão da proteína NLK.....	53
Figura 9. Fração de sobrevivência das células silenciadas e irradiadas.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na subtração gênica e na PCR em Tempo Real.....	41
Tabela 2. Número de clones selecionados em cada condição de subtração.....	47
Tabela 3. Similaridade dos clones positivos com sequências depositadas no <i>genebank</i>	48
Tabela 4. Expressão gênica diferencial qualitativa (subtração) e quantitativa (qPCR) dos clones selecionados.....	50

Lista de abreviaturas e símbolos

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

Blastn: Basic local alignment search tool (ferramenta de busca de alinhamento)

Ca²⁺: cálcio

CaM-cinase: Ca²⁺/calmodulin- dependente Kinase (cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina)

cAMP: adenosina monofosfato cíclica

CIRC: calcium- induced calcium release

CRE: cAMP response element (elemento responsivo a AMPc)

CREB: cAMP response element binding protein (proteína ligada ao elemento responsivo a cAMP)

CSC: células tronco cancerosas

DAG: diacilglicerol

EGF: fator de crescimento epidermal

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal

FACS: fluorescence-activated cell sorting (seleção de células ativada por fluorescência)

Gy: Gray (1Joule/Quilograma); dose absorvida pelo tecido biológico

HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma

IP₃: inositol 3,4,5-trifosfato

IP₃R: receptor de inositol 3,4,5-trifosfato

MAPK: mitogen-activated protein kinase (proteína cinase ativada por mitógeno)

MMP: metaloproteinase de matriz

NFAT: nuclear factor of activated T cells (fator nuclear de células T ativadas)

NLK: Nemo-like Kinase

OSCC: oral squamous cell carcinoma

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PKC: protein Kinase C (proteína cinase C)

PLC: fosfolipase C

qPCR: quantitative Polymerase chain reaction (reação em cadeia da Polimerase quantitativa)

RaSH: rapid subtraction hybridization (subtração rápida por hibridização)

RyR: receptor de rianodona

SERCA: sarco-endoplasmic reticulum ATPase (ATPase do retículo sarco-endoplasmático)

siRNA: small interference RNA (pequeno RNA de interferência)

TBP: TATA box binding protein (Proteína de ligação a TATA box)

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor (receptor do fator de crescimento endotelial)

Resumo

O Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço acomete mucosas do trato aerodigestivo superior, incluindo cavidade oral, laringe e faringe e é caracterizado por elevada agressividade e radioresistência, apresentando, muitas vezes, recidivas após o tratamento. Em trabalho anterior, foi demonstrado pelo nosso grupo que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear é capaz de reduzir a taxa proliferação do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (células A431), bem como a sobrevida após a irradiação. Neste trabalho, investigamos quais genes estariam envolvidos na radiosensibilização observada mediante tamponamento do Ca^{2+} nuclear, utilizando o protocolo RaSH (rapid subtraction hybridization), que permitiu a identificação de genes diferencialmente expressos nas células apenas irradiadas (RX) e nas células irradiadas em que o Ca^{2+} nuclear fora tamponado (RX/ Ca^{2+} _T). Foram sequenciados 91 clones, dos quais 8 mostraram elevada similaridade (93-100%) com sequências conhecidas depositadas no *genebank* (NCBI). Entre os clones selecionados, 3 foram escolhidos, sendo a Calpaína e a NLK selecionadas como mais expressas na condição RX/ Ca^{2+} _T e a Kinesina, selecionada na condição RX. Estas proteínas são envolvidas em vias de sinalização críticas ao desenvolvimento tumoral, com base na análise por Blastn. Como a Kinesina foi identificada como superexpressa na condição RX, nós investigamos se seu silenciamento era capaz de produzir efeitos similares aos induzidos pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear. O silenciamento da Kinesina com siRNA promoveu a redução da formação de colônias e da sobrevida, em associação (90±2%) ou não (60±2%) com RX. Estes dados mostram que a Kinesina é um potencial alvo molecular a ser utilizado na radiosensibilização de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma affects mucosal of the upper aerodigestive tract, comprising oral cavity, pharynx and larynx and is characterized by aggressiveness and radioresistance, showing high frequency of post-treatment recurrent tumors. Our group had previously demonstrated that nuclear Ca^{2+} buffering promote decreased head and neck squamous cell carcinoma (A431 cells) proliferation rate and colony formation after irradiation. Here, to investigate which genes are involved on radiosensitization observed upon nuclear Ca^{2+} buffering, we applied RaSH (rapid subtraction hybridization) protocol that allows identification of genes differentially expressed on irradiated cells alone (RX) or combined with nuclear Ca^{2+} buffering (RX/ Ca^{2+}_T). 91 clones were sequenced and 8 had shown high similarity (93-100%) with known sequences deposited on genebank (NCBI). Among the selected clones, 3 were choose, Calpain and NLK, that showed increased expression on RX/ Ca^{2+}_T and Kinesin, that showed increased expression on RX. These clones are involved in tumor development-related signaling pathways according to BLASTn analysis. Because Kinesin was overexpressed on RX, we investigated if its silencing was capable to promote similar effect to nuclear Ca^{2+} buffering. Kinesin knockdown by siRNA promoted decreased colony formation, and survival either alone ($60\pm 2\%$) or in association ($90\pm 2\%$) with RX. These data show that Kinesin is a potential molecular target to radiosensitize head and neck squamous cell carcinoma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

Até meados do século XIX, acreditava-se que os tumores eram corpos estranhos que se enraizavam nos tecidos e dominavam o paciente. Com o desenvolvimento da Histopatologia, a observação de seções de tecidos revelou que os tumores, assim como os tecidos normais, eram constituídos de uma massa de células, as quais podiam ser rastreadas, através de suas características, até seu tecido de origem. Comparações histopatológicas mostraram os tecidos tumorais como menos organizados em relação aos tecidos normais, trazendo a convicção, a partir do século XX, de que o câncer era formado por células que haviam perdido a capacidade de se organizar e desempenhar suas funções corretamente¹.

Hoje se sabe que a progressão tumoral é, na maioria dos casos, um processo lento e gradual, que envolve o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, influenciadas pela predisposição e por fatores ambientais. A combinação desses fatores culmina em alterações fenotípicas que perturbam a sinalização intracelular normal, podendo conferir vantagens evolutivas às células. Nas primeiras etapas da progressão ocorre a formação de tecidos hiperplásicos e metaplásicos, nos quais as células, apesar de exibirem taxas de proliferação acima do normal, ainda retêm a capacidade de se organizar em tecidos e mostram características histológicas comparáveis às células normais. Posteriormente, ocorrem alterações mais drásticas, de forma que a aparência citológica ao microscópio passa a diferir das células normais, as chamadas displasias. Em um estágio mais avançado, chamado neoplásico, as células passam a ignorar os limites espaciais para sua proliferação, sendo capazes de invadir tecidos vizinhos, ou distantes, no caso dos metastáticos².

Experimentos utilizando FACS (fluorescence-activated cell sorting) em diversos tipos de tumores demonstraram que a população de células neoplásicas é heterogênea, exibindo diferentes aparências fenotípicas, capacidades proliferativas e tumorigênicas³. De acordo com essa premissa (ao contrário do Modelo Estocástico, que considera que todas as células na população são iguais, se diferenciando umas das outras na medida em que são acometidas por mutações), a tumorigênese tem início quando uma minoria de células tronco cancerosas (CSCs), dotadas de capacidade de auto-renovação e de elevada capacidade proliferativa, são acometidas pelas referidas alterações genéticas. Ao se dividir, transmitem para as células-filhas, as chamadas células progenitoras, as alterações adquiridas. As células progenitoras, por sua vez, continuam a se dividir, dando início a ciclos de sucessão clonal e seleção de características vantajosas. Dessa forma, as anormalidades surgidas a cada ciclo de expansão que, de alguma maneira conferem vantagens evolutivas (normalmente relacionadas à

proliferação, migração e sobrevivência) à célula portadora, acabam por se perpetuar na população. Além disso, ao longo dos ciclos de divisão, os genomas das células se tornam cada vez mais instáveis, criando um contexto favorável para o surgimento de novas anormalidades. A perpetuação das características adquiridas culmina na formação de uma população heterogênea, geneticamente diversificada, em constante crescimento³. De fato, há evidências em diversos tipos de tumor, inclusive em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁴, de que apenas uma minoria de células exibe capacidade tumorigênica, as quais estariam diretamente relacionadas com a progressão da doença e resposta ao tratamento⁵.

Os tumores são classificados de acordo com os tecidos e tipos celulares dos quais derivam. Dessa forma, os sarcomas são derivados de células mesenquimais, como miócitos, fibroblastos e adipócitos; os gliomas e blastomas são derivados de células ectodermais; as leucemias e os linfomas são derivados do tecido hematopoiético e, por fim, os carcinomas, derivados do tecido epitelial, o qual tem origem nos três folhetos embrionários. A maioria dos tumores é derivada de epitélios e são classificados como adenocarcinomas, quando têm origem em epitélios secretores e carcinomas de células escamosas, quando derivados de epitélios de revestimento². O Sistema de Classificação atual, pela *American Joint Committee on Cancer* assume que tumores com mesma histologia e local de origem têm modos semelhantes de crescimento e extensão e considera três parâmetros para a classificação, sendo eles: T (tumor primário), que avalia a extensão da neoplasia no sítio primário e o envolvimento de estruturas adjacentes; N, que considera metástases em linfonodos regionais e M, que avalia a presença de metástases à distância⁶.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (*Head and neck squamous cell carcinoma* ou HNSCC) engloba tumores que acometem mucosas da cavidade oral, faringe e laringe. A maioria, cerca de 90%, das neoplasias de cabeça e pescoço tem origem em células escamosas, sendo também chamados de carcinomas espinocelulares ou epidermóides^{1,7}. Estas neoplasias apresentam comportamento bastante agressivo, apresentando metastatização cervical precoce e, com frequência, contralateral, já que, sobretudo em orofaringe, os linfócitos cruzam a linha média⁷.

Os principais sintomas dos cânceres de cabeça e pescoço são inchaço ou ferimento que não desaparecem, inflamação persistente na garganta, podendo se apresentar como lesões endofíticas ou exofíticas, ou até mesmo, em estágio inicial, se apresentar como lesão leucoplásica, eritoplásica ou eritroleucoplásica. Além disso, podem aparecer dificuldades para deglutir e rouquidão ou alteração da voz. Esses sintomas podem também ser causados por

outras condições patológicas menos severas, o que contribui para seu mascaramento e diagnóstico tardio. Normalmente, o diagnóstico é feito com base no histórico do paciente, exame clínico, exame de cortes histológicos por microscopia e diagnóstico por imagem, como tomografia computadorizada, tomografia de emissão de pósitrons e ressonância magnética².

O tratamento do câncer de cabeça e pescoço envolve a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, aplicados individualmente ou conjugados. A escolha do tratamento busca a erradicação do tumor com máxima preservação do órgão acometido, considerando as múltiplas variáveis com relevância prognóstica, tais como a exata localização do tumor, seu estágio de desenvolvimento (cuja classificação segue o sistema de estadiamento clínico de tumores), a idade e o estado geral de saúde individual. Para isso, é indispensável a utilização de técnicas sofisticadas de análise multivariada para permitir estimativas de efeitos prognósticos independentes⁷.

As taxas de controle local e de sobrevida aumentaram nos últimos 30 anos, devido a avanços de tratamentos loco-regionais. No entanto, mesmo quando se trata de tumores clinicamente precoces tratados adequadamente, e quando são aplicadas abordagens cirúrgicas e não cirúrgicas em conjugação, aproximadamente 50% dos pacientes são acometidos por recidiva local, regional ou em sítios distantes, além de exibirem a taxa de mortalidade elevada em cinco anos^{7,9,10}.

A radioterapia é uma modalidade padrão de tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço. No entanto, os tumores recorrentes, frequentemente se mostram radioresistentes, o que se deve, pelo menos em parte, a mecanismos compensatórios, promotores de proliferação e repopulação do tumor, induzidos pela radiação^{11,12}. Apesar de pouco se saber acerca dos mecanismos que levam à radioresistência, sabe-se que constitui uma das maiores barreiras ao sucesso do tratamento.

1.2 A radioterapia

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixes de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnéticas ou corpusculares. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada⁶.

São várias as fontes de energia utilizadas na radioterapia. Há aparelhos que geram radiação a partir da energia elétrica, liberando raios X e elétrons, ou a partir de fontes de

isótopo radioativo, como, por exemplo, fontes de cobalto, as quais geram, habitualmente, raios gama. Esses aparelhos são usados como fontes externas, mantendo distâncias da pele que variam de 1 centímetro a 1 metro (teleterapia). Estas técnicas constituem a radioterapia clínica e se prestam para tratamento de lesões superficiais, semiprofundas ou profundas, dependendo da qualidade da radiação gerada pelo equipamento. Os isótopos radioativos (cobalto, célio, irídio etc.) são utilizados sob a forma de tubos, agulhas, fios, sementes ou placas e geram radiações de diferentes energias, dependendo do elemento radioativo empregado. São aplicados, na maior parte das vezes, de forma intersticial ou intracavitária, constituindo a radioterapia cirúrgica, também conhecida por braquiterapia ⁶.

O uso da radiação ionizante no tratamento do câncer se baseia na transferência de energia para o material biológico, desencadeando a produção de radicais livres, principalmente os derivados da ionização das moléculas de água (OH[•] e H[•]). Os radicais livres têm como características elétrons não pareados sendo, por isso, altamente reativos e de vida curta. Participam de reações de subtração de H e formação de ligações carbono-carbono insaturadas, bem como na transformação de moléculas alvo em novos radicais livres intermediários de vida curta que se tornam, dessa forma, danificados. É importante ressaltar que neste processo, a interação com o oxigênio é capaz de perpetuar as alterações, fixando os danos causados pela radiação ².

A radiação ionizante pode produzir mudanças estruturais em várias classes de macromoléculas encontradas nas células. Sua interação com lipídeos envolve a formação de moléculas de ácidos graxos insaturados; com proteínas, leva à perda de grupos de cadeias laterais e alterações nas estruturas secundária e terciária e, no caso dos ácidos nucléicos, a interação com a radiação pode causar danos ou perdas de bases e quebra em um ou ambos os filamentos da dupla hélice. A morte induzida por radiação ocorre quando são inativadas vias vitais para a manutenção da célula ou quando os danos se tornam tão graves, que a mesma perde a sua capacidade reprodutiva. A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada ².

A radiosensibilidade do tumor depende largamente da sobrevivência das células tumorais clonogênicas e é influenciada por fatores biológicos, químicos e físicos como a presença de oxigênio, importante na perpetuação dos danos, a princípio reversíveis, causados nas macromoléculas pela radiação, o tamanho do tumor, a capacidade das células de reparar os

danos letais ou subletais e a repopulação ou capacidade proliferativa das células que sobrevivem às doses de radiação ².

Todas as modalidades de tratamento do câncer de cabeça e pescoço podem causar alterações na capacidade do paciente de deglutir, falar e mastigar ². A radioterapia, em particular, pode desencadear efeitos adversos classificados em imediatos ou tardios. Os principais efeitos adversos imediatos causados pela radiação são eritema, irritação, xerostomia, que pode ser bastante severa e perda de apetite, que pode levar à desnutrição. Já os efeitos tardios ocorrem quando são ultrapassadas as doses de tolerância dos tecidos normais, sendo os principais atrofia, fibrose e, mais raramente, alterações no nível genético e desenvolvimento de outros tumores malignos ⁶.

Para que a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, de forma a reduzir os efeitos adversos do tratamento e, ao mesmo tempo, que seu efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas e, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em doses diárias iguais, quando se usa a terapia externa. A dose de radiação varia de 50 Gy a 70 Gy, sendo, habitualmente, fracionada em doses diárias de aproximadamente 1.8 Gy a 2 Gy, o que permite distribuir, num período de quatro a sete semanas, a dose total recomendada ¹³.

1.3 A sinalização intracelular de Ca²⁺

O Ca²⁺ é um segundo mensageiro intracelular dinâmico envolvido na regulação, em diferentes tipos celulares, de uma ampla gama de eventos, como apoptose, secreção, exocitose, plasticidade sináptica, fertilização, proliferação, diferenciação e transcrição gênica ¹⁴. Os sinais intracelulares de Ca²⁺ ocorrem em resposta a estímulos químicos (hormônios, fatores de crescimento e toxinas) e mecânicos, alteração das condições do microambiente e despolarização. Dependendo do tipo celular, os sinais podem ser transientes, oscilatórios ou sustentados, além de poderem ocorrer globalmente ou em eventos subcelulares localizados ¹⁵.

Na produção dos diferentes tipos de sinais, a célula emprega diversos mensageiros e mecanismos para mobilizar o Ca²⁺. Sua concentração no meio intracelular é cerca de quatro graus de magnitude menor do que no meio extracelular. Além disso, já é bem estabelecido que o íon está presente em elevadas concentrações nos estoques intracelulares, como no retículo endoplasmático ¹⁶, na mitocôndria ¹⁷, nos lisossomos ¹⁸ e no aparelho de Golgi ¹⁶. A manutenção deste gradiente transmembrana é crucial, uma vez que o aumento da

concentração intracelular do Ca^{2+} dispara uma série de eventos que culminam na regulação de processos chave para a célula ¹⁴.

Diversas doenças estão relacionadas à desregulação da homeostase de Ca^{2+} , como hipertensão, Doença de Alzheimer, diabetes e câncer⁶⁶. A homeostase do Ca^{2+} intracelular consiste em uma fina regulação que envolve sua entrada a partir do espaço extracelular e/ou a liberação de seus estoques intracelulares, bem como sua recaptção, exercida por bombas especializadas, como a Ca^{2+} ATPase e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que exportam o íon para o espaço extracelular, além da SERCA (sarco-endoplasmic reticulum ATPase), a qual promove sua recaptção para o interior do retículo endoplasmático¹⁵.

Como exposto, uma das maneiras através das quais ocorre o aumento do Ca^{2+} no citosol é seu influxo através de canais iônicos localizados na membrana plasmática. Estes canais são agrupados e nomeados de acordo com a natureza de seu mecanismo de ativação, como alterações do potencial de membrana (canais operados por voltagem), interação de ligantes (canais operados por ligante) e depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} (canais operados por estoque). As características dos sinais de Ca^{2+} gerados pelos canais localizados na membrana plasmática dependem de suas propriedades biofísicas, níveis de expressão e localização ¹⁵.

A grande maioria dos sinais de Ca^{2+} é gerada mediante sua liberação dos estoques intracelulares. Os canais de liberação de Ca^{2+} localizados nos estoques intracelulares normalmente são ativados mediante interação com ligantes, sendo os principais os receptores de Rianodina (RyRs) e os receptores de Inositol 3,4,5 trifosfato (InsP_3R). Estes canais são regulados por diversos fatores, sendo o mais importante deles o próprio Ca^{2+} , capaz de interagir tanto com sua porção citosólica quanto lumenal ^{15,19}.

Existem três isoformas de receptores de RyRs: tipo I, tipo II e tipo III. Todas são ativadas pelo Ca^{2+} e promovem sua liberação do retículo endoplasmático para o citosol por um processo conhecido por liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CIRC). Os RyRs tipos II e III também são sensíveis à adenosina trifosfato cíclica (cADP-ribose)²⁰.

Os InsP_3R pertencem a uma família de canais de liberação de Ca^{2+} localizados predominantemente no retículo endoplasmático de todos os tipos celulares. Eles liberam Ca^{2+} em resposta ao inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) produzido por diversos estímulos e podem gerar sinais de Ca^{2+} locais ou globais. Estes sinais regulam numerosos processos fisiológicos, desde a transcrição de genes à secreção, aprendizagem e memória. O InsP_3 é gerado a partir da

clivagem do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), fosfolípídeo presente na bicamada lipídica, pela Fosfolipase C (PLC), que é recrutada para a membrana mediante ativação de receptores nela inseridos, mais comumente, receptores acoplados à proteína G e receptores tirosino-cinases. A clivagem do PIP₂ libera, além do InsP₃, o diacilglicerol (DAG), o qual pode vir a ativar a Proteína Cinase C (PKC). O InsP₃ liberado, por sua vez, difunde pelo citosol e se liga em seus receptores tetraméricos presentes nas membranas dos estoques intracelulares, induzindo mudanças conformacionais que possibilitam a formação de um canal, por onde o Ca²⁺ será liberado ¹⁹.

Existem três isoformas de InsP₃Rs: tipo I, II ou III. Já foi demonstrado que a distribuição espacial dos InsP₃R e a presença de diferentes isoformas resultam em diferenças nos parâmetros da sinalização de Ca²⁺. As isoformas de InP₃Rs possuem uma considerável homologia na sequência gênica (de aproximadamente 65%), mas cada uma é expressa e regulada de maneira distinta em cada tecido. As diferenças de especificidades de cada isoforma, bem como a expressão e distribuição subcelular apresentadas por cada uma sugerem que servem a diferentes papéis na sinalização de Ca²⁺ ^{19,21,22}. Além disso, as diferentes isoformas apresentam diferentes níveis de afinidade pelo InsP₃, o que varia de acordo com o tipo celular ^{19,21}. O InsP₃ é um requerimento absoluto para ativação do canal, mas sua atividade é modulada pelo próprio Ca²⁺, além de numerosas proteínas reguladoras como IRBIT (proteínas de ligação ao InsP₃R), ERp44, Homer, 4.1N e NCS-1 (sensor de cálcio neuronal 1) têm sido demonstradas como capazes de interagir com diferentes isoformas do receptor, modificando suas propriedades ²¹. A figura 1 ilustra como o InsP₃ é gerado e como se liga ao seu receptor endógeno para favorecer a liberação de Ca²⁺.

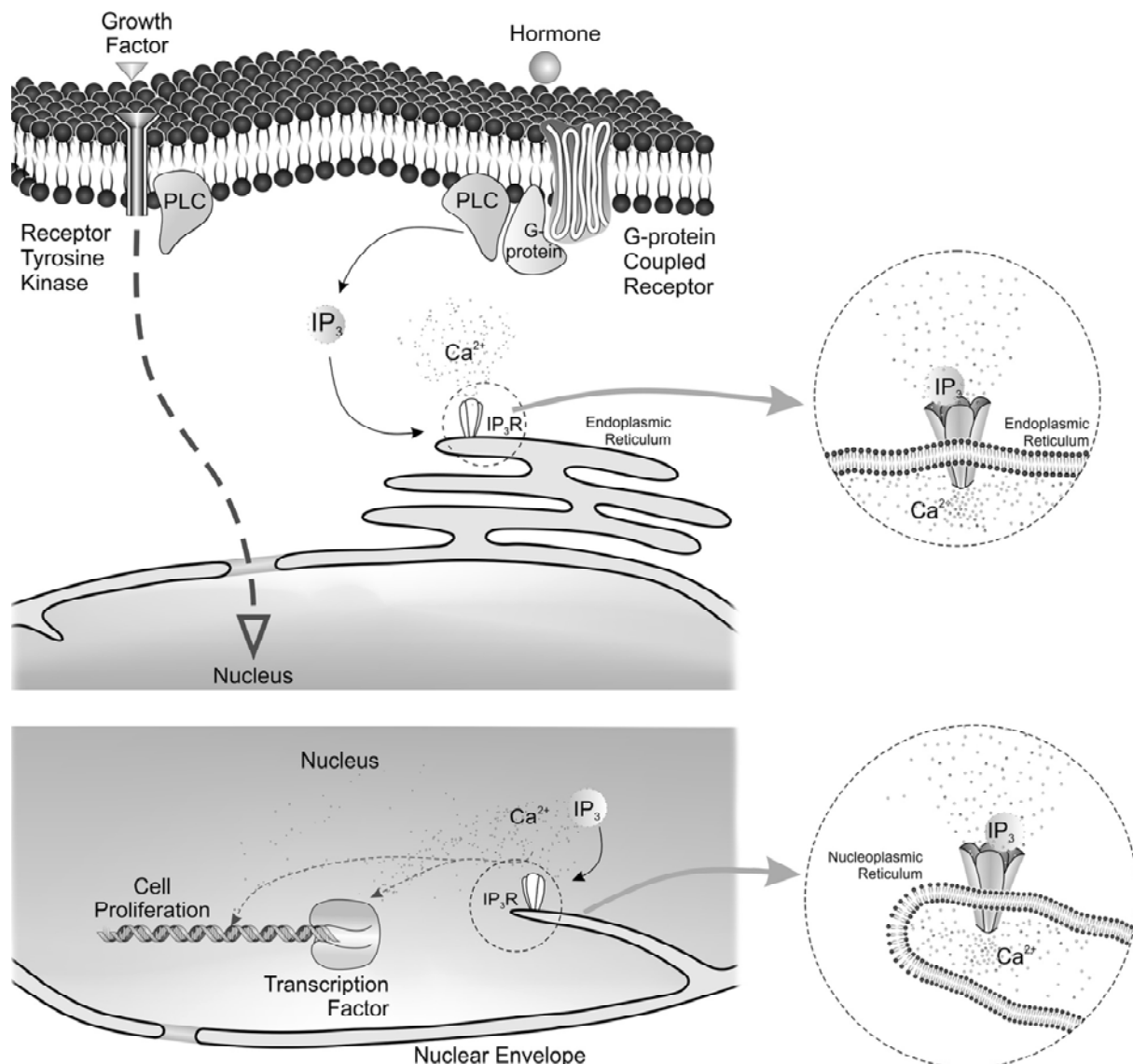


Figura 1. Mecanismo de sinalização de Ca^{2+} via receptores de IP_3 . Mediante ativação de receptor acoplado à proteína G ou receptor tirosino-cinase, ocorre hidrólise do fosfatidil inositol difosfato (PIP_2) pela fosfolipase C (PLC). Há a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3). O InsP_3 se liga ao seu receptor (InsP_3R) no retículo endoplasmático, no núcleo ou no retículo nucleoplasmático, modificando sua conformação, o que permite a liberação de Ca^{2+} . Os sinais de Ca^{2+} nuclear induzidos estão relacionados à regulação da transcrição gênica e proliferação celular²³.

Apesar de já estar bem estabelecida a participação do Ca^{2+} na regulação de diversas funções celulares distintas, ainda não foram completamente elucidados os mecanismos subjacentes à regulação específica de uma ou outra resposta orquestrada pelo mesmo. A interação entre os diferentes canais de liberação de Ca^{2+} é uma das maneiras através das quais a especificidade pode ser alcançada, tanto em condições fisiológicas como patológicas. A amplitude e frequência dos sinais, bem como seu padrão temporal e espacial também estão no cerne da regulação específica das funções supracitadas^{14,24}. Os canais da membrana

plasmática e dos estoques possuem curto tempo de abertura, gerando sinais localizados, promovendo o controle local de algumas funções e participando da formação de sinais globais²⁵. Além disso, a interação do Ca^{2+} com outras vias permite, ainda, maior diversidade na produção de respostas.

1.3.1 O Ca^{2+} nuclear

É bem estabelecido que os sinais de Ca^{2+} no núcleo regulam diversas funções, no entanto, os mecanismos através dos quais sua concentração aumenta especificamente no nucleoplasma não foram completamente elucidados²⁶.

A princípio, acreditava-se que o Ca^{2+} gerado no citosol apenas se difundisse passivamente para o núcleo. De fato, como demonstrado por Lipp et al, 1997, através de imagens de microscopia confocal, as ondas de Ca^{2+} geradas no citosol, por estímulos de hormônios, alcançam o núcleo, tornando-o submerso no sinal. É fato que o Ca^{2+} se difunde mais lentamente no citosol do que no nucleoplasma. Dessa forma, a observação de sinais nucleares não necessariamente significa que a fonte é o núcleo. Já foi demonstrado que a mobilização de Ca^{2+} dos estoques nas redondezas do núcleo causa elevações simultâneas no citosol e no nucleoplasma, ao passo que sinais gerados próximo à membrana, induzem primordialmente sinais citosólicos e apenas um atrasado e discreto aumento no núcleo^{27,28}.

Os avanços nas tecnologias de obtenção de imagens possibilitaram monitorar as alterações de Ca^{2+} em diferentes compartimentos simultaneamente. Com isso, vários grupos, muito numerosos para detalhar, demonstraram diferenças entre as concentrações citosólica e nuclear do íon em diversos tipos celulares como músculo liso, cardiomiócitos, células hepáticas, entre outros^{29,30-2}.

Apesar de muitos estudos sugerirem que os sinais de Ca^{2+} no nucleoplasma se originam no citosol, outros demonstraram que o núcleo é capaz de gerar sinais independentemente. Leite *et al* (2003), estudando a regulação do Ca^{2+} em diferentes compartimentos subcelulares, verificaram que a presença de InsP_3Rs no envelope nuclear promove aumento dos níveis de Ca^{2+} no núcleo independente dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático³¹. A liberação deste íon no núcleo está ligada à existência de um compartimento destinado a reservar cálcio, localizado em seu interior. Este compartimento, identificado por Echevaria et al (2003), tem estrutura membranosa e reticular e se estende do retículo endoplasmático e do envelope nuclear para o interior do núcleo, tendo sido caracterizado em células epiteliais SKHep1 e denominado “retículo nucleoplasmático”. Além

disso, outros estudos demonstraram a presença de toda a maquinaria necessária à geração de sinais de Ca^{2+} no núcleo³³.

A presença de InsP_3 Rs funcionais no envelope nuclear, tanto na face voltada para o citosol, quanto na face voltada para o núcleo já está bem documentada³⁴⁻⁹. Já foi demonstrado que o envelope nuclear contém a fosfatidilinositol fosfato cinase (PIP₂)⁴⁰⁻², que sintetiza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂); a enzima fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o PIP₂ para formar o InsP_3 ^{43,44} e também a SERCA, que recapta o Ca^{2+} após sua liberação⁴⁵. A presença de todos estes componentes presentes no núcleo da célula possibilita a formação de InsP_3 dentro do núcleo, o que pode causar um aumento transiente de Ca^{2+} independente dos níveis citoplasmáticos de InsP_3 ³¹.

Utilizando uma ferramenta que promove o tamponamento específico do Ca^{2+} nuclear, Rodrigues *et al* (2007) demonstraram que tal tamponamento altera a proporção de células em S e G2-M, o que não foi obtido com o tamponamento do Ca^{2+} citosólico. Além disso, o tamponamento do Ca^{2+} nuclear levou à redução do crescimento de tumores de células HepG2, quando implantadas subcutaneamente em camundongos, além de inibir a ativação de Elk1 em hepatoma sob estímulo com EGF²⁴ e a estimulação de hepatócitos com HGF (Fator de crescimento hepático), induz a mobilização de Ca^{2+} nuclear, mediante translocação do receptor e produção local de IP₃⁴⁷.

A sinalização do Ca^{2+} nuclear promove a indução e a translocação da proteína cinase C (PKC), entre outras cinases, para a membrana nuclear, regula diretamente a ativação de cinases, como a CaM-cinase IV, que são capazes de regular a transcrição de genes específicos, regula negativamente o fator de transcrição TEF/TEAD e positivamente a transcrição dependente do Elemento responsivo a cAMP (CRE) e Elk-1, mediante ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), além de promover impactos crescimento e na proliferação celular^{15,46,48,50}. Estes dados sugerem que o Ca^{2+} nuclear está diretamente relacionado à regulação (ativadora ou inibitória) da transcrição gênica, influenciando diversas vias intracelulares relacionadas, entre outros, à proliferação e progressão do ciclo celular.

1.4 A regulação da transcrição gênica

A expressão individual de um gene é regulada por um repertório de proteínas e outros elementos que tornam as células capazes de ajustar a taxa de transcrição de diferentes genes independentemente, de acordo com a necessidade.

Nos organismos procariotos, a estrutura gênica está organizada em operons (unidades de expressão gênica coordenada), que consistem em regiões reguladoras (operador e promotor) conjugadas ao grupo de genes estruturais. Nesses organismos, a modulação da expressão exige uma simples interação DNA-proteína. Em eucariotos, por outro lado, a regulação da expressão gênica é mais complexa e requer um grande número de proteínas regulatórias (elementos transregulatórios) e diferentes interações com as regiões regulatórias no DNA (elementos cis-regulatórios)⁵¹. Há diversos pontos passíveis de regulação ao longo do processo de codificação de um gene, sendo as principais: o início da transcrição do RNAm, que inclui o remodelamento da cromatina e proteínas associadas, o processamento do RNAm, seu transporte e a localização, a regulação da tradução e, por fim, a modulação da atividade da proteína já traduzida⁴⁹ (Figura 2).

Os elementos cis-regulatórios compreendem a região promotora mínima, os acentuadores ou *enhancers* (regiões ativadoras ou inibidoras da transcrição) e os insuladores. A região promotora mínima é localizada acima do ponto de início da transcrição e compreende a área em que a RNA polimerase e os fatores gerais de transcrição irão se associar para dar início ao processo de transcrição e síntese do pré-RNA⁵². O núcleo da região promotora inclui os elementos cis-regulatórios TATA-box e o elemento iniciador (Inr element). Numerosos dados da literatura mostram uma variabilidade no elemento TATA, sugerindo que promotores com sequências variantes no TATA-box e diferentes estabilidades do complexo TBP-DNA apresentem um mecanismo comum de regulação transcricional^{53,54}. Os acentuadores podem ser localizados próximos ou distantes (mais de 100 pb) do seu gene, e são reconhecidos por proteínas reguladoras. Já as sequências insuladoras protegem a região promotora de um gene da ação das proteínas regulatórias de outros genes⁵².

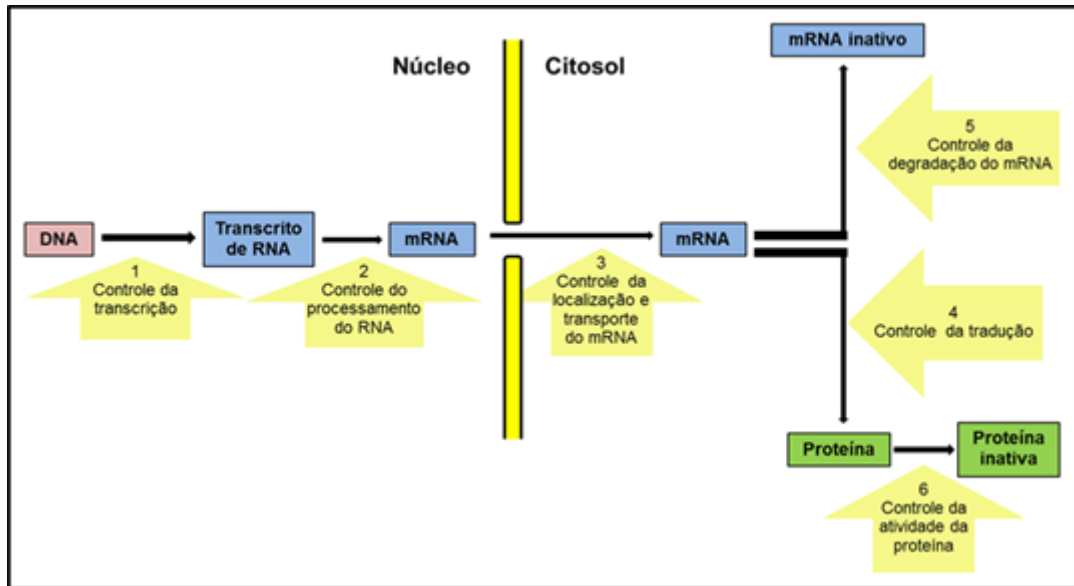


Figura 2. Seis pontos passíveis de regulação da expressão gênica em células eucarióticas ⁵².

Os elementos trans-regulatórios são os fatores de transcrição e as proteínas reguladoras que possuem uma sequência de aminoácidos capaz de reconhecer e se ligar a curtas sequências conservadas contidas no DNA ⁵². Os fatores de transcrição são agrupados em diferentes famílias, de acordo com os diferentes motivos que reconhecem, e podem atuar juntos na mesma região reguladora, potencializando a atividade do complexo transcripcional ⁵⁴. Os fatores gerais de transcrição reconhecem qualquer promotor passível de atuação da RNA polimerase II, possibilitando o início da transcrição pela enzima ⁵². Alguns sítios reconhecidos pelos fatores de transcrição são ubíquos, presentes em todos os tipos de células. A *Specificity protein 1* (SP1), o *Octamer factor 1* (Oct1), GATA-1 e 2 e o ELK1 são exemplos de fatores de transcrição que participam da transcrição da maioria dos genes ⁵⁴. As proteínas reguladoras reconhecem sequências regulatórias no DNA, como os acentuadores, interagindo com as mesmas de modo a ativar ou inibir a expressão ⁵².

1.4.1 O Ca^{2+} e a regulação da transcrição gênica

Vias de sinalização são complexas redes de reações bioquímicas que podem culminar na alteração dos padrões de expressão gênica. Fatores de transcrição funcionam como a interface entre o sistema de sinalização de resposta a estímulos internos ou externos e a informação contida no DNA.

Em resposta a diversos estímulos, as células geram aumentos transientes na concentração de Ca^{2+} intracelular livre ⁵⁵⁻⁸. O Ca^{2+} participa da regulação de cinases

mediadoras de eventos de fosforilação, que organizam as respostas ou modulam a regulação gênica via fatores de transcrição, os quais também podem ser regulados pelo Ca^{2+} ; além disso, alguns promotores são diretamente responsivos ao Ca^{2+} ⁵⁹.

Um exemplo de como o Ca^{2+} modula a atividade transcricional das células é o efeito sobre a expressão do gene da renina. Aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico pode inibir a expressão do gene da renina de maneira independente da atividade da proteína cinase C (PKC)⁶⁰. West et al (2001) descobriram que um influxo de Ca^{2+} induz a transcrição do gene do fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF). A expressão do gene BDNF é passível de regulação pelo padrão de fosforilação induzido no CREB e pelo recrutamento de fatores de transcrição ativos para o promotor do *BDNF*⁶¹. O estudo do efeito do Ca^{2+} extracelular na expressão do gene MMP-9, que pertence a família de genes de metaloproteinases de matrix (MMP), em células de carcinoma oral (OSCC) revelou que o aumento do Ca^{2+} extracelular induz, de maneira dose-dependente, a expressão do MMP-9⁶². Esta expressão é diferencialmente regulada pela ERK1/2 e via da MAPK p38, sugerindo que a perda deste mecanismo regulatório está acompanhada de transformação maligna das células do epitélio oral⁶².

No caso do Ca^{2+} nuclear, a investigação de sua influência na regulação da transcrição gênica em células do sistema imune revelou que um pequeno aumento em sua concentração, mas não um pico, induz a translocação do fator de transcrição NFAT para o núcleo. Dolmetsch et al (1997) demonstraram, em neurônios, que a via de sinalização ERK1/2 é sensível a apenas um pulso de Ca^{2+} . Este pulso é suficiente para ativar a fosforilação de ERK1/2 e CREB. Fosforilação de CREB é importante para o recrutamento do co-ativador transcricional da proteína de ligação ao CREB (CPB)⁶³. Já foi demonstrado que o CPB é regulado por sinais de Ca^{2+} e é suficiente para mediar expressão gênica induzida por Ca^{2+} ^{48,64}. A expressão gênica mediada por CREB e CBP requer Ca^{2+} nuclear e a forma como os neurônios codificam estes sinais influencia a expressão gênica. Também foi demonstrado que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear aumenta a expressão da calcineurina (fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina utilizada como marcador de estresse celular) e induz translocação do NFAT para o núcleo da célula promovendo crescimento nuclear de cardiomiócitos⁶⁵. O Ca^{2+} regula negativamente o fator de transcrição TEAD, o qual apresenta diversas funções relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação celular⁵⁰.

Estes estudos fornecem evidências da influência do Ca^{2+} nuclear na regulação da expressão gênica, de forma a modular respostas a diferentes fatores ambientais, entre as quais

se pode citar a proliferação, migração, invasão e metástase, de maneira que a desregulação da homeostase de Ca^{2+} está relacionada com o desenvolvimento do fenótipo maligno⁶⁶.

1.5 Os alvos moleculares como agentes sensibilizadores no tratamento do câncer

Apesar do aprimoramento das técnicas de diagnóstico e tratamento do câncer de cabeça e pescoço, ainda são muito elevadas as taxas de mortalidade e de recidivas. Recentes avanços nos campos da Biologia Celular e Molecular vêm permitindo a elucidação de eventos críticos relacionados à tumorigênese, revelando vias de sinalização intracelular como potenciais alvos moleculares terapêuticos, com o objetivo de otimização do controle local e minimização de metástases, além da redução dos danos a tecidos normais circunvizinhos⁶⁷.

A terapia molecular é promissora no que tange o aumento da sensibilidade aos tratamentos convencionais e diminuição dos efeitos adversos. Estudos vêm mostrando que a terapia molecular é capaz de melhorar o resultado do tratamento sem levar ao aumento da toxicidade. Além disso, o reconhecimento das bases moleculares da carcinogênese possibilita também a elucidação de novos marcadores, mais precisos, de diagnóstico e prognóstico⁶⁸.

Várias técnicas vêm sendo utilizadas visando alvos moleculares no câncer, como anticorpos monoclonais, moléculas antisense, inibidores de moléculas específicas, conjugados anticorpos-toxina e vacinas antitumorais, os quais já estão sendo utilizados em alguns tipos de câncer. No caso do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, os principais alvos são os componentes de vias que, frequentemente, se encontram desreguladas neste tipo de câncer, como EGFR, VEGFR, Src, NF κ B e Histona desacetilase^{69,70}.

O EGFR, por exemplo, se encontra superexpresso em cerca de 90% dos casos e está relacionado com vias que regulam a sobrevivência e proliferação celular, bem como a evasão da apoptose e radioresistência. Agentes anti-EGFR vem emergindo como potenciais alvos moleculares no tratamento de alguns tipos de tumores sólidos, como o câncer colorretal e HNSCC⁷¹. O tamponamento do Ca^{2+} é capaz de inibir a superexpressão de EGFR e ADAM-17 induzidas por doses cumulativas de irradiação⁷². Alguns agentes com múltiplos alvos moleculares também são cogitados como opção no tratamento de HNSCC, como o *Sorafenib*, o qual inibe diversas tirosino-cinases como VEGFR, PDGFR, KIT (stem cell fator receptor) e Raf 1 kinase^{73,74}. BIBF 1120, o qual inibe simultaneamente VEGFR, PDGFR, FGFR e Src⁷⁵. A Histona desacetilase está associada a diversos neoplasmas, inclusive, HNSCC, uma vez que regula a acetilação de histonas e de proteínas não histônicas, como p53, p21, entre outras.

Inibidores dessa enzima inibem crescimento e diferenciação celulares e induzem apoptose, além de induzir a radiosensibilidade⁷⁶.

Apesar de diversos estudos apontarem para o potencial dos agentes moleculares como sensibilizadores do HNSCC aos tratamentos convencionais, hoje, apenas o Cetuximab, um anticorpo monoclonal anti-EGFR, é aprovado para o uso no tratamento desse tipo de tumor. Ainda são necessários muitos estudos para que se obtenha aplicações clínicas dos alvos moleculares e, nesse sentido, é indispensável a melhor elucidação do perfil molecular do HNSCC, focalizando em marcadores preditivos de resposta ao tratamento e alvos potenciais para o tratamento molecular⁶⁸.

2 JUSTIFICATIVA

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. O entendimento *in vitro* dos fenômenos decorrentes da irradiação de células de tumores de cabeça e pescoço ajuda a compreender os mecanismos que favorecem o desenvolvimento das células sobreviventes à radiação e seu reflexo sobre a saúde do paciente. Além disso, o acréscimo de novos veículos potencializadores da resposta celular à radiação ionizante será mais bem compreendido a partir de metodologias que possam empregar o desenvolvimento de novos alvos capazes de otimizar as terapias já existentes.

Em pesquisas recentes, nosso grupo estudou a redução da proliferação celular *in vitro* e *in vivo* de tumores hepáticos, através do tamponamento do Ca^{2+} nuclear⁴⁶. Observamos também que o tamponamento deste íon seletivamente no núcleo das células, regula a expressão de genes ligados à proliferação de tumores humanos⁷⁷. As observações decorrentes da experiência do grupo, usando o tamponamento do Ca^{2+} nuclear como terapia gênica para o tratamento do câncer hepático, motivou o emprego desta mesma técnica, como nova estratégia a ser associada à radioterapia para o tratamento do câncer cabeça-pescoço.

A identificação de genes de expressão diferencial, cuja transcrição é regulada pelo Ca^{2+} , envolvidos na proliferação e na radioresistência de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) direciona a busca por marcadores de prognóstico e diagnóstico consistentes, contribuindo para o desenvolvimento da terapia molecular como adjuvante as terapias clássicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o impacto do tamponamento do Ca^{2+} nuclear na expressão gênica diferencial associada à radioresistência no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

3.2 Objetivos específicos

Identificar genes diferencialmente expressos por células do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço submetidas à terapia cumulativa de radiação X associada ou não ao tamponamento de Ca^{2+} nuclear;

Validar a expressão gênica diferencial induzida pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear associado à terapia cumulativa de raios X nos níveis transcricional e fenotípico;

Investigar o papel dos genes selecionados na radioresistência em células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Utilizamos o Kit *Silencer siRNA* Construction (Ambion) para a síntese dos siRNAs, os quais foram transfectados nas células com o kit RNAifect (Quiagen). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScriptTM-III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) (Carlsbad, CA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

A membrana de PVDF (Hercules, CA) foi utilizada em transferências de Western Blot. Para extração de proteínas foi utilizado o coquetel de inibidor de protease da Sigma Roche Applied Science (Saint Louis, MO). O kit ECL *plus* da GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) foi utilizado para revelação do Western Blot em filme de raio-X da Bio MaxTMML, KODAK (Buckinghamshire, UK). O reagente Trizol Invitrogen (Carlsbad, CA) foi utilizado para extração de RNA.

Anticorpos policlonais contra NLK e Kinesina foram obtidos da ABCAM (Cambridge, MA) e anticorpo policlonal contra a Calpaína foi obtido da Santa Cruz Biotechnology. Anticorpos secundários Alexa-488 e Alexa-568 foram obtidos da Molecular Probes Inc (Eugene, Oregon) e os anticorpos secundários conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Biosciences, os quais foram utilizados para ensaios de imunofluorescência e Western Blot, respectivamente.

O adenovírus recombinante IP₃ Sponge-NLS foi fornecido pelo laboratório do Dr. Michael H. Nathanson da Universidade de Yale, (New Haven, NY). O plasmídeo pZeRo.1 foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA).

4.2 Linhagem celular

Foram utilizadas células da linhagem A431, de carcinoma epidermóide escamoso humano, cujo comportamento radioresistente é bem conhecido⁷⁸⁻⁸¹. As células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (RJCB) e foram imediatamente expandidas e congeladas. O cultivo foi realizado a 37°C, com 5% de CO₂, em RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, na presença de penicilina (50 U/mL), estreptomicina (50g/mL), todos de marca GIBCO.

4.3 Tamponamento do Ca²⁺ nuclear

Para tamponar exclusivamente o Ca²⁺ nuclear, foi utilizada uma construção adenoviral contendo cDNA do domínio de ligação ao IP₃ (resíduos 224-605) do IP₃R tipo I, fusionado à

proteína fluorescente vermelha (RFP) e à sequência de localização nuclear (NLS), como descrito⁴⁷.

4.4 Irradiação de células

As células A431 foram irradiadas conforme descrito⁷². Foi utilizada, mergulhada em meio aquoso, uma plataforma acrílica, com dimensões de 27X25 centímetros para manter as células na posição adequada durante a irradiação (Figura 2). A distância SAD (source-axis) era de 80 cm; os ângulos eram de 180° e 0° e a distância SSD (source-surface) era de 695.0 mm e 650.0 mm. As células foram irradiadas com doses diárias de 2Gy durante três dias. Para manter o equilíbrio durante a irradiação, os frascos de T25 foram completamente preenchidos com RPMI. As condições do ambiente eram 21°C, umidade relativa do ar de 40% e pressão atmosférica de 92.2 kPa.

4.5 RaSH (Rapid Subtraction Hybridization)

Esta técnica, descrita por Jiang et al 2010, permite a análise de expressão diferencial através de subtração por hibridização capaz de isolar genes que são expressos em uma determinada condição pré estabelecida⁸². A metodologia do RaSH está representada na forma de esquema na figura 4. As duas condições confrontadas na subtração foram células A431 irradiadas e células A431 irradiadas e com o Ca²⁺ nuclear tamponado (infectadas com o adenovírus).

4.5.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Sigma) e o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987)⁸³. Após homogeneização das amostras de células com Trizol, o complexo formado foi incubado por 5 minutos a 30°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C e 13000 RPM. A fase superior foi coletada e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico por 16 horas a -80°C. Nova centrifugação a 8.000g por 10 minutos e lavagens com etanol 70% foram realizadas e o RNA foi ressuspensionado em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80°C até seu uso. A concentração do RNA foi estimada pela fórmula: [RNA] µg/µL = (A260 f x 40/1000), onde f é o fator de diluição e 40 é o fator de conversão, utilizando a absorbância determinada por espectrofotometria.

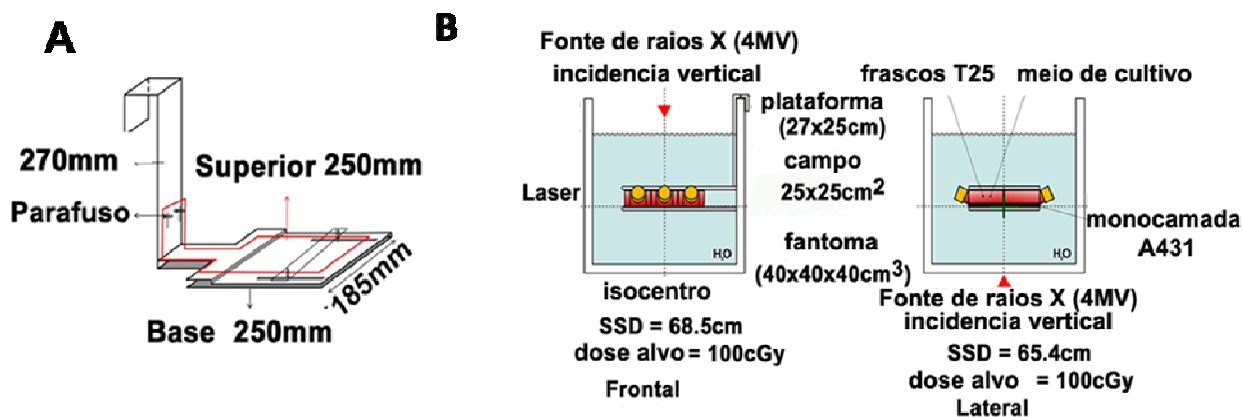


Figura 3. Desenho esquemático da metodologia de irradiação *in vitro*. Plataforma acrílica utilizada para manter as células corretamente posicionadas durante a irradiação (A). Vistas esquemáticas do fantoma. Seis garrafas cheias de meio de cultura foram imersas na fantoma acrílico, contendo uma coluna de água de 25 centímetros de altura (B). O sistema foi utilizando a técnica isocêntrica⁷².

4.5.2 Síntese da primeira e segunda fitas de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o SuperScript™-III First-Strand Syntesis System for RT-PCR, de acordo com as recomendações do fabricante. Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0,5 .g de oligo(dT)12- 18 a 70°C por 10 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, os quatro dNTPs 0,5 mM cada e DTT (ditiotreitól) 5 mM, e foram incubadas a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima SuperScript III RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen) e as amostras foram incubadas por mais 50 minutos a 42°C.

Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA do híbrido DNA/RNA foi degradado por incubação com duas unidades de RNase H (Invitrogen) a 37.°C, por 20 minutos. Para cada reação de síntese da primeira fita foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa. Para a síntese da segunda fita, foram adicionados ao volume total obtido na reação de primeira fita, 0,3 mM de dNTPs, uma unidade de DNA ligase (10U/μl) (Invitrogen), 40 unidades de DNA polimerase I de *E. coli* (10U/μL) uma unidade de Rnase H (2U/μL) em um volume final de 100 μL. Esta reação foi incubada por 2 horas a 16°C e depois foi acrescentado 5 unidades de T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação foi extraída com fenol/clorofórmio, precipitada em etanol e ressuspensa em água DEPC.

4.5.3 Preparação da biblioteca de cDNA baseada em PCR

A subtração foi realizada entre os cDNAs TESTER e DRIVER obtidos de RNA de células A431 irradiadas ou não irradiadas e com o Ca^{2+} tamponado. Todo o volume de cDNA obtido foi digerido com a enzima de restrição DpnII (Invitrogen) a 37°C por 1 hora, seguido por extração com fenol/clorofórmio e precipitação em etanol. O cDNA digerido foi ligado a adaptadores XDPN12 e XDPN14 (Tabela 1) na concentração final de 20 μM em 30 μL de tampão de ligação, aquecido a 55°C por 1 minuto e incubado a 14°C por 1 hora. T4 DNA ligase (15 unidades) foram adicionados à reação e deixados a 14°C por 16 horas. A mistura foi diluída para 100 μL com tampão Tris 10mM, EDTA 1mM pH 7. Desta reação, 40 μL foram utilizados para amplificação por PCR. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μL contendo 1,0 μM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase, 10 μM do primer XDPN18 (Tabela 1), tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM) e MgCl_2 2,5 mM. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas na Tabela 1. Os parâmetros da reação de PCR foram: 1 ciclo de 5 min a 72°C, seguidos por 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e 1 ciclo de 3 min a 72°C. O produto de PCR foi purificado por extração com fenol/clorofórmio e precipitado em etanol. Uma porção do produto de PCR TESTER foi digerida com a enzima de restrição Xho I, gerando dois grupos de bibliotecas de cDNA: um com sítios de restrição para Xho I (TESTER) e outro sem o sítio (DRIVER).

4.5.4 Hibridização subtrativa e geração da biblioteca subtrativa

3 μg do cDNA TESTER foram misturados com 10 μg de cDNA DRIVER em 10 μL de solução de hibridização [NaCl 0,5 M, Tris 50 mM pH 7,5, SDS 0,2% e formamida 40% (vol/vol)], fervido por 5 minutos e incubados a 42°C por 48 horas. A mistura de hibridização foi extraída com fenol/clorofórmio, precipitada em etanol e dissolvida em 20 μL de tampão Tris 10 mM/EDTA 1mM pH 7. Parte desta mistura foi ligada a 1 μg do vetor pZeRo.1 previamente digerido com a enzima Xho I, a 14°C por 16 horas e o produto da ligação foi transformado em bactéria *E. coli* DH10B, por eletroporação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na subtração e nas reações de PCR em Tempo Real

Primer	Sequência (5'-3')
XDPN12	GATCTCTCGAGT
XDPN14	CTGATCACTCGAGA
XDPN18	CTGATCACTCGAGAGATC
Basigina Forward	CCG AGG ACG TCC TGG AT
Basigina Reverse	CGG GCC ACC TGC CTC A
TGF β Forward	CCC AGC ATC TGC AAA GCT
TGF β Reverse	GTC AAT GTA CAG CTG CCG CA
Kif1B β Forward	ACT TCT AGC TGG CAC AAT ACG
Kif1B β Reverse	GTC ACC GTC AAG AAT CAC AAA G
NLK Forward	CAG CCA TAT TTC CAT CAC C
NLK Reverse	GAC AAC ACC AAA GGC TCC AT
PSAT Forward	CCT CGG TCC TGG AAT ACA AG
PSAT Reverse	GCC AGC TTC TGA ACG TCT TC
Calpaína Forward	CCG AAC ACA TTC TGG ATG AA
Calpaína Reverse	AGG TTG ATG AAG GTG TCT GAG

4.5.5 Screening das colônias

Células hospedeiras *E. coli* DH10B foram submetidas à lise alcalina após crescimento em meio LB, contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, por 12 a 16 horas. As colônias de bactérias foram selecionadas randomicamente e submetidas à amplificação por PCR de colônia utilizando primers universais M13 (forward e reverse). A integridade dos plasmídeos foi confirmada em gel de agarose 1,5%. Os clones selecionados foram submetidos ao sequenciamento.

4.5.6 Sequenciamento e análise dos resultados

O produto do PCR de colônia foi sequenciado utilizando os primers M13 forward e M13 reverse. As reações de sequenciamento foram conduzidas com o kit Dyanamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) conforme recomendações do fabricante, e analisadas pelo sequenciador MegaBace, da Plataforma de Genômica do centro de Pesquisas René Rachou. As seqüências obtidas mostraram alta qualidade de nucleotídeos e a busca por similaridades

foi feita com outras seqüências depositadas no GenBank através do programa BLASTn⁸⁴ do “National Center for Biotechnology Information”– NCBI⁸⁵.

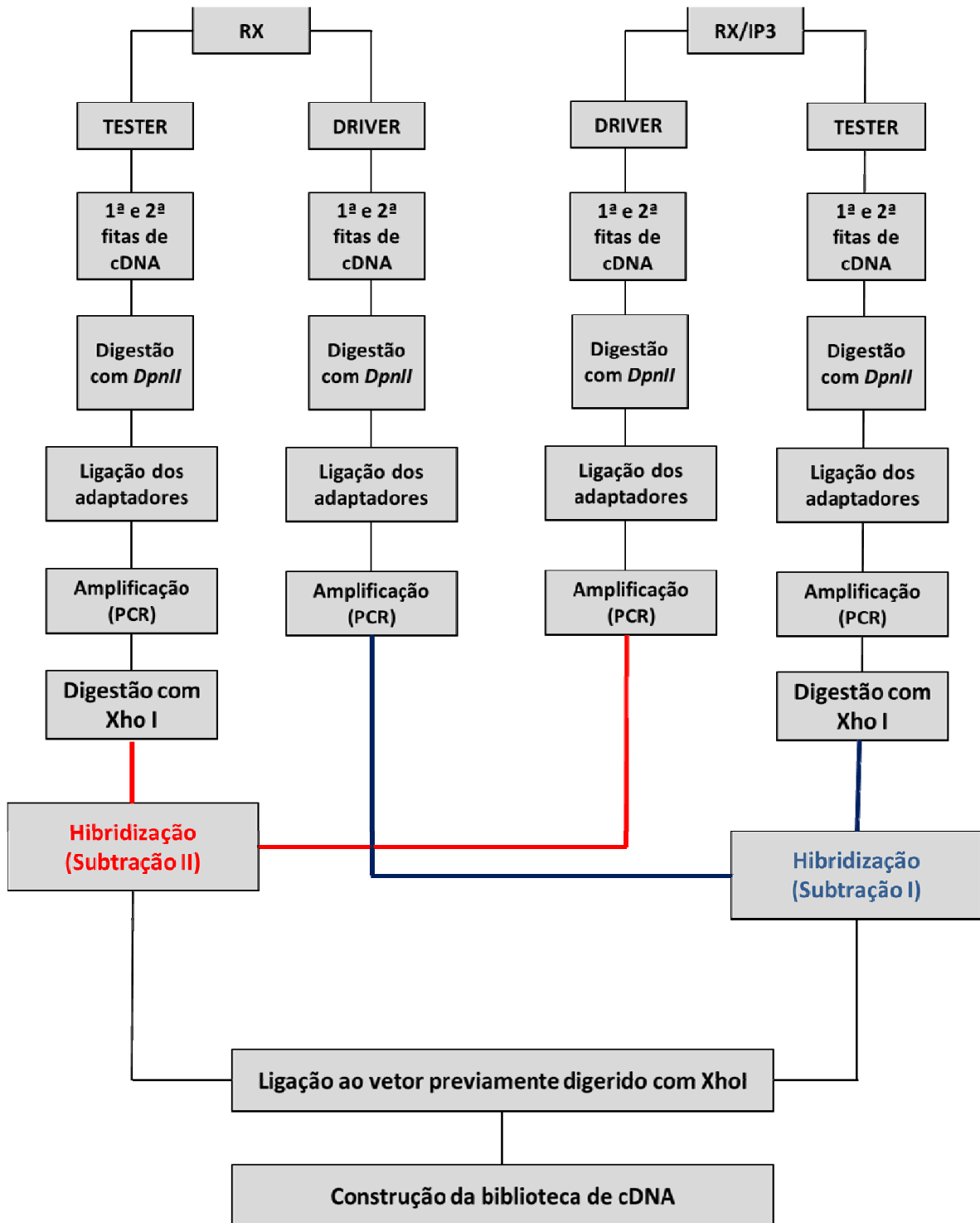


Figura 4. esquema ilustrativo da metodologia RaSH. Após a extração de RNA, foram sintetizados cDNA de fita dupla de cada condição. Os cDNAs foram digeridos, ligados a adaptadores e, posteriormente, amplificados por PCR. As amostras de TESTER (uma de cada

condição) foram digeridas novamente com XhoI e foi feita a hibridização. O produto da hibridização foi ligado ao vetor pZero, permitindo a construção da biblioteca de cDNA.

4.6 PCR em Tempo Real

Em experimento independente, o RNA total de células A431 das duas condições foi extraído, o cDNA foi produzido com o kit SuperScript™-III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. A amplificação foi realizada com o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watermown, MA) utilizando 1- 3 µL de cDNA, 200 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 400 nM de cada primer para um volume final de 25 µL. Os primers utilizados foram específicos para cada gene e estão descritos na Tabela 1.

4.7 Western Blot

Células crescidas em frascos de cultivo celular medindo 35 mm (T25) foram lavadas com PBS--1X e solubilizadas em 150 µL de solução detergente: Nonide P40 1% contendo 2% de inibidor de protease (Roche Applied Science). A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford. 10-60 µg de proteína foram separados em gel de poliacrilamida 10% e transferidos para membrana de PVDF (Bio Rad). 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 e depois, incubadas com anticorpos primários policlonais anti-Calpaína (1:100); anti-Kinesina (1:500), anti-NLK (1:250) ou com o anticorpo monoclonal anti-GAPDH (1:5000) por 12 horas. Após 3 lavagens com TBST 1X, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários *anti-rabbit*, *anti-goat* e *anti-mouse* conjugados à peroxidase (1:5000) a 4°C. As membranas foram novamente lavadas 5 vezes e, posteriormente expostas ao reagente de detecção ECL *plus* (GE Healthcare), por 5 minutos. Após este tempo, o excesso de reagente foi removido e as membranas foram expostas ao filme de raio-X (Bio Max™ML, KODAK) por tempos determinados. Nessa etapa, a peroxidase reage com o seu substrato formando um composto quimiluminescente. O filme foi revelado com solução reveladora até o aparecimento de bandas, em seguida lavada em água e colocada em solução fixadora por mais 2 minutos, e então, colocados para secar.

4.8 Silenciamento

Os oligonucleotídeos *sense* (AAAACACTCTCAACACTTTCCTGTCTC) e *antisense* (AAAGTGTGGAGAGTGTTTTTCCTGTCTC) foram desenhados após estudo da sequência

gênica codificadora do gene da Kinesina, conforme algoritmo descrito⁸⁶. O siRNA foi produzido com o Kit *Silencer siRNA Construction* (Ambion) e quantificados por espectrofotometria. 5×10^5 células foram plaqueadas em frascos T25 e, após 24 horas, transfectadas ou não com 10 μ g de siRNA, utilizando o Kit RNAifect, segundo recomendações do fabricante. Decorridas 24 após a transfecção, as células foram irradiadas por três dias (doses diárias de 2Gy) e plaqueadas em placas de 6 well para realização do ensaio clonogênico.

4.9 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado conforme descrito⁸⁷. As células foram plaqueadas em frascos T25 e transfectadas, após 24 horas, com o siRNA específico para o gene da Kinesina ou com siRNA inespecífico. 24 horas após a transfecção, parte dos frascos foram submetidos a três dias de irradiação, com dose diária de 2 Gy. 5 horas após a última dose, as células foram contadas e plaqueadas nas densidades $1,0 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^3$ em placas de seis well, contendo 5 mL de meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por dez dias e, depois, marcadas com uma solução de glutaraldeído 6% (Merck, Darmstadt, Germany) e cristal violeta 0,5% (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) por 12 horas. A mistura foi removida e as colônias foram contadas e fotografadas.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de genes diferencialmente expressos por células do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço submetidas à terapia cumulativa de radiação X associada ou não ao tamponamento de Ca^{2+} nuclear.

Em trabalho publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear em células A431 é capaz de sensibilizá-las ao tratamento radioterápico, uma vez que leva à redução da taxa de proliferação das células e à redução da sobrevivência após a irradiação⁷². Com o objetivo de investigar quais genes estariam relacionados à radiosensibilização induzida pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear nas células A431, realizamos um estudo de expressão diferencial baseado em uma metodologia de análise por subtração. Para tanto, utilizamos a metodologia RaSH (Rapid Subtraction Hybridization), a qual já havia sido utilizada pelo nosso grupo, revelando o gene da Legumina como envolvido na regulação da proliferação de células SKHep1⁷⁷. Este protocolo permite comparar a expressão gênica em duas condições distintas, nesse caso, células submetidas à terapia cumulativa de radiação X (RX) e células submetidas à terapia cumulativa de radiação X com o Ca^{2+} nuclear tamponado (RX/ Ca^{2+}_T). As condições utilizadas na realização do tamponamento de Ca^{2+} e na obtenção dos clones diferencialmente expressos estão detalhadamente descritas em Materiais e Métodos.

De maneira simplificada, as células foram infectadas com a construção adenoviral IP₃ Sponge- NLS, capaz de tamponar os sinais de cálcio especificamente no núcleo, fusionado à proteína fluorescente vermelha, para monitoramento da taxa de infecção⁴⁷. 48 horas após a infecção, as células foram irradiadas por três dias consecutivos, em uma plataforma acrílica contendo meio aquoso, de maneira a mimetizar uma condição clínica em radioterapia. Foi escolhido o terceiro dia de irradiação cumulativa porque é neste tempo que a proliferação celular e a fração de sobrevivência começam a decrescer⁷². No terceiro dia, foi extraído o RNA total das células submetidas a cada condição. A partir do RNA, seguindo os passos já descritos na Metodologia, foram obtidas amostras TESTER e DRIVER para cada uma das condições. Estas amostras foram incubadas para permitir a hibridização, da seguinte maneira: TESTER (3 μg) das células irradiadas com o Ca^{2+} nuclear tamponado com DRIVER (10 μg) das células irradiadas (Subtração I) e vice-versa (Subtração II). As amostras TESTER de cada condição foram previamente digeridas com a mesma enzima de restrição do vetor utilizado na clonagem (pZero); Os fragmentos não hibridizados, dessa forma, são inseridos no plasmídeo para posterior obtenção da biblioteca de cDNA. A incubação de uma quantidade de DRIVER

mais de três vezes superior à de TESTER se propõe a garantir a hibridização dos fragmentos complementares, ou seja, presentes em igual quantidade nas duas condições. Assim, apenas os fragmentos que restarem, não hibridizados e digeridos, serão inseridos no vetor. As colônias de bactérias foram selecionadas randomicamente e submetidas à amplificação por PCR de colônia (dados não mostrados) e posterior sequenciamento. Foram selecionados, ao todo, 91 clones, distribuídos de acordo com a Tabela 2. Quando utilizamos o tamponamento do Ca^{2+} nuclear (RX/ Ca^{2+}_{τ}) como TESTER, selecionamos genes que têm a expressão aumentada em níveis diminuídos de Ca^{2+} nuclear; quando o TESTER são as células apenas irradiadas (RX), seleciona-se genes mais expressos em níveis normais de Ca^{2+} nuclear.

Tabela 2. Número de clones selecionados em cada condição de subtração, pelo método RaSH

Subtração	Condição	Clones
I (TESTER RX)	Radioterapia cumulativa	63
II (TESTER RX/ Ca^{2+}_{τ})	Radioterapia cumulativa/tamponamento de Ca^{2+} nuclear	28

Os clones positivos foram sequenciados e oito deles apresentaram similaridade com proteínas conhecidas presentes no banco de dados do GeneBank (considerando identidade variando entre 93% e 100%) (Tabela 3).

Tabela 3. Similaridade dos clones positivos com sequências depositadas no *genebank*.

Clones – GeneBank	Número de acesso	Expressão diferencial
Kinesina (KIF1- β)	NM_183416.3	95%
Receptor de TGF- β (TGF β -R)	NM_001130916.1	93%
Basigina	NM_001728.3	97%
Calpaína 1 (Capn1)	NM_001749.2	97%
Calpaína 2 (Capn2)	NM_001003962.1	97%
Fosfoserina aminotransferase (PSAT)	NM_058179.3	95%
Nemo-like Kinase (NLK)	NM_058179.3	98%
NADP oxidase	NM_007052.4	95%
Integrina (ITG- β 7)	NM_000889.1	94%

5.2 Validação da expressão gênica diferencial induzida pelo tamponamento do Ca²⁺ nuclear associado à terapia cumulativa de raios X.

Entre os genes revelados pelo sequenciamento, escolhemos sete para serem submetidos à análise por PCR em Tempo Real, visando validar, quantitativamente, no nível transcricional, os dados obtidos na subtração (figura 5).

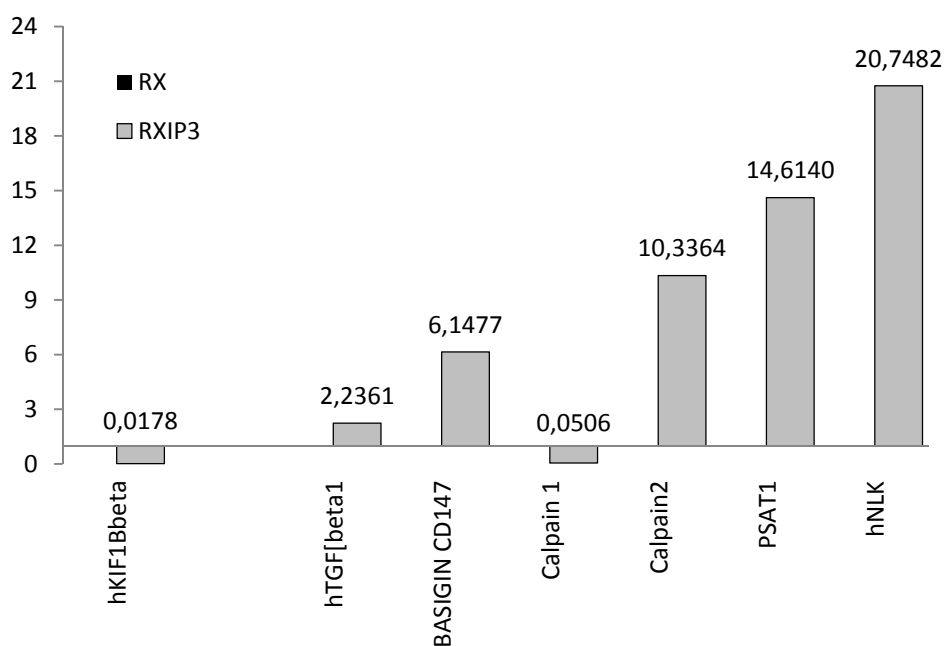


Figura 5. Expressão diferencial quantitativa dos genes obtidos na subtração. O gráfico sumariza os resultados obtidos por PCR em Tempo Real, que mostraram as alterações de expressão induzidas pelo tamponamento de Ca^{2+} . A expressão dos genes na condição RX é considerada =1 (eixo X).

De fato, as alterações de expressão dos genes selecionados, constatadas na subtração foram confirmadas, com exceção do gene da Calpaína 1. Nesse caso, a análise por *blastn* não fora suficiente para distinguir a isoforma com a qual o clone apresentava homologia. Foram, então, desenhados dois pares de primers específicos para as isoformas 1 e 2 da Calpaína. Os resultados obtidos na subtração foram confirmados apenas para a Calpaína 2, sugerindo ter sido ela a isoforma selecionada pelo método subtrativo. Os dados da expressão diferencial qualitativa e quantitativos estão mostrados na Tabela 4.

Com base nos resultados obtidos por PCR em Tempo Real, foram escolhidos três genes para a validação no nível fenotípico. Os critérios utilizados na escolha dos referidos genes foram a maior proeminência da expressão diferencial e o possível envolvimento em vias relacionadas com a progressão tumoral, de acordo com a literatura.

Tabela 4. Expressão gênica diferencial qualitativa (subtração) e quantitativa (qPCR) dos clones selecionados.

Clones	Expressão diferencial qualitativa (Subtração)	Expressão diferencial quantitativa (qPCR)
Kinesina (KIF1-β)	> RX	50 x > RX
Receptor de TGF-β (TGFβ-R)	> RX/ Ca ²⁺ _T	2 x > RX/ Ca ²⁺ _T
Basigina	> RX/ Ca ²⁺ _T	6 x > RX/ Ca ²⁺ _T
Calpaína 1 (Capn1)	<u>> RX/ Ca²⁺_T</u>	20 x < RX/ Ca ²⁺ _T
Calpaína 2 (Capn2)	> RX/ Ca ²⁺ _T	10 x > RX/ Ca ²⁺ _T
Fosfoserina aminotransferase (PSAT)	> RX/ Ca ²⁺ _T	14 x > RX/ Ca ²⁺ _T
Nemo-like Kinase (NLK)	> RX/ Ca ²⁺ _T	20 x > RX/ Ca ²⁺ _T
NADP oxidase	> RX/ Ca ²⁺ _T	-
Integrina (ITG-β 4)	> RX/ Ca ²⁺ _T	-

> RX: expressão aumentada na condição RX (apenas irradiação).

> RX/ Ca²⁺_T: expressão aumentada na condição RX/ Ca²⁺_T (irradiação associada ao tamponamento de Ca²⁺).

- Não Realizado

Inconsistência entre os dados obtidos na subtração e no qPCR destacada em **negrito**.

Na condição de presença de Ca²⁺ (RX), foi selecionado o gene kif1B, codificante de um membro da superfamília das Kinesinas. O splicing alternativo do gene kif1B pode gerar duas isoformas, α e β. As Kinesinas são proteínas motoras bastante conservadas, envolvidas em diversas funções celulares, tais como mitose, meiose e transporte de macromoléculas. Sabe-se que anormalidades no processo de divisão celular estão no cerne da etiologia de tumores; uma vez que, na mitose, as Kinesinas participam da formação do fuso, da separação e alinhamento dos cromossomos e da citocinese, há indícios de que estejam relacionadas à progressão tumoral. A KIF1B é abundante em todos os tipos celulares, onde pode ser

encontrada livre no citosol. Diversos estudos já demonstraram que alterações na expressão das Kinesinas estão relacionadas ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores⁸⁸.

Foi realizado Western Blot para validar a expressão diferencial da Kinesina induzida pelo tamponamento de Ca^{2+} no nível traducional. Assim como nos níveis de RNAm, foi observada a diminuição da expressão da Kinesina na condição de ausência de Ca^{2+} (Figura 6). A expressão da proteína diminuiu $23 \pm 7\%$ ($p < 0,03$) na condição de tamponamento, quando comparada com as células apenas irradiadas.

Na condição de tamponamento de Ca^{2+} (RX/ Ca^{2+}_T), foram detectados como mais expressos dois genes: o gene da Calpaína (Capn2) e o da NLK (Nemo-like kinase). As Calpaínas compõem uma família de mais de 12 cisteíno-proteases dependentes de Ca^{2+} bem conservadas. São heterodímeros formados por uma subunidade pequena e invariável (regulatória) e uma subunidade grande variável, onde é localizado o domínio cisteíno-protease. As duas isoformas de expressão ubíqua são a Calpaína I e a calpaína II ou μ -calpaína e m-calpaína, conforme são ativadas por menores ou maiores níveis de Ca^{2+} ; as demais isoformas são tecido-específicas⁸⁹. Sua ativação pode ser desencadeada pelo influxo de Ca^{2+} , por estresse oxidativo, por EGF e VEGF e sua atividade é especificamente inibida pela calpastatina.

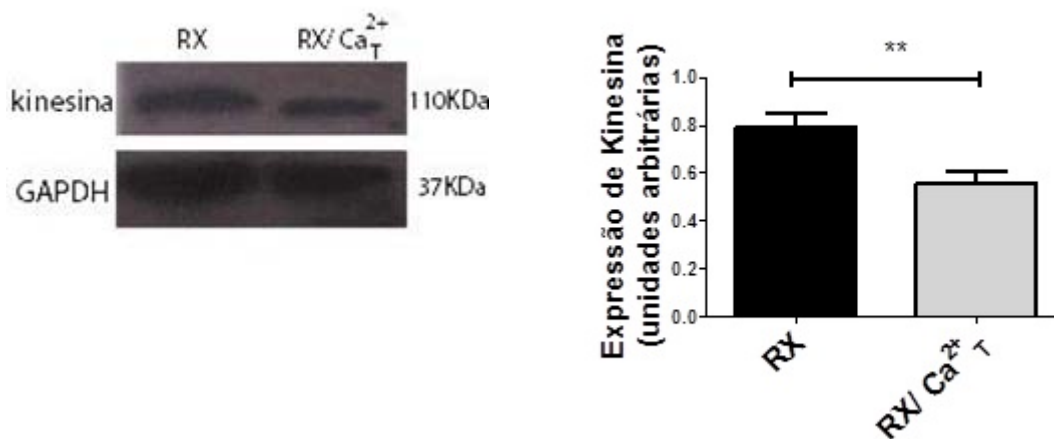


Figura 6. Expressão da Kinesina. Análises de Western Blot de proteínas totais extraídas de células A431 após irradiação sozinha (RX) ou associada ao tamponamento do Ca^{2+} nuclear (RX/ Ca^{2+}_T). A imagem demonstra que a expressão de Kinesina é diminuída pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Análises de densitometria confirmam redução na expressão da proteína comparada ao controle (RX) (** $p < 0,03$). Expressão de GAPDH foi utilizada como controle da reação. Os resultados são representativos da média \pm desvio padrão de três experimentos individuais. N=3

A análise por PCR em Tempo Real confirmou os dados obtidos na subtração apenas para a isoforma 2, sendo esta a selecionada para ser submetida aos ensaios que se seguiram.

Análises de resultados obtidos por Western Blot confirmaram, no nível traducional, o aumento da expressão induzida pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear (Figura 7). Os níveis da proteína se mostraram $11 \pm 4\%$ ($*p < 0,05$) aumentados na ausência de Ca^{2+} , quando comparados aos níveis expressos em células apenas irradiadas.

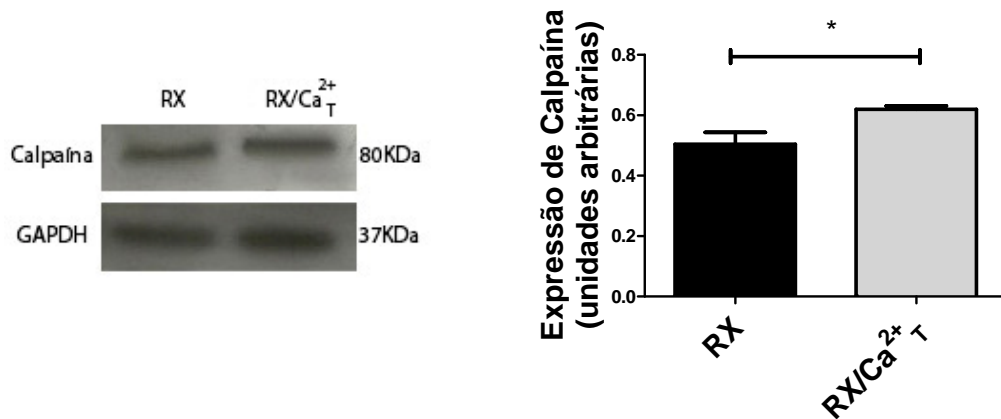


Figura 7. Expressão da Calpaína 2. Análises de Western Blot de proteínas totais extraídas de células A431 após irradiação sozinha (RX) ou associada ao tamponamento do Ca^{2+} nuclear (RX/ Ca^{2+} _T). A imagem demonstra que a expressão de Calpaína é aumentada pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Análises de densitometria confirmam redução na expressão da proteína comparada ao controle (RX) ($*p < 0,05$). Expressão de GAPDH foi utilizada como controle da reação. Os resultados são representativos da média \pm desvio padrão de três experimentos individuais. N=3

Outro gene selecionado na condição de ausência de Ca^{2+} foi o *nlk*, codificante da *Nemo-Like Kinase*, uma cinase do tipo MAPK bem conservada, envolvida em diversos eventos relacionados ao desenvolvimento. Sabe-se que a NLK regula diversas vias de sinalização através da fosforilação de fatores de transcrição⁹⁰⁻² e que polimorfismos localizados em seu gene estão relacionados ao risco de câncer de ovário⁹³. Além disso, análises dos níveis de NLK em amostras de câncer de próstata por PCR em Tempo Real e Imuno-histoquímica mostraram que sua expressão está diminuída em amostras de metástase, em relação a tecidos normais e que a superexpressão resulta na indução de apoptose e na inibição da transcrição de genes envolvidos na via de sinalização do receptor de andrógeno⁹⁴. Sua expressão diferencial constatada em nível transcricional foi confirmada em nível traducional por Western Blot. As células submetidas ao tamponamento de Ca^{2+} associado à irradiação exibiram níveis de expressão de NLK $8 \pm 0,2\%$ ($*p < 0,05$) maiores do que as células apenas irradiadas (Figura8).

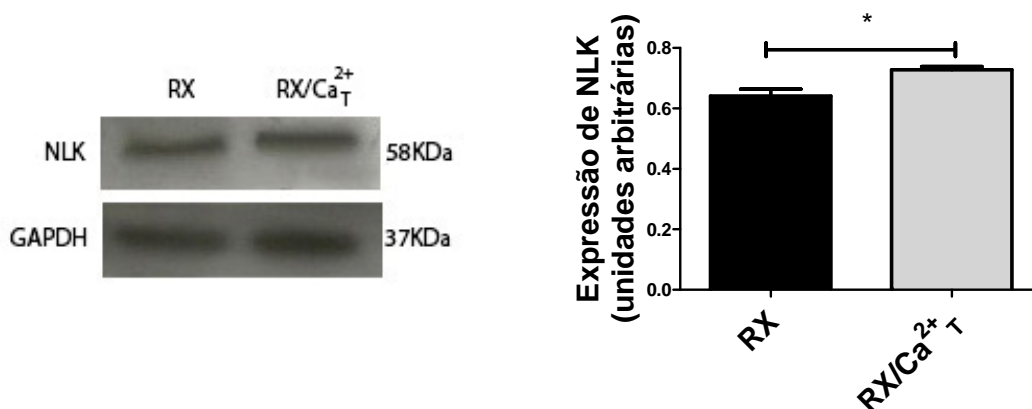


Figura 8. Expressão da NLK. Análises de Western Blot de proteínas totais extraídas de células A431 após irradiação sozinha (RX) ou associada ao tamponamento do Ca²⁺ nuclear (RX/ Ca²⁺_T). A imagem demonstra que a expressão de NLK é aumentada pelo tamponamento do Ca²⁺ nuclear. Análises de densitometria confirmam aumento na expressão da proteína comparada ao controle (RX) (*p<0,05). Expressão de GAPDH foi utilizada como controle da reação. Os resultados são representativos da média ± desvio padrão de três experimentos individuais.

5.3 Investigação do papel dos genes selecionados pela subtração na radioresistência em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

Uma vez confirmada a expressão diferencial das três proteínas-alvo de nosso estudo, o próximo passo foi investigar a sua influência na indução da radiosensibilização observada mediante tamponamento do Ca²⁺ nuclear. Procedemos ao silenciamento da Kinesina, com o uso de siRNA pois, sendo mais expressa em RX, seu *Knockdown* seria compatível com a condição de tamponamento de do Ca²⁺ nuclear. A investigação do efeito dos outros dois genes na radiosensibilização, sendo mais expressos em RX/Ca²⁺_T, demandaria a realização de superexpressão dos mesmos, o que foi deixado à cargo de futuros trabalhos, dada a maior complexidade dos ensaios.

As células foram transfectadas com siRNA específico para Kinesina ou com siRNA inespecífico e, após 24 horas, submetidas a três dias consecutivos de Raios X cumulativos, com dose de 2Gy por dia. Para determinar se o silenciamento da Kinesina é capaz de reproduzir os efeitos do tamponamento na sobrevivência das células após a irradiação, foi realizado o ensaio clonogênico, como previamente descrito⁸⁷. Esse ensaio é padrão ouro para determinação da radiosensibilidade, pois considera todas as modalidades de morte celular induzidas pela irradiação (catástrofe mitótica, autofagia e apoptose)⁹⁵. Quando comparadas as frações de sobrevivência, constatamos uma redução de 90±2% (p<0,001) nas células irradiadas e com a Kinesina silenciada, quando comparadas às células apenas irradiadas. Quando comparadas com o controle (células não irradiadas ou silenciadas), a irradiação promoveu

uma redução de $75 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) da fração de sobrevivência e o silenciamento, uma redução de $60 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) (Figura 9). Estes dados mostram que a associação do silenciamento da Kinesina à terapia cumulativa de RX é capaz de promover a redução da fração de sobrevivência de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, indicando que favorece a radiosensibilização das mesmas.

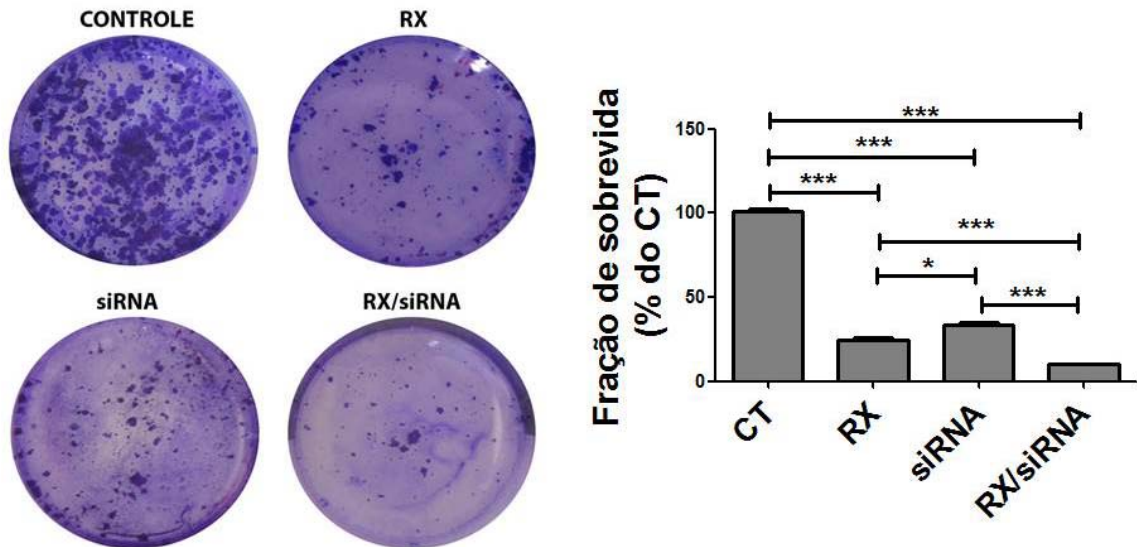


Figura 9. Análise da fração de sobrevivência de células irradiadas ou silenciadas ou com os dois tratamentos em associação. A figura mostra o resultado do ensaio clonogênico, que é resumido pelo gráfico de barras. As células foram silenciadas, irradiadas por três dias e, então, plaqueadas em baixa densidade. A contagem de colônias formadas após dez dias revelou uma redução de $90 \pm 2\%$ ($p < 0,001$). Os resultados são representativos da média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

O câncer, em sua natureza, é uma doença caracterizada pela perda da ordem biológica dos tecidos. O controle do equilíbrio proliferação/morte é perdido em células neoplásicas, nas quais estão alteradas as vias normais de sinalização. Mudanças nos níveis de Ca^{2+} promovem grande variedade de sinais que controlam os processos celulares, como principais agentes na decisão de sobrevivência ou morte celular².

A sinalização de Ca^{2+} nuclear regula diretamente funções como a ativação de cinases dentro do núcleo^{107,108}, o transporte de proteínas através do envelope nuclear^{109,110} e a transcrição de determinados genes¹¹¹⁻¹³, participando da regulação dos fatores de transcrição ou da regulação direta do promotor⁵⁹. A expressão exógena da proteína tamponadora de Ca^{2+} , parvalbumina, mostrou que o Ca^{2+} intracelular regula o crescimento celular⁴⁶.

Estudos iniciais das funções do Ca^{2+} nuclear na transcrição gênica eram dependentes da microinjeção de quelantes no núcleo ou no citosol de células individuais¹¹², mas consiste em uma técnica laboriosa, impraticável em estudos bioquímicos em população celular ou *in vivo*. Novos protocolos foram desenvolvidos, baseados na transfecção das células com proteínas tamponadoras, direcionadas, seletivamente, para o núcleo ou citosol¹¹³. Empregando essas estratégias, pode-se investigar os efeitos da redução de Ca^{2+} em compartimentos intracelulares e como esses efeitos afetam a sinalização celular principalmente em vias essenciais para a manutenção de funções celulares críticas como transcrição gênica e proliferação. O Ca^{2+} nuclear participa da regulação de genes ligados ao ciclo celular, sendo crucial para o crescimento de tumores tanto *in vitro* quanto *in vivo*¹¹¹.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem conhecido comportamento agressivo e elevadas taxas de recidiva^{7,8}. Apesar de a radioterapia ser uma estratégia frequentemente utilizada no tratamento dessa neoplasia, os tumores recorrentes são, normalmente, dotados de radioresistência, devido, em parte, à indução de mecanismos compensatórios de sobrevivência e proliferação após os danos causados pela irradiação^{11,12}. Foi demonstrado pelo nosso grupo que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear é capaz de reduzir a proliferação e a sobrevida de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço submetido à radioterapia⁷². Já é sabido que as radiações ionizantes estimulam a superexpressão de EGFR, porém, demonstramos que o tamponamento de Ca^{2+} nuclear foi capaz de, não somente prevenir esse fenômeno, como também de reduzir os níveis de expressão dessa proteína. Ainda são necessários mais estudos para esclarecer os demais mecanismos envolvidos na resposta de tecidos normais e cancerosos ao tamponamento de Ca^{2+} nuclear, no entanto, a redução da proliferação e da sobrevida alcançadas com essa metodologia indica que

esta pode ser uma estratégia a ser utilizada para sensibilizar o carcinoma de cabeça e pescoço à radioterapia.

A sinalização de Ca^{2+} nuclear regula diretamente funções como a ativação de cinases dentro do núcleo^{107,108}, o crescimento celular⁴⁶, o transporte de proteínas através do envelope nuclear^{109,110} e a transcrição gênica¹¹¹⁻¹³, participando da regulação dos fatores de transcrição, da regulação direta do promotor e da alteração da estrutura da cromatina, através da interação com histonas⁵⁹. A transcrição de muitos genes está correlacionada com as funções das proteínas codificadas por eles, de maneira que alterações em sua atividade transcricional refletem mudanças nos processos biológicos e no ambiente celular. A identificação de alterações no perfil de expressão gênica permite a elucidação de respostas celulares que possam estar sendo mediadas por alterações da concentração de Ca^{2+} nuclear, como por exemplo, a transcrição de genes ligados à radioresistência.

Nesse trabalho, utilizamos como carreador o adenovírus recombinante Ad-IP₃Sponge-NLS. Este sistema, contendo um fragmento do receptor do IP₃ humano da isoforma I, é capaz de se ligar ao IP₃ livre no núcleo, impedindo que se ligue ao seu receptor endógeno, tamponando, dessa forma, os sinais de Ca^{2+} nuclear⁴⁷. Os adenovírus são uma ferramenta correntemente utilizada para entrega de moléculas de interesse e apresentam vantagens como a grande capacidade de inserção de genes, as eficientes taxas de infecção, a não inserção do material genético no genoma da célula hospedeira, além de serem efetivos tanto em células quiescentes quanto nas em divisão^{115,116}. A utilização da construção adenoviral permitiu a maximização do número de células a expressar o IP₃Sponge e o seu direcionamento especificamente para o núcleo (pela sequência de localização nuclear ou NLS). Sua correta localização e a porcentagem de células infectadas foram determinadas pela expressão do gene repórter que codifica a RFP (proteína monomérica fluorescente vermelha). Essa metodologia permitiu a redução dos níveis de Ca^{2+} nuclear que, quando associada à irradiação X de células A431, com dose cumulativa, promoveu a redução da proliferação celular, bem como da fração de sobrevivência⁷². Empregamos a metodologia do RaSH para investigar qual seria o papel do decréscimo dos níveis de Ca^{2+} nuclear na alteração do perfil de expressão gênica, potencialmente relacionada à radiosensibilização observada. Com o uso dessa metodologia, nosso grupo demonstrou, em 2010, que a expressão do gene da Legumina era diminuída pelo tamponamento de Ca^{2+} nuclear (realizado com a proteína quelante Parvalbumina, fusionada a uma sequência de localização nuclear, carreada por adenovírus) e que esse gene codifica uma proteína envolvida na proliferação de células SKHep1⁷⁷. Após *screening* da biblioteca de

cDNA, nós identificamos pelo programa Blastn, 8 genes diferencialmente expressos após tamponamento do Ca^{2+} nuclear (Tabela 4). Nós verificamos que estes genes foram regulados positiva ou negativamente quando o Ca^{2+} nuclear fora tamponado. Escolhemos três entre os genes selecionados para serem validados em nível transcricional e fenotípico. Os resultados obtidos por PCR em Tempo Real e Western Blot confirmaram que a Calpaína (figuras 5 e 7) e a NLK (figuras 5 e 8) tiveram sua expressão aumentada, enquanto a Kinesina (figuras 5 e 6) teve a expressão reduzida mediante tamponamento do Ca^{2+} nuclear.

A Calpaína é uma cisteína protease dependente de Ca^{2+} , relacionada ao remodelamento do citoesqueleto, apoptose e diferenciação celular^{98,99}. Sua expressão é aumentada em câncer de mama e câncer colorretal¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Já foi demonstrado, em camundongos-modelo de melanoma, que a inibição da calpaína, através da superexpressão de seu inibidor endógeno, calpastatina, leva à inibição do crescimento tumoral e, paradoxalmente, ao aumento da disseminação para os linfonodos regionais, através da promoção de resistência aos mecanismos apoptóticos e da aceleração dos processos migratórios¹⁰². Além disso, sabe-se que a calpaína promove angiogênese e aumento da inflamação, uma vez que facilita a ativação de NF- κ B e diapedese^{98,105}. Por ser uma protease dependente de Ca^{2+} e por estar relacionada a funções importantes nas células, sua expressão aumentada, mesmo sob concentração nuclear de Ca^{2+} reduzida, pode sugerir que neste tipo de tumor o Ca^{2+} proveniente ou do citosol ou de outros estoques intracelulares possam atuar na modulação deste gene e com isso, minimizar os efeitos de uma menor concentração nuclear de Ca^{2+} na expressão desta proteína.

A NLK é uma cinase do tipo MAPK, que regula diversas vias de sinalização através da fosforilação de fatores de transcrição⁹⁰⁻². Polimorfismos localizados em seu gene estão relacionados ao risco de câncer de ovário⁹³ e sua expressão é diminuída em amostras de metástase de câncer de próstata, em relação a tecidos normais. Sua superexpressão resulta na indução de apoptose e na inibição da transcrição de genes envolvidos na via de sinalização do receptor de andrógeno⁹⁴. Nossos resultados sugerem que essa cinase é superexpressa na associação entre radiação X e tamponamento de Ca^{2+} nuclear talvez como um mecanismo compensatório na tentativa de manter a sobrevivência celular, especialmente por causa da importância dela na regulação da fosforilação de fatores de transcrição e/ou, a despeito dos resultados encontrados para a Calpaína, seu gene também possa se utilizar de Ca^{2+} de outros estoques dentro da célula, e com isso a redução do Ca^{2+} nuclear seja menos impactante.

A Kinesina participa da formação do fuso, da separação e alinhamento dos cromossomos e da citocinese, há indícios de que alterações na sua expressão estejam relacionadas ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores⁸⁸. Em tumores de próstata, a superexpressão de Kinesina foi constatada em amostras resistentes ao tratamento¹⁰³, o que é compatível com a sua superexpressão na condição de **não** tamponamento de Ca^{2+} . Demonstramos que, em células A431, o silenciamento da kinesina promove a redução da taxa de repopulação do tumor após a irradiação, o que é indicado pela redução da fração de sobrevivência constatada com o ensaio clonogênico. São necessários maiores estudos para elucidar o mecanismo através do qual esses efeitos são produzidos pelo silenciamento. Entretanto, nossos resultados mostram que o silenciamento da Kinesina promoveu efeitos semelhantes aos encontrados pela associação entre o tamponamento de Ca^{2+} nuclear e radiação X, indicando que a Kinesina participa de funções essenciais para a continuidade da sobrevivência tumoral, demonstrado pelo ensaio clonogênico. Sinais de Ca^{2+} nuclear promovem a remoção de DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator), que tem quatro domínios de ligação ao íon, das sequências DRE (downstream regulatory element), permitindo, assim, a transcrição de genes alvo¹²³. Sabe-se que a Kinesina participa de processos relativos à divisão celular, em cuja regulação atua o Ca^{2+} nuclear. A regulação de processos-chave envolve, muitas vezes, a regulação da transcrição gênica pelo Ca^{2+} nuclear, o que é exercido, pelo menos em parte, pelo complexo proteico DREAM. Esse complexo se liga a sequências DRE presentes no DNA, bloqueando a transcrição; o Ca^{2+} nuclear, quando aumentado, se liga nos domínios EF do DREAM, reduzindo sua afinidade pela sequência de nucleotídeos, permitindo a transcrição. Já foi demonstrado que o gene da KIF23, membro da família das Kinesinas, é alvo de p53, de maneira que a indução de p53 promove a redução de sua transcrição. Durante o estímulo da p53, há o acúmulo de DREAM no promotor do gene da KIF23¹²³. Nossa hipótese é que, em níveis reduzidos de Ca^{2+} nuclear, atingidos pelo tamponamento, DREAM permanece ligada ao DNA, reduzindo a expressão de kif1B. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os elementos regulatórios da transcrição desse gene e sua relação com o Ca^{2+} nuclear.

A superexpressão da Calpaína e da NLK na condição de ausência de Ca^{2+} sugere que estejam relacionadas ao fenótipo mais radiosensível, ao passo que a Kinesina, provavelmente, está relacionada ao fenótipo radioresistente. Foi demonstrado que o uso de inibidor da Kinesina promove a completa regressão tumoral em camundongos transplantados com câncer de pulmão humano¹¹⁹. A inibição da Kinesina tem se mostrado eficiente no controle de

modelos de melanoma refratários a inibidores de proteassoma e a agentes imunomodulatórios¹²⁰. O silenciamento da Kinesina promove parada do ciclo celular em células HeLa¹²¹. Consistentemente com esses dados, o silenciamento da Kinesina promoveu a redução da proliferação e formação de colônias em células A431 irradiadas, o que indica que a redução de sua expressão está envolvida na radiosensibilização observada mediante tamponamento de Ca^{2+} nuclear.

A utilização de alvos moleculares terapêuticos no câncer vem ganhando espaço nos últimos anos. Os avanços na genômica, proteômica, bioinformática e no entendimento dos sistemas biológicos possibilitaram a elucidação de diversas cascatas de sinalização aberrantes no câncer, aumentando a probabilidade de descoberta de novos alvos^{10,68,69,70}. No caso do HNSCC, são frequentemente observadas mutações e superexpressões. A desregulação das vias do EGFR, Ras, NFκB, Stat, Wnt/β-catenina, TGF-β e PI3-K/AKT/mTOR contribui para o desenvolvimento dessa neoplasia¹¹⁵. Além disso, os HNSCCs comumente apresentam a superexpressão dos oncogenes *myc*, *erb-2* e do receptor do fator de crescimento epidermal, o que está relacionado, em ambos os casos, a um prognóstico ruim^{115,116}. Diversas terapias visando alvos moleculares vêm sendo desenvolvidas para HNSCC. De fato, o uso de inibidores como Cetuximab, Trastuzumab, Bevacizumab e Sorafenib, vem apresentando propriedades antiproliferativas, tanto isoladamente quanto em associação com terapias convencionais, aumentando sua eficácia¹¹⁵. O Cetuximab é um dos anticorpos monoclonais com afinidade pelo domínio externo do EGFR, que age como radiosensibilizador⁷¹. As células tumorais podem aproveitar a maquinaria de sinalização de Ca^{2+} para promover uma maior proliferação e se proteger de sinais para morte, como a apoptose, estimulando a superexpressão de genes chaves para sua sobrevivência. O estudo dos mecanismos de modulação da expressão desses genes pelo Ca^{2+} nuclear é um assunto intrigante e desafiador, no entanto, sua elucidação estava além do escopo desta pesquisa, ficando a cargo de futuros trabalhos. Por sua relevância na bioquímica e fisiologia celulares este íon, bem como a inibição da expressão de Kinesina, aparecem como atraentes alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do carcinoma de células escamosas, como sugerem os resultados desta pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Esta pesquisa nos permite concluir que:

1. Na condição RX/ Ca^{2+}_T houve superexpressão dos genes que codificam Calpaina e NLK, considerando os níveis de RNAm e proteínas.
2. Houve aumento de expressão do gene que codifica a Kinesina na condição RX, considerando os níveis de RNAm e proteínas.
3. O silenciamento da Kinesina em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (A431) é capaz de reduzir a fração de sobrevivência, relacionada à repopulação do tumor após a irradiação, indicando que constitui um potencial alvo molecular para promover a radiosensibilização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraes, E.D., Lessa, G.S. Angra, I. et al., Tumores de Cabeça e Pescoço In: Guimarães, J.R.Q. Manual de Oncologia Clínica (BBS). São Paulo, BBS, 2004. p.429-552.
2. Weinberg, Robert A. A Biologia do câncer. ArtMed, 2007
3. Bomken, S., Fišer, K., [...], and Vormoor, J (2010). Understanding the cancer stem cell. *Brit Jour Cancer*.103(4):439-445.
4. Prince, ME, Sivanandan, R, Kaczorowski, A, Wolf, GT, Kaplan, MJ, Dalerba, P, Weissman, IL, Clarke, MF, Ailles, LE (2004). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PNAS*. 104(3):973-78.
5. Monroe,MM, Anderson, EC, Clayburgh, DR and Wong MH (2011). Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oncology*.
6. Instituto Nacional de Câncer. [online].Rio de Janeiro, Brasil. [capturado 10 jun.2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
7. Klein, JD, Grandis, JR. The molecular pathogenesis of head and neck cancer (2010). *Can Biol Ther*.9(1):1-7.
8. Lipp,P, Thomas, D, Berridge, MJ and Bootman, MD. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO*, 1997; 7166-73
9. Gaetti, EC, Pereira, C, GuastaldiI, F,[...], and Gaetti, E (2010). Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. *Odon Araç*.31(2):9-13.
10. Jerhammar F, Ceder R, Garvin S, Grénman R, Grafström RC, Roberg K.Affolter A.F (2010). Fibronectin is a potential biomarker for radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Can Biol Ther*. 10(12): 1244-1251.
11. Affolter A, Fruth K, Brochhausen C, Schmidtman I, Mann WJ, Brieger J.(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(10):1448-57.
12. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G, Lin PS (2003). ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene*. 22:5855-65.
13. Pelisser, A, Pelisser, V, Fontanella, RC, Figueiredo MAZ. Microscopical analysis of fractionated cobalt 60 radiotherapy effects on mandibles of rats. *Radiologia Brasileira*, 2007.

14. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat.Rev.Biol.* 4(7): 517-529.
15. Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nat.Rev.Mol.Cel.Biol.* 1:11-21.
16. Petersen, OH (2008). Ca²⁺- induced pancreatic cell death: roles of the endoplasmic reticulum, zymogen granules, lysosomes and endosomes. *J.Gastroenterology.* 23:31-38.
17. Contreras, L., Dragoa, I., Zampesea, E., Pozzan, P (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochem. Biophys. Acta.* 6(7): 607-18.
18. Kiselyov K, Yamaguchi S, Lyons CW, Muallem S (2010). Aberrant Ca²⁺ handling in lysosomal storage disorders. *Cell calcium.* 47(2):103-11.
19. Leite, M.F. and Nathanson, M.H. Ca²⁺ Signaling in the liver. In: *The liver: Biology and Pathobiology.* Edited by I.M.Arias, J.L.Boyer, F.V.Chisari, N.Fausto, D.Schachter, and D.A.Shafritz. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001; pp. 537-554.
20. Leite, M.F., Hirata, K., Pusl, T., Burgstahler, A.D., Okazaki, K., Ortega, J.M., Goes, A.M., Prado, M.A., Spray, D.C., and Nathanson, M.H. (2002). Molecular basis for pacemaker cells in epithelia. *J. Biol. Chem.* 277: 16313-16323.
21. Choe, CU and Erlich BE (2006). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE.* 363.
22. Mendes, C.C., Gomes, D.A., Thompson, M., Souto, N.C., Goes, T.S., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomez, M.V., Nathanson, M.H., and Leite, M.F. (2005). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280: 40892-40900.
23. Resende RR, Andrade LM, Oliveira AG, Guimarães ES, Guatimosim S, Leite MF (2013). Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell communication and signaling.* 11(1)11-14.
24. Pusl T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, Berchtold MW, Hoek JB, Karpen SJ, Nathanson MH, Bennett AM (2002). Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem.* 277(30):27517-27.

25. Bootman M.D, Collins, T.J., Peppiatt, P.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Jeong T Seo, Berridge, M.J., Ciccolini, S., Lipp, P (2001). Calcium signaling: an overview. *Cell Develop Biol.* 12:3-10.
26. Bootman MD, Thomas D, Tovey SC, Berridge MJ, Lipp P (2000). Nuclear calcium signaling. *Cell Mol Life Sci.* 970: 371-78.
27. Fox, J.L., Burgstahler, A D , and Nathanson, M H (1997). Mechanism of long-range Ca²⁺ signalling in the nucleus of isolated rat hepatocytes. *Biochem.* 326: 491-95.
28. Chamero P, Villalobos C, Alonso MT, García-Sancho J (2002). Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem.* 277(52):50226-29.
29. Fedoryak OD, Searls Y, Smirnova IV, Burns DM, Stehno-Bittel L (2004). Spontaneous Ca²⁺ oscillations in subcellular compartments of vascular smooth muscle cells rely on different Ca²⁺ pools. *Cell Res.* 14(5):379-388.
30. Bootman MD, Harzheim D, Smyrniak I, Conway SJ, Roderick HL (2007). Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1. *Cell Calcium.* 42:489-501.
31. M. F. Leite, E. C. Throver, [...], and M. H. Nathanson (2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *PNAS.* 100(5):2975-2980.
32. Badminton MN, Campbell AK, Rembold CM (1996). Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺ in HeLa cells. *J. Biol Chem.* 271(49):31210-31214.
33. Echevarría W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* 2003.440-6
34. Vermassen, E., Parys, J.B., and Mauger, J.P (2004). Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell.* 96:3-17.
35. Malviya, V.K., Deppe, G., Boike, G. and Young, J. (1990) Pharmacokinetics of intraperitoneal doxorubicin in combination with systemic cyclophosphamide and cisplatin in the treatment of stage III ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 36: 185-188.
36. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell.* 80:439-444.

37. Humbert JP, Matter N, Artault JC, Köppler P, Malviya AN (1996). 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(9):478-85.
38. Meldolesi J, Pozzan T (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 23 (1):10-4.;
39. Mak, D., McBride, S., and Foskett, JK (1998). Inositol 1,4,5-tris-phosphate activation of inositol tris-phosphate. *Physiol.* 95: 15821-25.
40. Cocco L, Gilmour RS, Ognibene A, Letcher AJ, Manzoli FA (1987). Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem.* 248(3):765-70.
41. Divecha N, Banfić H, Irvine RF (1991). 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):3207-14.
42. Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M, Anderson RA (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell.* 9(12):3547-60.
43. Berridge, JM (1993). Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature.* 53:315-325.
44. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L (1992). Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature.* 358(6383):342-45.
45. Gensburger C, Freyermuth S, Klein C, Malviya AN (2003). In vivo nuclear Ca²⁺-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 303(4):1225-8.
46. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L (2007). Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem.* 11(1):17061-68.
47. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P (2008). c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem.* 288(7):4344-51.

48. Chawla, S., Hardingham,G.E.,Quinn,D.R. Bading, H (1998). CBP: a signal transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM Kinase IV. *Science*. 281(5382):1505-1509.
49. Kahl CR, Means AR (2003).Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Ver*. 24(6):719–736.
50. Thompson, M., Andrade,V.A., Andrade,S.J., Pusi,T., Ortega,J.M., Goes,A.M., and Leite,M.F (2003). Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 301(2):267-74.
51. Strayer,L. (1996). *Bioquímica*. (New York: W.H. Freeman and Company).
52. Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Walter,P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Science).
53. Basehoar,A.D., Zanton,S.J., and Pugh,B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*. 116: 699-709.
54. Schrem,H., Klempnauer,J., and Borlak,J. (2002). Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol. Rev*. 54(1): 129-158.
55. Lerea,L.S. and McNamara,J.O. (1993). Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways. *Neuron*. 10:31-41.
56. Bading,1993; Bading,H., Ginty,D.D., and Greenberg,M.E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260:181-186.
57. Hardingham,G.E., Chawla,S., Johnson,C.M., and Bading,H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 385: 260-265.
58. Evans,N.H., McAinsh,M.R., and Hetherington,A.M. (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol*. 4: 415-420.
59. Thiel,G., Mayer,S.I., Muller,I., Stefano,L., and Rossler,O.G. (2010). Egr-1-A Ca(2+)-regulated transcription factor. *Cell Calcium*. 47: 397-403.
60. Klar,J., Sigl,M., Obermayer,B., Schweda,F., Kramer,B.K., and Kurtz,A. (2005). Calcium inhibits renin gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension*. 46: 1340-1346.

61. West,A.E., Chen,W.G., Dalva,M.B., Dolmetsch,R.E., Kornhauser,J.M., Shaywitz,A.J., Takasu,M.A., Tao,X., and Greenberg,M.E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 11024-11031.
62. Mukhopadhyay,S., Munshi,H.G., Kambhampati,S., Sassano,A., Platanius,L.C., and Stack,M.S. (2004). Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 279:33139-33146.
63. Dolmetsch,R.E., Lewis,R.S., Goodnow,C.C., and Healy,J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 386:855-858.
64. Hardingham GE, Bading H (1999). Calcium is a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc Res Tech.* 46:348-55.
65. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM (2008). Nuclear Ca²⁺ regulates cardiomyocyte function. *Cell calcium.* 44(2):230-42.
66. Yih-Fung Chen, Ying-Ting Chen, Wen-Tai Chiu and Meng-Ru Shen (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J Biol Sci.*20:23:20-3.
67. Mountzios G, Soutati,A, Pectasides,D (2013). A novel approaches for current irradiation in locally advanced cervical cancer: platinum combinations, non-platinum containing regimens and molecular targets agents. *Obst and Gynec Intern.*1-8.
68. Kundu SK, Nestor M (2012). Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumor Biol.* 33(3):707-21.
69. Arti Yadav, Bhavna Kumar, [...], and Pawan Kumar (2011). Sorafenib enhances the anti tumor effects of chemo-radiation treatment by down regulating ERCC-1 and XRCC-1 DNA repair proteins. *Mol Can Ther.* 10(1):1241-51.
70. Gupta AK, McKenna, Weber CN, Feldman, Jeffrey MD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, and Muschel RJ (2002). Local Recurrence in Head and Neck Cancer Relationship to Radiation Resistance and Signal Transduction. *Clin Can Res.* 8:885-92.
71. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW(2006).A Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin and fluoropyrimidines. *J Clin Onc.* 30: 4914-21.

72. Andrade LM, Geraldo JM, Gonçalves OX, Leite MT, Catarina AM, Guimarães MM, Adriana F (2012). Nucleoplasmic calcium buffering sensitizes human squamous cell carcinoma to anticancer therapy. *Can Sci The.*4:131-39.
73. Shirai K, O'Brien MD (2007). Molecular targets in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr. Treat. Options in Oncology.*8(3):239-51.
74. Elser C, Siu LL, Winkquist E, Agulnik M, Pond GR, Chin SF, Francis P, Cheiken R, Elting J, McNabola A, Wilkie D (2007). Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol.* 20:3766-73.
75. Okamoto I, Kaneda H, Satoh T, Okamoto W, Miyazaki M, Morinaga R, Ueda S, Terashima M, Tsuya A, Sarashina A (2010). Phase I safety, pharmacokinetic, and biomarker study of BIBF 1120, an oral triple tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Mol Can Ther.*9:2825-2833.
76. Gillenwater AM, Zhong M, Lotan R (2007). Histone deacetylase inhibitor eroylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Can Ther.* 6(11):2967-75.
77. 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.
78. Bonner, J.A., Trummell, H.Q., Willey, C.D., Plants, B.A., Raisch, K.P (2009). Inhibition of STAT-3 results in radiosensitization of human squamous cell carcinoma. *Radiother Onc.* 92(3):339-44.
79. 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*, 2003; 2:1223-1231.
80. 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.
81. 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.

82. Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB (2000). RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc. Nat.*97(26): 12684-89.
83. Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1(2):156-59.
84. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 3389-402.
85. National Center of Biotachnology information. [online].US. [capturado 30 mar.2012]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
86. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference (2004). *Nature Biotech.*22(3): 326-30.
87. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 1: 2315-2319.
88. Yue Yu MSc1, Yu-Mei Feng PhD (2010). The role of Kinesin family proteins in tumorigenesis and progression. *Cancer.* 116(22):5150-60.
89. Huang Y, Wang KK (2001). The calpain family and human disease. *Trends in molecular medicine.* 7(8):355-62.
90. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between B-catenin and transcription factor TCF. *Nature.*399(6738):798-802.
91. Ishitani T., Hirao T., Suzuki M., Isoda M., Ishitani S., Harigaya, K., Kitagawa M., Matsumoto K., Itoh, M (2010). Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature Cell Biology.* 12:278-8.
92. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K (2005). STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF β -activated kinase 1 for STAT3 Ser727 phosphorylation. *Proc Natl.* 102(12):4524-29.
93. Kristen N. Stevens, Linda E. Kelemen, Xianshu Wang. (2012). Common variation in Nemo-like kinase (NLK) is associated with risk of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 11:523-28

94. Katayoon H, Emami, Lisha G. Brown, Tiffany E.M. Pitts, Xizhang Sun, Robert L. (2009). Nemo-Like Kinase Induces Apoptosis and Inhibits Androgen. *Prostate*. 69(14):1481-92
95. Kahn J, Tofilon PJ, Camphausen K (2012). Preclinical models in radiation oncology. *Radiation Oncology*. 7(223).
96. Howard D, Spittle M. Recurrent Cancer. In: *Head and neck cancer: Multidisciplinary management guidelines*. 4th edn. London: ENT UK. 2011.
97. Diaz EM, Kies MS, Sturgis EM, Clayman L, Laramore GE, et al. *Head and Neck: Cancer Medicine*. 7th edn. Hamilton, Ontario: BC Decker.
98. Franco SJ, Huttenlocher A (2005).Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci*. 118(17):3829-3838.
99. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003).The calpain system. *Physiol Rev*. 83:731-801.
100. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC, Sharma RK (2004).Overexpression of m-calpain in human colorrectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13:1604-09.
101. Shiba E, Kim S, Fujitani M, Kambayashi JI, Kawamura I, Tsujimoto S, Shimomura K, Tanji Y, Taguchi T, Kimoto Y, Izukura M, Takai SI (1996). Possible involvement of Calpain in the growth of strogen receptor positive breast cancer cells. *Anticancer Res*. 16(2): 773-7.
102. Raimbourg K, Perez J, Prignon A, Hanouna G, Haymann J, Baud L, Letarvenier E (2013). The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLOS ONE*. 8(4).
103. Sircar K, Huang H, Hu L, Liu Y, Dhillon J, Cogdell D. Mitosis phase enrichment with identification of mitotic centromer associated Kinesin as a therapeutic targeting castration-resistant prostate cancer. *PLOS ONE*,2012:7(2)
104. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Mey (2008). The kinesin KIF1B acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev*. 22(7):884-93.
105. Letavernier B, Zafrani L, Nassar D, Perez J, Levi C, Bellocq A, Mesnard L, Sachon E, Haymann JP, Aractingi S, Faussat AM, Baud (2012). Calpains contribute to vascular

- repair in a rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(2):335-42.
106. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC, Sharma RK (2004). Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(10):1604-9.
 107. Divecha N, Banfic H, Irvine RF (1991). 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.
 108. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268(5208):233-239.
 109. Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L et al. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I (2001). *Mol Cell Biol.* 21(9):2981-2990.
 110. Klein C, Gensburger C, Freyermuth S, Nair BC, Labourdette G, Malviya AN (2004). A 120 kDa nuclear phospholipase C gamma1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry.* 43(50):15873-15883.
 111. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH (2008). Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology.* 48(5):1621-1631.
 112. Carette JE, Graat HC, Schagen FH, Mastenbroek DC, Rots MG, Haisma HJ et al (2007). A conditionally replicating adenovirus with strict selectivity in killing cells expressing epidermal growth factor receptor. *Virology.* 361(1):56-67.
 113. (48) Chang JY, Zhang X, Komaki R, Cheung R, Fang B (2006). Tumor-specific apoptotic gene targeting overcomes radiation resistance in esophageal adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64(5):1482-1494.
 114. Zeng X, Lin Y, Yin C, Zhang X, Ning BF, Zhang Q et al (2011). Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. *Hepatology.* 54(6):2036-2047.

115. Matta, A. and Ralhan, R (2009). Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. Head and neck oncology. Head and Neck Oncology.1(6):
116. Nagai, M.A (1999). Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas, Braz Jou Med Biol Res. 32(7):897-904
117. McConnel, M.J., Imperiale, M.J (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Human gene therapy. 15:1022-33
118. Thomas, S.M., Grandis, J.R (2009). The current state of head and neck cancer gene therapy. Human Gene Therapy. 20:1565-75
119. Good, J.A.D, Wang, F., Rath, O. [...] and Kozielski, F (2013). Optimized S-Triptyl-L-cysteine-Based Inhibitors of Kinesin spindle Protein with Potent in Vivo Antitumor Activity in lung cancer xenografts model. The Jou Med Chem. 56:1878-93
120. Hans C. Lee, M.D., Shah, M.D., and Orłowski, R (2013). Novel approaches to treatment of double refractory multiple melanoma. ASCO. 302-6
121. Sarli, V. and Giannis, A (2008). Targeting the kinesin spindle protein : basic principles and clinical implications. Cli Canc res. 14(23):7583-87